

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



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M<sup>lle</sup> BAKHTAOUI Halima

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**Spécialité : BIOTECHNOLOGIES ALIMENTAIRES**

THÈME

**Effet des extraits phénoliques des écorces de grenade  
(*Punica granatum. L*) sur l'évolution des paramètres  
physicochimiques et microbiologiques d'un lait fermenté de  
type yaourt.**

Soutenu publiquement le 17/07/2019

DEVANT LE JURY

Président	M. BENMILOUD.D	MAA	Université de Mostaganem
Promoteur	M. BEKADA. A	Pr	Université de Mostaganem
Examinatrice	M. AIT SAADA. D	MCA	Université de Mostaganem

Année universitaire 2018 / 2019

## **Remerciement**

*Nous tenons tout d'abord à remercier Allah le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*En guise de connaissance, nous tenons à témoigner nos sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de notre travail de fin d'étude et à l'élaboration de ce mémoire.*

*Nous voudrions tout d'abord adresser toute nos gratitude au promoteur de ce mémoire : Monsieur **BEKADA. A**, professeur à la faculté des sciences de la nature et de vie - Université de Mostaganem- pour sa patience, sa disponibilité, ses précieux conseils et son aide durant toute la période du projet.*

*Nos vifs remerciements vont également au membres de jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche et d'avoir examiner notre travail toute en l'ayant enrichi par leurs propositions:*

*Nous tenons à remercier Monsieur **BENMILOUDE. D**, M.A.A -Université de Mostaganem- pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous tenons à exprimer également nos reconnaissances à **M. AIT SAADA. D** M.C.B Université de Mostaganem, à qui nous exprimons nos plus profonde reconnaissance et mes sincères remerciements de nos avoir fait l'honneur d'être examinateur et de participer au jury de ce projet.*

**Melle BAKHTAOUI Halima**

### **Dédicace**

*Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères dans ma vie; mes chers parents.*

*A mon très cher père **AEK Baghdadi**, pour les efforts fournis jour et nuit. Ce travail est le fruit de tes sacrifices pour mon éducation et ma formation.*

*A ma très chère mère **Fatima**, qui représente toute ma vie, qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Rien n'aurait sans votre compréhension et votre amour.*

*Merci mes parents pour m'avoir toujours encouragé, vous avez été ma force motrice pour réussir dans mes études durant toutes ces années et pour travailler avec plus de courage et persévérance. Que Dieu les garde pour moi.*

*La mémoire de ma grande mère qui est toujours dans mes pensées, et je l'oubliera jamais, que Dieu la protège dans ces vastes Paradis.*

*A mes chères sœurs: **Fatima, Misha, Amel, Maroua et ma petite Bouchra**.*

*A ma famille et mes collègues de promotion de master option biotechnologie alimentaire.*

**Melle BAKHTAOUI Halima**

## Résumé

Cette étude vise à évaluer les propriétés antioxydantes des extraits des écorces du *Punica granatum* L, et les valoriser en les introduisant dans un yaourt afin d'obtenir un alicament fonctionnel à caractère nutritionnel et thérapeutique.

L'évaluation de ces extraits est réalisée par la méthode de réduction du radical libre DPPH. L'extraction est faite par l'utilisation des trois solvants; méthanol, éthanol et acétone. La quantification des polyphénols totaux a montré la richesse de l'extrait méthanolique dont la teneur est de  $2.940 \pm 0.087$ g EAG/g lyophilisé. A partir des résultats du test de DPPH, l'extrait méthanolique a présenté la meilleure activité inhibitrice de radicale DPPH soit une concentration inhibitrice à 50% (IC50) égale à 0.68 mg/ml. En outre les trois extraits ont montré aussi de l'efficace en comparaison avec l'acide ascorbique (IC50 de  $0,714 \pm 0,004$ mg/ml).

Le travail expérimental a été complété par une étude qui se résume dans la préparation d'un lait fermenté avec l'incorporation d'extrait de fruit de *Punica granatum*, en vu d'étudier l'effet de ce dernier sur l'évolution des paramètres physicochimiques et microbiologiques du produit fini.

Les résultats expérimentaux montrent que l'ajout d'extrait phénolique des écorces de grenade dans le lait fermenté a réduit le pH et a augmenté l'acidité et la viscosité. De plus, l'extrait semble exercer un effet stimulant sur la croissance des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*).

En conclusion, les résultats obtenus indiquent que les écorces du *Punica granatum* L. constituent une source naturelle des antioxydants et qui pourraient être utilisées en thérapie.

**Mots clés :** *Punica granatum*, yaourt, Activité antioxydante, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*

## **Abstract**

This study aims to evaluate the antioxidant properties of bark extracts of *Punica granatum* L, and valorize them by introducing them into a yogurt in order to obtain a functional nutritional and therapeutic nutrient.

The evaluation of these extracts is carried out by the method of reduction of the free radical DPPH. The extraction is done by the use of the three solvents; methanol, ethanol and acetone. Quantification of the total polyphenols showed the richness of the methanolic extract whose content is  $2,940 \pm 0.087$ g EAG / g freeze-dried. From the results of the DPPH test, the methanolic extract exhibited the best radical inhibitory activity DPPH is a 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) equal to 0.68 mg / ml. In addition, the three extracts also showed efficacy in comparison with ascorbic acid (IC<sub>50</sub> of  $0.714 \pm 0.004$  mg / ml). The experimental work was completed by a study which is summarized in the preparation of a fermented milk with the incorporation of fruit extract of *Punica granatum*, in order to study the effect of the latter on the evolution of the parameters. physicochemical and microbiological properties of the finished product. Experimental results show that the addition of phenolic extract of pomegranate peel in fermented milk reduced pH and increased acidity and viscosity. In addition, the extract appears to exert a stimulating effect on the growth of lactic acid bacteria (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*). In conclusion, the results obtained indicate that the bark of *Punica granatum* L. is a natural source of antioxidants and could be used in therapy.

**Key words:** *Punica granatum*, yogurt, antioxidant activity, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*

## الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الخواص المضادة للأكسدة لمستخلصات اللحاء من *Punica granatum L* ، وتثمينها عن طريق إدخالها في اللبن من أجل الحصول على المغذيات الوظيفية الغذائية والعلاجية.

ويتم تقييم هذه المقططات من خلال طريقة الحد من الجذور الحرة DPPH. يتم الاستخراج باستخدام المذيبات الثلاثة ؛ الميثانول والإيثانول والأسيتون. أظهر القياس الكمي للبوليفينول الكلي ثراء مستخلص الميثانول الذي يحتوي على  $0.087 \pm 2940$  جم EAG / جم مجفف بالتجميد. من نتائج اختبار DPPH ، أظهر المستخلص الميثانولي أفضل نشاط مثبط جذري DPPH هو تركيز مثبط بنسبة 50 % (IC50) يساوي 0.68 مجم / مل. بالإضافة إلى ذلك ، أظهرت المستخلصات الثلاثة أيضًا فعالية بالمقارنة مع حمض الأسكوربيك (IC50 من 0.714  $\pm 0.004$  ملغم / مل). تم الانتهاء من العمل التجريبي من خلال دراسة تم تلخيصها في تحضير الحليب المخمر مع تضمين مستخلص الفاكهة من *Punica granatum* ، من أجل دراسة تأثير هذا الأخير على تطور المعلمات. الخصائص الفيزيائية والميكروبيولوجية للمنتج النهائي. أظهرت النتائج التجريبية أن إضافة مستخلص الفينول من قشر الرمان في الحليب المخمر يقلل من درجة الحموضة ويزيد من الحموضة واللزوجة. بالإضافة إلى ذلك ، يبدو أن المستخلص له تأثير محفز على نمو بكتيريا حمض اللبنيك (*Streptococcus thermophilus*) و (*Lactobacillus bulgaricus*). في الختام ، تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن لحاء *Punica granatum L* هو مصدر طبيعي لمضادات الأكسدة ويمكن استخدامه في العلاج.

**الكلمات الرئيسية:** *Punica granatum* ، واللبن الزبادي ، ونشاط مضاد للأكسدة ، والمكورات العقدية ، *Lactobacillus bulgaricus*.

## Liste des tableaux

<b>Tableau n°01:</b> Variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie	06
<b>Tableau n°02:</b> Classification botanique du grenadier	08
<b>Tableau n°03:</b> Variétés de grenadier à fruit	09
<b>Tableau n°04:</b> composition chimique du fruit de la grenade	14
<b>Tableau n°05:</b> Importance des composés phénoliques	28
<b>Tableau n°06:</b> Différents types du yaourt et leurs caractéristiques	40
<b>Tableau n°07 :</b> Critères microbiologiques du yaourt	50
<b>Tableau n°08 :</b> Tableau récapitulatif regroupant le rendement, la couleur et l'aspect physique des divers extraits à partir des écorces de fruit du <i>Punica granatum</i> L	67
<b>Tableau n°09:</b> IC50 et inhibitions maximales des extraits déterminé par la méthode de DPPH	72
<b>Tableau n°10:</b> Effet d'incorporation d'extrait de grenade sur l'acidité (°D) des yaourts expérimentaux	75
<b>Tableau n°11 :</b> Evolution de pH des yaourts incorporés d'extrait de grenade	77
<b>Tableau n°12 :</b> Effet de l'incorporation de l'extrait de grenade sur la viscosité des laits fermentés expérimentaux.	79
<b>Tableau n°13:</b> Evolution du nombre de <i>Streptococcus thermophilus</i> ( $N \times 10^5$ UFC/ml) des yaourts expérimentaux additionnés de l'extrait des écorces de grenade ( <i>Punica granatum</i> )	81
<b>Tableau n°14:</b> Evolution du nombre de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ( $N \times 10^3$ UFC/ml) des yaourts expérimentaux additionnés de l'extrait des écorces de grenade ( <i>Punica granatum</i> )	82

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Grenade et ses nombreuses graines	07
<b>Figure 02</b> : Les dérivées de l'acide benzoïque	29
<b>Figure 03</b> : Les dérivés de l'acide cinnamique	30
<b>Figure 04</b> : Squelette de base des flavonoïdes	30
<b>Figure 05</b> : La structure de l'acide gallique et d'un tanin gallique	32
<b>Figure 06</b> : La structure des tannins condensés	33
<b>Figure 07</b> : Carte géographique de la zone d'AïnArbaa-AïnTémouchent	55
<b>Figure 08</b> : L'échantillon avant le séchage	56
<b>Figure 09</b> : L'échantillon après séchage	56
<b>Figure 10</b> : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	60
<b>Figure 11</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	68
<b>Figure 12</b> : teneurs en polyphénols totaux des extraits des l'écorces de Punicagranatum L	69
<b>Figure 13</b> : Courbe étalon de l'activité antioxydante de l'acide ascorbique	70
<b>Figure 14</b> : Evolution des taux d'inhibition de DPPH par l'extrait méthanolique	72
<b>Figure 15</b> : Evolution des taux d'inhibition de DPPH par l'extrait éthanolique.	73
<b>Figure 16</b> : Evolution des taux d'inhibition de DPPH par l'extrait acétonique	73
<b>Figure 17</b> : Evolution de l'acidité Dornic des yaourts additionnés de l'extrait de grenade à différentes doses	74
<b>Figure 18</b> : Effet d'incorporation de l'extrait de grenade sur l'évolution de pH des yaourts étuvés expérimentaux	76
<b>Figure 19</b> : Evolution de la viscosité des yaourts expérimentaux additionnée de l'extrait de fruit de grenade (Punicagranatum)	78
<b>Figure 20</b> : Evolution du nombre de streptococcus thermophilus des yaourts étuvés additionnés de l'extrait de grenade (Punicagranatum).	80
<b>Figure 21</b> : Evolution du nombre de Lactobacillus bulgaricus des yaourts étuvés additionnés de l'extrait de grenade (Punicagranatum)	82

## Liste des abréviations

**°D** : Degré Dornic

**DPPH** : Diphenyl-2-picryl-hydrazyl

**EAG** : Equivalent d'acide gallique

**IC50** : Concentration inhibitrice à 50%

**EPS** : Exopolysaccharides

**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène

**EST**: Extrait sec total

**F.I.L** : Fédération Internationale du lait

**J.O.R.A** : Journal Officiel de la République Algérienne

**Kcal** : Kilo calorie

**LDL** : Lipoprotéines de faible densité

**M17** : Gélose M17

**MRS** : Matière grasse

**MS**: Matière sèche

**pH** : Potentiel hydrogène

**UFC** : Unité formant colonies

## Liste des diagrammes

<b>Diagramme n° 1:</b> Diagramme général de fabrication du yaourt ferme et du yaourt brassé	46
<b>Diagramme n° 2:</b> Extraction des polyphénols totaux par macération	58
<b>Diagramme n° 3:</b> Dosage des polyphénols totaux	60
<b>Diagramme n° 4:</b> Mesure de l'activité antioxydante	61
<b>Diagramme n° 5:</b> Préparation des levains lactiques	63
<b>Diagramme n° 6:</b> Technologie de fabrication des laits fermentés expérimentaux	64

## *Sommaire*

Introduction	01
<b>Patrie01 : Synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Généralités sur la grenade (<i>punica granaturme</i>)</b>	
1- Origine géographique	05
2- Nomenclature	05
3- Production de grenade	05
3-1. Production de grenade dans le monde	05
3-2. Production de grenade en Algérie	06
4- Description botanique	06
5- Classification botanique	07
6- Variétés	08
7- Facteurs écologique liées à la culture de grenadier	11
7-1. climat	11
7-2. sol	12
7-3. irrigation	12
7-4. pestes et ravageurs	12
8- composition phytochimique du fruit	13
8-1. graine	13
8-1.1. pépin	13
8-1.2. pulpe	13
8-2. écorce de fruit	13
8-3. feuille	13
8-4. fleur	14
8-5. racine et écorce de l'arbre	14
9- l'écorce de grenade	15
10- composition chimique de l'écorce de grenade	15
11- composés phénoliques de la grenade	16
• Polyphénols	16
a) Tannins	16
a.1) Tannins hydrolysables	17
a.2) Tannins condensés	17

b)Flavonoïdes	17
c)Anthocyanines	17
12- Utilisation de Punica granatum L	18
12-1. Usage culinaire	18
12-2. Les teintures naturelles	18
12-3. Le tannage et la teinture des cuirs	18
12-4. L'encre	19
12-5. Utilisation médicinale	19
12-6. Autres utilisations	19
13- Propriétés thérapeutiques	19
13-1. Propriétés antioxydante	19
13-2. Inhibition de l'oxydation des LDL	20
13-3. Anti-cancérogène	20
13-3.1 Cancer de la prostate	21
13-3.2 Cancer du sein	21
13-3.3 Cancer du poumon	21
13-3.4 Cancer du colon	21
13-3.5 Cancer de la peau	21
13-4. Activité antidiabétique	22
13-5. Activité anti-inflammatoire	22
13-6. Activité antimicrobienne	22
13-7 Effet antivieillessement	23
13-8 Effet protecteur neurologique	23
13-9 Effet sur la qualité du sperme	23
14- Toxicité de grenade	24
15- Extrait de peau de grenade comme aditif fonctionnel	24
•Alimentation animale	25
•Produits fongicides	25
•Substrat de fermentation	26
<b>Chapitre II : Les composés phénoliques</b>	
1- Généralités	28
2- Classification des polyphénols	29
2-1. Acides phénoliques	29

2-1.1. Acides benzoïques	29
2-1.2. Acides cinnamiques	29
2-2. Flavonoïdes	30
a) Flavonols	31
b) Les flavones	31
c) Les flavanones	31
d) Les flavanols	31
e) Les isoflavones	31
2-3. Tanins	31
2-3.1. Tanins hydrolysables	32
2-3.2. Tanins condensés	32
3- Activités biologiques des flavonoïdes	33
3-1. Activité anti-inflammatoire des flavonoïdes	33
3-2. Activité antioxydante des flavonoïdes	33
4- Rôles et propriétés des composés phénoliques	34
4-1. Dans l'aliment	34
4-2. Chez les végétaux	34
4-3. Chez l'homme	34
<b>Chapitre III : Généralités sur le yaourt</b>	
1- Historique	37
2- Définition et réglementation du yaourt	37
3- Les différents types de yaourt	39
4- Matières utilisées pour la production du yaourt	41
4-1. Lait frais	41
4-2. La poudre de lait	41
4-3. L'eau	42
4-4. Les additifs	42
5- Bactéries caractéristiques du yaourt	42
5-1. Streptococcus thermophilus	42
5-2. Lactobacillus bulgaricus	43
5-3. Intérêt et fonctions des bactéries du yaourt	43
5-3.1. Production d'acide lactique	43
5-3.2. Activité protéolytique	44

5-3.3. Activité aromatique	44
5-3.4. Activité texturante	45
5-3.5. Comportement associatifs des deux souches	45
6- Technologie du yaourt	45
a) Réception du lait	47
b) Standardisation	47
c) Homogénéisation	47
d) Traitement thermique	48
e) Fermentation lactique	48
f) Conditionnement et stockage	49
7- Qualité du yaourt	49
7-1. Paramètres physico-chimiques	49
7-1.1. pH et taux d'acide lactique	49
7-1.2. Taux de matière grasse (MG)	49
7-1.3. Extrait sec totale (EST)	49
7-2. Paramètres microbiologiques	49
7-3. Qualité organoleptique	50
7-3.1. Gélification acide	50
7-3.2. Comportement rhéologique	51
8- Intérêts nutritionnels et thérapeutiques	51
8-1. Intérêts nutritionnels	51
8-2. Effets thérapeutiques	52
• L'activité antimicrobienne	52
• Activité anti-cholestérolémiante	52
• Stimulation de système immunitaire	52
• Action sur les vitamines	52
<b>Partie 02 : Partie expérimentale</b>	
<b>Chapitre IV : Matériels et méthodes</b>	
1. Matériels	55
1-1. Site et conditions d'échantillonnage	55
1-2. Appareillages	56
1-3. Produits chimiques	57
-Etude biochimique	57

-Etude microbiologique	57
2- Méthodes	57
a) Etude biochimique	57
2-1. Préparation des extraits	57
2-1.1. Extraction des polyphénols totaux (macération)	57
2-2. Etude quantitative	58
2-2.1. Rendement des extraits	58
2-2.2. Dosage des polyphénols totaux	59
2-2.3. Mesure de l'activité antioxydante	60
3- Essai de fabrication d'un lait fermenté alicament enrichi d'extrait d'écorces de grenade ( <i>Punica granatum</i> )	62
3-1. Protocol expérimental	62
3-2. Préparation des levains	62
3-3. Technologie de fabrication des laits fermentés expérimentaux	63
4- Mesure et contrôle sur les laits fermentés	64
4-1. Paramètres physicochimiques	64
4-1.1. Acidité	64
4-1.2. pH	64
4-1.3. Viscosité dynamique	65
4-2 Analyses microbiologiques	65
<b>Chapitre V : Résultats et discussion</b>	
1-Etude physicochimiques	67
1-1. Extraction des polyphénols totaux	67
1-1.1. Le rendement	67
1-2. Analyses des extraits des écorces de grenade ( <i>Punica granatum</i> L.)	68
1-3. Evaluation de l'activité antioxydante	70
1-4. Essai de fabrication d'un lait fermenté alicament enrichi d'extrait d'écorces de grenade ( <i>Punica granatum</i> )	74
• Mesure et contrôle sur les laits fermentés	74
1-4.1. Paramètres physicochimiques	74
1-4.1.1. Acidité	74
1-4.1.2. pH	75
1-4.1.3. Viscosité	78

1-4.2. Paramètres microbiologiques	80
1-4.2.1. Streptococcus thermophilus	80
1-4.2.2. Lactobacillus bulgaricus	81
Conclusion	85
Références bibliographiques	88

## **Introduction**

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ni le hasard, ni la religion et ni la superstition qui a guidé la médecine traditionnelle à employer une plante plutôt qu'une autre. Certainement, c'est l'expérience où les gens apprécient les vertus thérapeutiques des plantes.

Ces dernières années, le rôle des plantes médicinales dans la santé humaine a suscité une attention accrue. Plusieurs études épidémiologiques ont fortement suggéré qu'une forte ingestion de produits végétaux est associée à une diminution significative du risque de nombreuses maladies chroniques telles que l'athérosclérose, l'inflammation, le diabète et certains types de cancer. Ces effets bénéfiques sont en partie attribués à des composés possédant une activité antioxydante. Les principaux antioxydants sont les vitamines C et E et certains métabolites secondaires, en particulier les composés phénoliques.

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mise au profit dans l'alimentation, comestibilité et pharmacie; parmi ces composés on trouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapie. C'est pour cela que l'industrie pharmaceutique se tourne vers la nature et a entrepris une vaste étude seule terrain pour un répertoire des plantes les plus prometteuses parce qu'il est nécessaire aujourd'hui de valider l'usage traditionnel de ces plantes et d'évaluer scientifiquement leurs activités pharmacologiques retenus. (*Bohrom, 1997*)

La grenade (*Punica granatum L.*) est un fruit antique avec des antécédents médicaux. Sa peau épaisse, de même que ses cloisons internes sont riches en tanins ce qu'il lui confère un goût âcres et amères. Les études ont montré que les antioxydants trouvés dans la grenade ont des effets bénéfiques sur la santé cardiovasculaire semblable aux effets du vin rouge (*Vitis Vinifera*) et du thé vert (*Sinensis Camélia*) (*Rosenblat et al., 2006*).

La peau de grenade (*Punica granatum L.*) est une partie non comestible obtenue pendant le traitement du jus de grenade. La peau de grenade est une source riche en tanins, flavonoïdes et autres composés phénoliques (*Lie et al, 2006*). Les propriétés antioxydantes et antibactériennes de la peau de grenade dans les systèmes

modèles in vitro ont été rapportées (*Negi et Jayaprakasha, 2003; Reddy et al., 2007; Opara et al., 2009; Alzoreky, 2009*).

Des infusions à base d'écorces de grenade sont utilisées pour soigner les dysenteries (les tanins ont un effet astringent sur la muqueuse intestinale), et ce remède a été longtemps préconisé dans la thérapeutique traditionnelle. L'écorce et la racine du grenadier possèdent des propriétés vermifuges (*Rosenblat et al., 2006*).

Bien que la fabrication et la consommation des laits fermentés remonte à la plus haute antiquité, les progrès réalisés dans l'élaboration, la standardisation et la diversification des yaourts correspondent pour la plupart aux efforts de recherche entrepris au cours du siècle dernier.

Il est bien connu que les produits laitiers frais fermentés, comme le yaourt, sont des aliments de grande consommation à travers le monde (*Nakasaki et al., 2008*).

Avec le progrès technologique réalisé, le yaourt apparaît comme un produit laitier très digeste qui possède une grande valeur nutritionnelle et qui est apprécié pour son goût et sa texture (*Rohmain, et al., 2010*). Il convient à toutes les tranches d'âge et même chez les sujets intolérants au lactose (*Nagai et al., 2011*).

Le yaourt est obtenu par incubation de lait avec un mélange de *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (*JORA, 1998*), d'autres ingrédients peuvent être ajoutés au yaourt, comme les fibres de fruits et légumes, de fruits secs ou légumes comme les céréales.

L'objectif de la présente étude consiste à évaluer l'effet des écorces de grenade sur l'évolution des paramètres physicochimiques et microbiologiques d'un lait fermenté de type yaourt.

Notre travail sera réparti en deux parties:

1. Partie bibliographique portant sur des données générales sur l'espèce étudiée (*Punica Granatum L.*), ainsi que des généralités sur le yaourt.
2. Partie expérimentale où sont rapportés le matériel et les méthodes utilisées, les résultats obtenus, leur discussion et finalement une conclusion.

L'étude expérimentale est répartie comme suit :

- ✓ Extraction et dosage des composés bioactifs tel que les polyphénols totaux ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait de la peau de grenade.
- ✓ Incorporation des extraits de grenade dans un lait fermenté de type yaourt afin d'étudier leur effet sur les paramètres physicochimiques et microbiologiques de ce dernier

## I. Généralité sur la grenade (*Punica granatum*)

### 1. Origine géographique

La grenade (*Punica granatum L.*), en latins pomus et granatus, ce qui signifie une tête de série ou de pomme granulaire, originaire de l'Iran à l'Himalaya dans le nord de l'Inde, où elle a été cultivée depuis des milliers d'années. Il y a plus de 1000 cultivars de *Punica granatum*, qui sont passés de l'Iran, à l'est en Chine et en Inde et à l'ouest par la région Méditerranéenne, sur le sud-ouest américain, la Californie et le Mexique (*Levin, 1994 ; Lansky et Newman, 2007*).

La grenade est globalement cultivée dans de nombreuses régions géographiques, en répondant aux besoins nutritionnels et médicinales des populations des différents pays comme l'Iran, l'Inde, l'Égypte, la Chine, Israël, la Tunisie, la Syrie, le Liban, la Turquie, la Grèce, l'Italie, la France, l'Espagne, le Chili, le Portugal, les États-Unis, Oman et plus récemment en Afrique du sud (*Al-Said et al., 2009; Holland et al., 2009 ; Fawoleet al., 2011*).

Son nom est dérivé du latin "*granatum*" qui signifie "fruit à grain". La grenade est mentionnée dans la mythologie grecque, ainsi que dans la Bible et le Coran, preuve que ce fruit est connu et consommé depuis des millénaires (*Calin Sanchez et al., 2012*).

### 2. Nomenclature

Selon Hmid (2013), la nomenclature de Grenadier est :

- ✓ Nom scientifique : *Punica granatum*
- ✓ Nom français : Grenadier
- ✓ Nom anglais : Pomegranate
- ✓ Nom espagnol : Granada
- ✓ Nom italien : Melograno
- ✓ Nom arabe : Roman

### 3. Production de grenade

#### 3.1. Production de grenade dans le monde

La surface mondiale dédiée à la culture du grenadier est de 300 000Ha, dont plus de 76% sont répartis sur cinq pays (Inde, Iran, Chine, Turquie et USA).

Cependant, l'Espagne, l'Égypte, et Israël ont une superficie comprise entre 16 000 et 2 400 ha et sont parmi les pays qui ont développé le secteur d'exportation et aussi la sélection de nouvelles variétés (*Quiroz, 2009*).

D'autres pays pratiquent également cette culture notamment Afghanistan, Pakistan, Arménie, Géorgie, Tadjikistan, Jordanie, Italie, Tunisie, Azerbaïdjan, Libye, Liban, Soudan, Myanmar, Bangladesh, Mauritanie, Chypre et Grèce (*Melgarejo et al., 2012*).

### 3.2. La production de grenade en Algérie

Bien que le grenadier soit peu exigeant, les plantations ne sont pas très importantes en Algérie. Il existe de nombreuses variétés de grenades, de qualités très différentes. Plusieurs sortes de grenadier sont signalées dans des petites jardins en Kabylie, on ne connaît que leur appellation locale (Lahlou, Elmouze,...). Quatorze variétés sont actuellement autorisées à la production et à la commercialisation par l'État (tableau 01) (*INRAA, 2006*)

**Tableau n° 01:** Variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie. (*INRAA, 2006*)

Variétés de grenadier commercialisées en Algérie		
Messaad	Corde travita	Doux de Kolea
Gajin	Sefri	Zemdautomne
Spanish duoy	Chelfi	Moller huesso
Mellisse	Sulfani	
Espagne rouge	Papers shell	

### 4. Description botanique

La grenade est le fruit d'un arbuste appelé grenadier, de nom latin *Punica granatum L.* appartenant à la famille des *Punicacées* (*Espiard, 2002*).

La grenade est le fruit du grenadier qui est un petit arbre ou un grand arbuste (2 à 7 m de hauteur). Le tronc est recouvert d'une mince écorce grise; se ramifie irrégulièrement en branches plus ou moins épineuses et hérissées, portant des feuilles caduques et lancéolées en spirales (*Boullard, 1997 ; Iserin, 2001*).

Ses feuilles sont simples, lancéolées et peuvent mesurer de 3 à 8 cm de long. Ses fleurs de couleur rouge orangées sont très ornementales. Son fruit, la grenade, est une baie qui possède une peau lisse dont la couleur varie du jaune doré au rouge. La taille de la grenade est

comparable à celle d'une pomme. Cette baie renferme de nombreuses petites graines rouges contenues dans des loges, séparées par des membranes au goût amer. Toutes ces graines possèdent un mésocarpe charnu et gélatineux, acidulé et sucré, représentant la partie comestible du fruit (*Wald, 2009*).

Le poids des grenades varie généralement selon l'origine et le cultivar entre 163 et 216g. De point de vue botanique, le fruit de grenadier se compose de 3 parties: l'épiderme (écorce), les arilles et les pépins.

La proportion de l'épiderme qui est la partie extérieure du fruit représente 28 à 32% du poids total du fruit, alors que le taux en graines varie de 55 à 60% du poids total du fruit (*Oukabli et al., 2004*).



**Figure n° 01:** Grenade et ses nombreuses graines (*Wald, 2009*).

## 5. Classification botanique

Le grenadier, *Punica granatum L.* a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. Cette classification encore adoptée est décrite dans le tableau 02. (*Spichiger et al., 2009*).

Tableau n° 02: Classification botanique du grenadier (*Spichiger et al., 2009*)

<b>Embranchement</b>	<i>Spermaphytes</i>
<b>Sous embranchement</b>	<i>Angiospermes</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Ordre</b>	<i>Myrtales</i>
<b>Famille</b>	<i>Punicaceae (Lythraceae)</i>
<b>Genre</b>	<i>Punica</i>
<b>Espèce</b>	<i>Punica granatum</i>

*Punica granatum* partage sa famille botanique, *Punicaceae*, avec *Punica protopunica*, une espèce endémique de L'île Yéménite de Socotra (*Lansky et Newman, 2007*). Cependant les récentes études moléculaires, recommande la classification de ce genre dans la famille des *Lythraceae* (*Spichiger et al., 2002 ; Walter et al., 2002 ; Stover et Mercure, 2007*).

## 6. Variétés

Il existe plus de 1000 variétés de *Punica granatum L* (*Lansky et Newman, 2007*). Les critères les plus utilisés pour les distinguer sont la taille du fruit, la couleur de l'écorce, la couleur des graines, la dureté des pépins, la teneur en jus, acidité et astringence et la période de maturation (*Stover et Mercure, 2007*). Les cultivars « Wonderful » est le plus commercialisé aux Etats Unis. Découvert en floride en 1896, il est largement cultivé en Californie (*Lansky et Newman, 2007 ; Stover et Mercure, 2007*), Caractérisé par une couleur rouge intense de l'écorce et des graines.

Tableau n° 03: Variétés de grenadier à fruit (Afaq f et al., 2005)

Zone géographique	Variétés	Maturité des fruits	Taille des fruit	Caractéristique des fruits	Grains	Qualité gustative
Espagne	Blanca	Sep/oct	Moyenne	Peu lisse	Roses	Pulpe juteuse et sucrés
	Dulce Colorada	Oct	Gros	Peu lisse, fine et teintées de rouge	Gros, rouges	Très bonne
	Cagin	Oct	Gros	Colorés	Petits, rouges et très acides	excellente pour la grenadine
	Pignonenca	-	Gros	Colorés	Grains rouges	Bonne conservation
Maroc	Meknes	-	-	-	Sans grains	-
Tunisie	Zéri	Août/sep	Assez gros	Peau ferme, rouge	Très petits, rouges	Bonne , très juteuses
	Gabsi	Sep.	Gros	Peau jaunâtre claire	-	Bonne
	Chelfi	Sep/oct.	Assez gros	Teintés de rouge	-	Très rustique
	Tounsi ou tounsi	-	Assez gros	Colorés, teintés de rouge	Rouge foncé, pulpe très coloré	-
	Maïki	Oct	Assez gros	Peau ferme, jaune	Gros	Rustique, médiocre
Malte	Guiseppe	Oct	Gros à très gros	Peau colorée; rouge à brun	Gros	Juteuse, sucrés, excellente
	Douce de patras	Août/sep	Très gros	Peu colorés	Petits, rouges, très acides	Excellente

Grèce	Acide de patras	Oct	Très gros	Peu colorés, fine mais dure	Très rouge , acides	Très bonne pour la grenadine
	Denagra ou tanagra	Oct	Gros	colorés, peau épaisse	Rouges	Très bonne
	Chio	Oct	Gros	Peau colorées	Petits et rouges	Très savoureuses
France	De Jaffa	-	-	Peau colorées, rouges	-	-
	De Provence	Oct	Gros	-	Gros et durs	Bonne
	A fruit aigre	Oct	-	-	Acides	Médiocre
afghanistan	Grosse Blanche de kandagar	Fin août	Très gros	Blancs à jaune claire	Gros et pâles	Très bonne
	Grosse rouge de kandagar	Fin sept	Très gros	Rouge écarlate	Rouges	Excellente
	Grosse noire de kandagar	Nov	Très gros	Rouge foncé violacé	Gros et rouges	Très bonne
	Kaboul	-	-	-	-	-
	Paklia	-	-	-	-	-
Turquie	Ak Anar	Sep	Moyenne	Peau épaisse, jaune blanc	Assez gros et pâle	Très rustique
	chercherdeksis	Oct	Assez gros	Jaune foncé teinté de rouge	Petits et très tendre	Très bonne
	Kyzil-Anar	Oct	Assez gros	Peau épaisse rouge foncé	Petits et très rouges	-
	Kara-Anar	Déc	Gros	Peau ferme,	Gros et rouge	Rustique

				rouge foncé à violet	grenat	médiocre
Irak	Akmar Selimi	-	-	Rouge	-	-
	Aswad Selimi	-	-	Peau très foncée	-	-
	Halwa Selimi	-	-	-	-	Excellente
Arabie	mellassi	Sep	Très gros	-	Gros, pâles et tendres	-
	Selimi	Oct	Très gros, lourds	Peau fine, ferme et rouge écarlate	Très petits et tendres	Excellente
	Roman chouall	Nov	Assez gros	Peau ferme, fine, violet foncé	Gros et très rouges	Très bonne
	Nejidi	Nov	Gros	Peau ferme et fine, très coloré	Rouges	-
	Cherabani	Nov	Assez gros	-	Petits	Très acides pour vin de grenade
	Senna Djemel	Déc	Gros	Peau épaisse colorée	Rouges	Bonne
U.S.A	Wonderful	Août/sep	Très gros aplatis	Rouge rosâtre	Rouges	Très bonne rustique
	Paper shell	Sep/oct	Gros	Marbrés de pourpre	Petits	Parfumés, très sucrés
	Spanish-Ruby	Oct	Gros	Rouges	Rouges	Rustique

## 7. Facteurs écologiques liées à la culture du grenadier

### 7.1. Climat

La culture du grenadier est essentiellement limitée à un climat semi-aride, légèrement tempéré et subtropical. Il s'adapte naturellement à des régions avec des étés chauds et des hivers froids, comme les pays méditerranéens, l'Afghanistan, l'Iran et les Etats Unis (Californie) (*Ozgen et al., 2008*). Cette espèce peut supporter des températures extrêmes allant de -10 et +40°C (*Oukabli, 2004*). Le fruit est récolté en automne, à maturation (*Iserin, 2001*).

## 7.2. Sol

Le grenadier s'adapte à plusieurs types de sol allant du sable pure à l'argile lourde. Il donne de meilleurs résultats en sol d'alluvions profond avec des disponibilités en eaux satisfaisantes ainsi que sur limon lourd bien irrigué (*Oukabli, 2004*). Sa croissance optimale est obtenue sur des sols assez lourds et humides à pH de 5,5-7,0. Les sols alcalins donnent de faibles rendements (*Sheets et al., 1994*).

## 7.3. Irrigation

Les besoins en eau du grenadier sont pratiquement les mêmes que pour les agrumes 125 à 150 cm par an. Les arbres doivent être irrigués tous les 7-10 jours en l'absence de précipitations significatives. Le maintien d'une humidité suffisante du sol, en fin d'été et début d'automne est nécessaire pour réduire le fractionnement potentiel des fruits (*Sheets et al., 1994*).

## 7.4. Pestes et ravageurs

La maladie la plus destructrice observée sur les arbres en Floride provoque des taches sur les feuilles et les fruits. Les feuilles infectées sont d'un vert pâle et tombent prématurément. Les fruits infectés sont petits, avec des taches brunes foncées. Au moins trois pulvérisations de fongicides de cuivre neutre par an sont nécessaires (*Sheets et al., 1994*).

*Ectomyelois ceratoniae* (*Zeller*) est un microlépidoptère considéré comme le plus grand ennemi des grenades et arrive à causer des dégâts considérables pouvant affecter 90% des fruits. Les traitements chimiques n'ont pas donné grande satisfaction. L'ensachage localisé des fruits s'est montré assez efficace mais peu pratique.

*Zeuzère* (*Zeuzera pyrina L*), à l'état de larve creuse des galeries sur le tronc et les grosses branches pouvant provoquer leur cassure (*Mars, 1995*).

Le papillon de grenade, *Virachola isocrates*, pond ses œufs sur les fleurs et sur le calice des fruits en développement ; après quelques jours, les chenilles pénètrent les fruits en passant par le calice. Ces foreurs de fruits peuvent causer la perte d'une récolte entière.

Des moisissures et champignons infectent les fruits et les dégradent, surtout lors de pluies abondantes au cours de la maturation du fruit, tels que : *Pleuroplaconema*, *Ceuthospora Phyllostict* et *Aspergillus castaneus*. Les fruits fissurés ou éclatés sont les plus touchés (*Morton, 1987*).

## 8. Composition phytochimique du fruit

### 8.1. Graine

#### 8.1.1. Pépin

Les pépins de grenade contiennent 12 à 20% de matière grasse par rapport au poids de la graine, avec une prédominance des acides gras insaturés conjugués avec une teneur de 31,8- 86,6 % d'un acide gras très rare l'acide punique (cis 9, trans 11, cis 13) qui est un isomère de l'acide linoléique, 0,7- 24,4 % acide linoléique, 0,4-17,7 % oléique, 2,8- 16,7% stéarique et 0,3- 9,9 % palmitique. 95% des acides gras sont sous forme estérifié, dont 99% de triacylglycérols (*Meerts et al., 2009 ; Kim et al., 2002*). Ils contiennent des constituants mineurs de l'huile incluent les stérols et les stéroïdes sexuels (*Lansky et Newman, 2007*). dont la plus forte concentration en estrone (stéroïdes sexuels) du règne végétal (*Kim et al., 2002*).

#### 8.1.2. Pulpe

Le jus de grenade a un pouvoir antioxydant trois fois supérieur au thé vert et vin rouge. Il est riche en vitamine: vitamine C, vitamine E et  $\beta$ -carotène, et en polyphénols: catéchine, acide ellagique, acide gallique et ellagitannins (*Okonogi et al., 2007 ; Çam et al., 2009*); c'est une source importante en anthocyanines : 3-glucoside et 3,5-diglucoside de delphinidine, cyanidine, et pelargonidine, antioxydants flavonoïdiques puissants, qui lui confèrent sa couleur éclatante, qui augmente en intensité au cours de la maturation (*Gil et al., 2000 ; Lansky et Newman, 2007*). Ainsi que de l'acide citrique et malique et l'acide ascorbique (*Gil et al., 2000*).

Le jus contient des minéraux tels que Fe qui est relativement fréquent, Ca, Ce, Cl, Co, Cr, Cs, Cu, K, Mg, Mn, Mo, Na, Rb, Sc, Se, Sn, Sr, et Zn (*Lansky et Newman, 2007*).

### 8.2. Ecorce de fruit

L'écorce du fruit est très riche en flavonoïdes et en tanins (*Lansky et Newman, 2007*). Il contient environ 25% d'ellagitanins (*Fabre et Ermosilla, 2008*) et des flavonoïdes tels que: lutéoline, quercétine et punicalin, sont des ellagitanins spécifiques à la grenade (*Seeram et al., 2006*). l'écorce contient aussi des polysaccharides complexes partiellement caractérisés (*Jahfar et al., 2003*). La présence d'alcaloïdes dans l'écorce est équivoque, positive par le test Dragendorff, mais négative par le test Mayer (*Vidal et al., 2003*).

### 8.3. Feuilles

Les feuilles contiennent les mêmes polyphénols que l'écorce. Elles contiennent aussi des glycosides de l'apigénine, une flavone avec des propriétés progestiniques et anxiolytiques.

#### 8.4. Fleur

La composition chimique des fleurs est identique à celle de l'écorce, mais elle n'est pas complètement élucidée. Des études sont en cours afin de déterminer leur effet thérapeutique (*Lansky et Newman, 2007*).

#### 8.5. Racine et écorce de l'arbre

Les extraits préparés à partir des racines et écorce de l'arbre ont de puissants effets physiologique. Leur composition chimique se distingue des autres parties de l'arbre par de forte concentration en alcaloïdes (*Lansky et Newman, 2007*).

La composition chimique du fruit de grenade est donnée dans le tableau 04

**Tableau n° 04:** composition chimique du fruit de la grenade (*Elodie, 2009*).

Partie du fruit	Composition
<p><b>La peau de la grenade</b> (Malicorium)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>Acide hydroxybenzoïque:</b> l'acide gallique et l'acide ellagique</li> <li>○ <b>Acide hydroxycinnamique</b></li> <li>○ <b>Dérivés de flavones:</b> molécules de coloration jaune</li> <li>○ <b>Anthocyanidines:</b> responsables de la couleur rouge des grenade</li> <li>○ <b>nombreux ellagitanins:</b> tels que la punicaline, la punicalagine, la corilagine, la granatine A et la granatine B, ces tanins représentent jusqu'à 28% de la peau du fruit</li> <li>○ La pelletiérine pourrait aussi se trouver dans la peau de la grenade</li> </ul>
<p><b>Le jus de grenade</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>Sucres:</b> tels que le glucose, le fructose et le saccharose.</li> <li>○ <b>Acides organiques:</b> l'acide citrique, l'acide ascorbique, l'acide gallique et l'acide ellagique.</li> <li>○ <b>Acide aminés:</b> la valine, proline et méthionine.</li> <li>○ <b>Anthocyanines:</b> puissantes molécules antioxydants, fournissant au jus de grenade, sa couleur rouge augmente jusqu'à maturité du fruit, et diminue après la pression du fruit.</li> </ul>

Les graines	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>Huile</b> : qui se compose :           <ul style="list-style-type: none"> <li>- Acides gras insaturés (80%): l'acide punique, les acides oléiques et linoléiques et d'autres acides.</li> <li>- Acides gras saturés: les acides palmique et stéarique.</li> </ul> </li> <li>○ <b>Hormones stéroïdiennes, nombreux stérols</b>: le cholestérol</li> </ul>
-------------	--

### 9. l'écorce de grenade

L'écorce du fruit du grenadier est également appelée « *malicorium* », il s'agit de la partie dure de fruit. Elle représente environ 50% du poids total de la grenade (*Calin et al., 2005*). Elle est généralement utilisée séchée, sous la forme de morceaux brunâtres ou vert rougeâtre à l'extérieur, un peu verruqueux, brillants, jaunâtre sur la face intérieure concave, portant souvent l'empreinte des graines qui y étaient incrustées. Ces fragments sont de consistance coriace, ils sont formés d'un parenchyme de cellules à paroi minces, au milieu desquelles on distingue des groupes de cellules pierreuses et de faisceaux fibro-vasculaires. La saveur de l'écorce de grenade est amère et astringente (*Wald, 2009*).

### 10. composition chimique de l'écorce de grenade

L'écorce de grenade est une source très importante de composés bioactifs tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les ellagitanins (28% de l'épiderme du fruit), les proantocyanidines et les minéraux, essentiellement du potassium, de l'azote, du calcium, du phosphore, du magnésium et du sodium (*Calin et al., 2005*).

L'écorce de grenade se compose également, d'acide gras, de catéchines, de quercétines et de rutines (*Ghazaleh et al., 2013*). Toutefois, les flavonoïdes et les tanins sont plus abondants dans l'écorce de fruit sauvage que dans celle des plantes cultivées (*Wald, 2009*).

En outre, l'écorce du fruit contient également deux importants acides hydroxybenzoïques, l'acide gallique et l'acide éllagique, elle renferme aussi des molécules de coloration jaunes et anthocyanidine; responsables de la couleur rouge des grenades (*Hmid, 2014*). Cette composition lui a conféré plusieurs propriétés aussi bien dans le domaine médical que le domaine agroalimentaire (*Lairini et al., 2014*).

La concentration en macronutriments des écorces de grenades varie en fonction de plusieurs facteurs (variétés, climat, nature du sol, ect.); elle est moins importante que celle rapportée pour le fruit.

Selon *Mirdehghan et Rahemi, (2006)* la teneur en K > N > Ca > P > Mg > Na, mis à part le calcium qui est plus abondant dans les écorces ainsi que le sodium qui lui a une teneur équivalente. Pour ce qui est des micronutriments présents dans les écorces de grenade, les teneurs sont équivalentes à celle du fruit et qui sont représentés par le Bore qui représente la plus grande concentration (environ 22,2mg/kg), suivis du Fe (14,5mg/kg). Les minimales concentrations sont notées pour le Zn, le Cu et le Mn (11, 75, 8 et 6 mg/kg respectivement).

### 11. Composés phénoliques de la grenade

Les fruits de la grenade sont une source de divers composés biologiquement actifs, tels que les composés phénoliques comme l'acide ellagique, gallotannins, anthocyanines, qui sont connus pour agir en tant qu'antioxydants (*kkaplan et al., 2001 ; Noda et al., 2002 ; Cerda et al., 2003*).

- **Polyphénols**

Les polyphénols constituent un des groupes les plus communs et largement répandus dans les plants. Ils sont considérés comme des métabolites secondaires et ils n'ont pas de fonction métabolique spécifique dans les cellules végétales. Plus de mille polyphénols sont connus, ce sont des composés contenant un cycle aromatique avec un ou plusieurs groupes hydroxyles, ils peuvent être divisés en 15 grandes classes selon plusieurs structures chimiques. Certaines de ces classes sont des composés avec C6 aromatique, d'autres avec la structure C6-C1, et d'autres avec des squelettes plus complexes (*Bennick, 2002*).

Ce sont des constituants importants à propriétés organoleptiques des graines et des jus de grenade car ils donnent la couleur rouge attrayante et fournissent l'astringence douce qui est caractéristique de la saveur de la grenade (*Gil et al., 2000*).

Les polyphénols prédominants sont les flavonoïdes, les tannins condensés et les tanins hydrolysables (*Gil et al., 2000 ; Van Elswijk et al., 2004 ; Seeram et al., 2006*)

#### a) Tannins

Les tannins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbres et des fruits (raisin, dattes, café, cacao ...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation (*Hemingway, 1992*).

Les tannins confèrent un goût amer au jus de grenade et aux membranes blanches qui entourent les grains. Il a été rapporté que la grenade possède deux tannins à savoir l'acide ellagique et punicalagin qui ont un rôle important dans l'activité antioxydante (*Arjmand, 2011*).

**a.1) Tannins hydrolysables**

Les tannins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acides phénols, ou de dérivés d'acides phénols; les molécules glucidiques est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides (*Ribereau, 1968*).

L'intérêt des tannins hydrolysables de grenade dans divers domaines scientifiques et commerciaux a augmenté constamment vue leur intérêt dans le secteur alimentaire, car ces composés jouent un rôle important dans la qualité des aliments grâce à leur propriétés antioxydantes (*Arapitsas, 2012*).

**a.2) Tannins condensés**

Les tannins condensés sont trouvés dans la peau et le jus (*Arjamand, 2011*). La plupart des activités des tannins condensés dépendant en grande partie de leur structure, en particulier leur degré de polymérisation (*Arapitsas, 2012*).

**b) Flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des polyphénols naturels et complexes, présents sous forme de dérivées glucosidiques dans de nombreux fruits et légumes (*Alaiset al., 2003*).

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont présents dans les cellules épidermiques de feuilles et ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV (*Hadi, 2004*).

Il a été signalé que la grenade présente des principaux flavonoïdes à savoir la catéchine et la quercitrine, qui jouent un rôle important dans l'activité antioxydante (*Arjamand, 2011*).

**c) Anthocyanines**

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleu ou violet de la plupart des fleurs et des fruits (*Bruneton, 1993*). Ils sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique (les anthocyanosides). Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs (insectes, oiseaux) (*Brouillard et al., 1997 in Bahorum, 1997*).

La composition en anthocyanines est un paramètre important de qualité du fruit de la grenade, en raison de l'importance de ces derniers dans la couleur des jus respectifs. Les anthocyanines dans la grenade changent considérablement avec les cultivars, maturité, le secteur de production et conditions saisonnières (*Gil et al., 1995 ; Borochoy-Neoriet al., 2009*).

## 12. Utilisation de *Punica granatum L.*

### 12.1. Usage culinaire

La partie comestible de la grenade constitue environ 52% du poids du fruit (*Abbasi et al., 2008*). Les grenades sont consommées de préférence fraîche ou en jus de grenadine rafraîchissant (*Oukabli, 2004*). La teneur en jus se situe autour de 35 à 50ml/100g de graines. C'est un fruit riche en vitamine C et en éléments minéraux (*Oukabli, 2004*). Dans certains pays, comme l'Iran, le jus de grenade est une boisson très populaire (*Morton, 1987*).

La grenade peut être utilisée comme fruit de table. Les grains de grenade peuvent servir à garnir une salade de fruits, lui apportant une saveur sucrée acidulée.

La grenade peut aussi être employée pour la confection de sorbets ou coulis, en passant les grains pulpeux au moulin à légumes, afin d'obtenir un jus épais, sombre et parfumé, qui servira de base à ces préparations. Le suc de grenade, qui est riche en pectines, peut être utilisé dans la préparation de gelées alimentaires.

Le sirop de grenadine était autrefois réalisé avec des grenades fraîches. La vraie grenadine, de couleur rouge vif, est un sirop concentré de suc de graines de grenade (*Saad, 2013*).

### 12.2. Les teintures naturelles

Le grenadier fournit de nombreux principes tinctoriaux, aux couleurs très variées, tels que le vert, une large palette de jaunes, des gris, bruns et noirs. Les parties utilisées de cet arbre sont essentiellement l'écorce du fruit, les fleurs, les écorces des racines, des tiges et du tronc (*Wald, 2009*).

L'écorce du fruit et les fleurs sont utilisées pour teindre le textile. L'écorce de la grenade, a été utilisée en Inde comme une teinture depuis les temps les plus anciens (*Lloyd, 1897 ; Morton, 1987*). De l'encre a été produit à partir des feuilles en les macérant dans du vinaigre (*Morton, 1987*).

### 12.3. Le tannage et la teinture des cuirs

L'écorce de grenade servait au tannage et à la teinture des cuirs. Ainsi, c'est l'écorce du fruit qui était employée, pour donner la couleur jaune aux cuirs marocains, utilisés par exemple pour la réalisation des chaussures "babouche" (*Wald, 2009*).

Toutes les parties de l'arbre ont été utilisées comme sources de tanins lors du tannage des peaux. L'écorce du tronc contient 10 à 25% de tanins et était autrefois très utilisée dans la production du cuir au Maroc. L'écorce des racines contient 28% de tanins, les feuilles 11%, et l'écorce du fruit 26% (*Lloyd, 1897 ; Morton, 1987*).

#### 12.4. L'encre

L'écorce de la grenade fut quelques fois utilisées pour remplacer la noix de galle, dans la préparation de l'encre (*Wald, 2009*).

#### 12.5. Utilisation médicinale

Le grenadier a été largement utilisé en médecine traditionnelle dans de nombreuses cultures (*Lansky et al., 2000*). La grenade est considérée comme un fruit complet dans le coran. L'ancienne science médicinale indienne la identifiée comme une plante médicinale. (*Kulkarni et al., 2004*).

Dans le monde, la plus célèbre utilisation a été celle d'un vermifuge, tueur et expulseur des vers intestinaux. Les alcaloïdes contenus dans les racines, l'écorce de l'arbre et l'écorce du fruit induisent le relâchement du ténia et de son emprise sur la paroi intestinale, ce qui facilite son expulsion (*Lansky et al., 2000*).

L'écorce de grenade, les racines et les feuilles ont été utilisées en décoction pour traiter les diarrhées, les troubles digestifs et stopper les hémorragies. Les fleurs séchées sont utilisées pour guérir les bronchites et les inflammations buccales (*Stover et Mercure, 2007*).

D'autres utilisations ont été mentionnées dans la littérature : empêcher la fécondation et avorter, traitement des morsures de serpent, du diabète, de la lèpre et de brûlures (*Lansky et al., 2000*).

#### 12.6. Autres utilisations

Au Japon, un insecticide est dérivé de l'écorce de l'arbre.

Le bois de couleur jaune pâle est très dur. Cependant, étant disponible uniquement en petits morceaux, il est utilisé pour la confection de cannes. Les études récentes ont démontrées l'effet thérapeutique de quelques unes de ces utilisations (*Stover et Mercure, 2007*).

### 13. Propriétés thérapeutiques

Le grenadier est décrit comme remède naturel grâce à leurs différentes propriétés.

#### 13.1. Propriétés antioxydante

Les grenades sont parmi les fruits les plus riches en vitamine C et en composés phénoliques et surtout en anthocyanines et acides phénoliques (*El- Nemr et al., 1992*). La composition des différentes parties du grenadier a montré l'existence de plusieurs types de polyphénols ayant des propriétés antioxydantes très importantes à savoir les tannins que l'on trouve en concentration très élevée dans les tiges et l'écorce du grenadier (*Seeram et al., 2006*).

Les résultats de plusieurs expériences conduisent le jus de grenade en tête des onze jus de fruits. D'une part, le jus de grenade présente la plus forte concentration en polyphénols. D'autre

part, il possède le plus fort pouvoir pour inhiber l'oxydation des LDL. Enfin il montre la plus grande capacité à bloquer les radicaux libres. Le jus de grenade, réalisé à partir de fruits entiers, semble à être un très bon antioxydant (*Elodie, 2009*).

*Seeram* et ses collaborateurs (*2006*) ont, par ailleurs, montré que les différents antioxydants du jus de grenade agissent de manière synergique, puisque le jus de grenade a une activité antioxydante plus élevée qu'un extrait de tanins totaux de grenade ou que l'acide éllagique seul.

### 13.2. Inhibition de l'oxydation des LDL

Les polyphénols de jus de grenade protègent les LDL contre l'oxydation à médiation cellulaire via deux mécanismes qui mettent en jeu une interaction directe des polyphénols avec la lipoprotéine et/ou une action indirecte liée à l'accumulation des polyphénols dans les macrophages artériels. Il a ainsi été démontré que les polyphénols de grenade inhibent l'oxydation des LDL en détruisant les ERO et ERN.

Par ailleurs, les polyphénols de grenade augmentent l'activité paraoxanase sérique. Ce qui entraîne l'hydrolyse des peroxydes lipidiques dans les lipoprotéines oxydées et dans les lésions athérosclérotique. Ces propriétés antioxydantes et antiathérogènes des polyphénols de grenade ont été démontrées in vivo ainsi qu'un vivo chez l'être humain et chez la souris athérosclérotique déficiente en apolipoprotéine E (*Aviram et al., 2002*).

### 13.3. Anti-cancérigène

Les extraits de jus de grenade ont une activité antiproliférative, antiangiogène et pro-apoptotique sur des cellules cancéreuses (*Kawaii et Lansky, 2004*), et qui permet de ralentir le développement de ces cellules et la formation de tumeurs prostatiques (*Malik et al., 2005*). L'acide ellagique, l'acide caféique, la lutéoline et l'acide punicique sont des molécules présentes dans la grenade et elles sont testées en tant qu'inhibiteurs de la croissance in vitro de cellules cancéreuses humaines de prostate. Chaque molécules et à une concentration de 4mg/ml inhibe, de manière significative, la prolifération des cellules cancéreuses (*Hmid, 2013*).

d'autre part, ils semblent présenter d'intéressantes et multiples propriétés contre le cancer du sein (*Kim et al., 2002*) et cancer du côlon (inhibition de 30 à 100%) (*Seeram et al., 2005*), aussi bien dans un but préventif que dans un but thérapeutique (*Kim et al., 2002*).

### 13.3.1 Cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est l'un des cancers les plus répandus chez les hommes. Une étude *in vivo* sur une lignée de cellules du cancer de prostate hautement agressive, a démontré que des extraits acétoniques du fruit de grenade inhibent la prolifération cellulaire et induit l'apoptose.

L'administration par voie orale d'un extrait de grenade à des souris auxquelles des cellules cancéreuses de la prostate avaient été implantées, a induit une inhibition significative de la croissance de la tumeur. De plus, le taux de la PSA (antigène spécifique de la prostate) était réduit (*Malik et al., 2005 ; Syed et al., 2007*).

### 13.3.2 Cancer du sein

Le cancer du sein est l'un des cancers les plus courants qui menace la femme ménopausée. L'œstrogène le plus puissant de l'organisme, le 17-β-œstradiol, joue un rôle important dans la genèse et le développement de cancers hormonaux dépendants à leur premier stade. Les composés polyphénoliques de la grenade inhibent la prolifération de cellules d'une lignée cancéreuse du sein et la 17-β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type I, enzyme qui convertit l'œstrogène, l'œstrone, en son métabolite le plus actif, le 17-β-œstradiol. Une forte expression de cette enzyme peut être un indicateur de mauvais pronostic chez des femmes ayant des tumeurs du sein avec des récepteurs œstrogènes positifs (*Kim et al., 2002*).

### 13.3.3 Cancer du poumon

Le cancer du poumon reste l'un des cancers les plus mortels en dépit des avancées scientifiques et médicales dans la radiothérapie et la chimiothérapie de ces dernières années. Des extraits du fruit de grenade ont diminué la viabilité des cellules cancéreuses humaines du poumon sans affecter les cellules bronchiales saines et diminuent la progression de la tumeur (*Syed et al., 2007*).

### 13.3.4 Cancer du colon

Les composés phytochimiques de la grenade ont démontré un effet inhibiteur de la prolifération de cellules cancéreuses du colon et l'apoptose à travers la modulation de facteurs de transcription des cellules cancéreuses humaines, et il est plus efficace que l'ellagitanin purifié de la grenade. Cela est dû à l'effet synergique des constituants du jus de grenade (*Seeram et al., 2005*).

### 13.3.5 Cancer de la peau

L'exposition excessive aux ultraviolets (UV-B) a des effets néfastes sur la santé telle que l'érythème, l'hyperplasie, l'hyperpigmentation, l'immunosuppression, le photo-vieillessement, et le cancer de peau.

Des extraits de grenade ont un effet photochimio-préventif et protecteur des kératinocytes, cellules épidermales humaines, contre les radiations UV-B et UV-A; ainsi que des effets chimio-préventifs et curatifs des lésions cutanées chez le rat (*Syed et al., 2007*).

#### 13.4. Activité antidiabétique

La consommation du jus de grenade réduit significativement le stress oxydatif chez les patients diabétiques de type 2 (*Esmailzadeh et al., 2006*). Plusieurs études ont montré, en utilisant différents modèles animaux et même des patients diabétiques, des effets bénéfiques du traitement avec les extraits de grenadier.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette activité hypoglycémisante.

#### 13.5. Activité anti-inflammatoire

Des études in vivo ont démontré que l'huile de graines pressées du grenadier inhibe la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase. La cyclo-oxygénase, enzyme clé dans la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines, a été inhibée de 37% par l'extrait d'huile de graines pressées. La lipo-oxygénase, qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique en leukotriènes, ont été inhibés de 75% par le même extrait (*Schubert et al., 1999*).

Des rats obèses ayant reçu une supplémentation de jus de grenade ou d'extraits de fruits de grenadier montrent une diminution significative de l'expression des marqueurs de l'inflammation vasculaire, la trombopondine et la cytokine (*de Nigris et al., 2007*). Cependant, les propriétés anti-inflammatoires du grenadier dans la protection de l'endothélium et dans la diminution de l'athérosclérose n'ont pas été encore validées par des essais cliniques chez l'homme (*Basu et Penugonda, 2009*).

#### 13.6. Activité antimicrobienne

Les polyphénols de grenade ont des effets antiviraux et antimicrobiens intéressants. Le jus de grenade contient des inhibiteurs d'entrée HIV-1. L'étude de ce complexe montre qu'il bloque la liaison du virus avec certains récepteurs cellulaires (*Neurath et al., 2004*).

*Prashanth* et ses collaborateurs (*2001*) ont étudié, in vitro, l'action de différents extraits d'écorces de grenade (péricarpe) sur six espèces bactériennes: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*. Les résultats de cette étude ont montré que tous les extraits testés présentent une activité antibactérienne, quelle que soit l'espèce bactérienne cultivée. Néanmoins, l'extrait méthanolique semble posséder une activité antibactérienne plus importante que les autres extraits, essentiellement sur *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* et *Bacillus subtilis*.

Les épidémies d'influenza causent de nombreux décès et hospitalisations chaque année. Cette situation devient alarmante avec l'émergence de souches résistantes aux médicaments anti-influenza. Il y'a un besoin urgent de trouver de nouvelles molécules pour le traitement de cette maladie. *Haidari et al. (2009)* ont mené une étude dans ce sens en utilisant des extraits polyphénoliques de grenade. Ils ont démontré que ces extraits ont une action anti-influenza et que le punicalagin (tanin hydrolysable spécifique de la grenade) a un effet virucide et inhibiteur de la réplication de l'ARN viral (*Haidari et al., 2009*).

### 13.7 Effet antvieillissement

Un nombre croissant de preuves indiquent que les dommages causés aux macromolécules dus au métabolisme de l'oxygène et au stress oxydatif augmentent progressivement avec le vieillissement. Les protéines sont les macromolécules les plus affectées par le stress oxydatif en induisant l'inactivation des enzymes et l'induction de leur protéolyse. Les modifications les plus connues sont la formation de dérivés carbonyle sur les résidus de lysine, d'arginine, de proline, d'histidine, de cystéine et de thréonine. Il est constaté que la consommation journalière du jus de grenade diminue significativement le contenu sérique en composé carbonyles chez des sujets âgés alors que la consommation du jus de pomme n'affecte pas la teneur sérique en carbonyles. Cela démontre l'effet protecteur du jus de grenade contre le vieillissement (*Guo et al., 2008*).

### 13.8 Effet protecteur neurologique

L'Alzheimer est la cause la plus courante de démence. Elle touche plus de 10% des adultes de plus de 65 ans. Des études suggèrent que l'alimentation affecte le développement de cette maladie.

Une étude menée sur des souris transgéniques, alimentées par du jus de grenade, a démontré des effets bénéfiques sur les comportements et les signes neurologiques liés à la maladie d'Alzheimer. La consommation de jus de grenade pendant la gestation de la souris permet de protéger le cerveau du fœtus des lésions potentielles causées par un manque d'oxygène à la naissance (*Hartman et al., 2006*).

### 13.9 Effet sur la qualité du sperme

Une étude menée sur des rats a démontré une relation positive entre la consommation de jus de grenade et les paramètres de qualité du sperme. Une augmentation significative de la concentration du sperme, de la mobilité des spermatozoïdes, de la densité des cellules

spermatogénique, du diamètre des tubules séminifères, et de l'épaisseur de la couche des cellules germinales; ainsi qu'une diminution du taux de spermatozoïdes anormaux.

Cette amélioration de la qualité du sperme est due à la capacité antioxydante accrue du jus de grenade à protéger les spermatozoïdes sains contre les dommages de la peroxydation (*Turk et al., 2008*).

#### **14. Toxicité de grenade**

La partie comestible de la grenade n'est pas toxique, par contre l'écorce riche en tannins peut être nuisible pour l'organisme. Beaucoup d'études ont prouvé que lorsque le contenu en tannins de la ration alimentaire dépassent 0,25% est cancérigène (*Morton, 1987*).

Afin de mieux comprendre l'effet de la consommation de grenade ou des extraits de grenade sur l'organisme et leur rôle dans le traitement de certaines maladies, il est nécessaire de connaître les substances bioactives et leurs propriétés.

Il a été dit que la punicalagine, le tanin ellagique hydrosoluble et le polyphénol antioxydant très abondant dans le jus de grenade étaient toxiques pour le bétail. Une étude a donc été réalisée sur des rats Sprague-Dawley pour évaluer la toxicité potentielle de ce composé via un régime enrichi en punicalagine à hauteur de 6% administré sur une période de 37 jours.

La quantité d'aliments ingérés, l'index d'utilisation alimentaire et le taux de croissance sont plus faibles chez les rats traités durant les 15 premiers jours sans effet adverse significatif. Cela pourrait être dû à la plus faible valeur nutritionnelle de la ration enrichie en punicalagine ainsi qu'à sa moindre appétence. Aucune différence significative n'a été observée lors des analyses de sang, sauf pour l'urée et les triglycérides qui sont restés à des valeurs faibles durant toute l'expérience. L'analyse histopathologique du foie et des reins a confirmé l'absence de toxicité (*Cerda et al., 2003*).

#### **15. Extrait de peau de grenade comme aditif fonctionnel**

De nombreux conservateurs sont ajoutés aux aliments comme antioxydants ou agents antimicrobiens. Les composés phénoliques sont connus pour posséder les deux propriétés (*Shahidi et Naczki, 2004*).

Une étude a été effectuée par *Naveena et al. (2008)* pour évaluer le potentiel antioxydant de jus de grenade (JG) et de l'extrait de poudre de l'écorce (EPE) dans les pâtés cuits de viande de poulet pendant le stockage réfrigéré ( en condition aérobies à 4°C pendant 15 jours). Les résultats obtenus ont montré que les composés phénoliques de peau de grenade inhibe de manière significative l'oxydation des lipides dans les pâtés à une entendue beaucoup plus grande

que JG (augmentation de la teneur en polyphénols totaux. Réduction des valeurs de TBARS sans affecter les attributs sensoriels). L'addition du JG ou EPE à un niveau de 10 mg équivalent polyphénols/100 g de viande serait suffisant pour protéger les pâtés de poulet contre la rancidité oxydante pendant des périodes plus longues que l'antioxydant synthétique.

Dans une autre étude, *Devatkel et al. (2010)* ont évalué l'effet antioxydant des extraits des sous-produits de fruit à savoir, la poudre d'écorce de kinnow (PEK), de la poudre d'écorce de grenade (PEG) et de la poudre de graines de grenade (PGG) dans les pâtés de viande de chèvre pendant le stockage réfrigéré (à 4°C pendant 12 jours).

Les petits pâtés traités ont montré une réduction significative de la valeur de TBARS par rapport aux pâtés témoins. La poudre de peau de grenade a donné les meilleurs résultats suivie de la poudre de graine de grenade (PGG) et la poudre d'écorce de kinnow.

*Kanatt , Shander et Sharma (2010)* ont montré que l'addition de l'extrait de peau de grenade aux produits de viande de poulet a augmenté la durée de conservation à 2 à 3 semaines pendant le stockage réfrigéré grâce à une bonne activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas* et une activité antioxydante efficace en inhibant la rancidité oxydative des produits de poulet.

- **Alimentation animale**

Les déchets restants de la production du jus peuvent être utilisés par exemple comme matière première pour l'extrait de peau de grenade. La pratique de son utilisation comme source des antioxydants en alimentation de bétail est développée. *Shabtay et al., (2008)* ont étudié l'effet de la supplémentation diététique des veaux avec les peaux fraîches de grenade et ont constaté qu'elles favorisaient des augmentations significatives de la prise d'alimentation dans le plasma, avec la tendance positive envers le gain de poids accru des veaux.

- **Produits fongicides**

L'application de l'extrait de la peau de grenade comme fongicides efficace, respectueux à l'environnement contre les champignons pathogènes des plantes a été étudiée.

L'aérosolisation avec l'extrait de la peau de grenade a confirmé son efficacité comme agent d'aseptisation antifongique contre *Penicillium digitatum*. La prévention et le contrôle des agrumes récoltés envahis par la moisissure verte de citron *P. digitatum*, *in vitro*, ont été appliqués avec succès en immergeant le fruit blessé dans des solutions d'EPG. Par conséquent, l'application

de ce dernier pour le contrôle de ce champignon via l'hygiène des salles d'entreposage et de traitement du fruit récolté a été recommandé (Tayerl *et al.*, 2009).

- **Substrat de fermentation**

Des études effectuées ont suggéré que les résidus du fruit de grenade peuvent être utilisés comme substrat alternatif attrayant pour la production biotechnologique de l'acide ellagique comme résultats de l'hydrolyse des ellagitanins.

L'importance de ce composé est due à ses propriétés diverses rapportées comme forte telles que les capacités antioxydante, anti-inflammatoire, anti-tumorale, antimicrobienne, antivirale, antiproliférative (Aguilera- Carbo *et al.*, 2007).

Les peaux de grenade (*Punica granatum*) ont été caractérisées pour leur utilisation comme source d'antioxydants, substrat et support de fermentation à l'état solide.

Aguilar *et al.*, (2008) ont montrés que le processus de la fermentation fongique par *Aspergillus niger* a conduit à une forte accumulation de l'acide ellagique, une diminution de la teneur en sucres réducteurs et augmentation de la fraction de masse de protéines 19 fois après 96h de culture.

Robledo *et al.*, (2008), ont caractérisé deux souches d'*Aspergillus niger* préalablement isolée à partir d'une région semi-aride du Mexique pour leur efficacité dans la bioconversion . L'activité de l'enzyme tanin acyle hydrolase (TAH) n'a pas été clairement associée à la production de l'acide ellagique. L'acide ellagique qui s'est accumulé dans les cultures d'*A.Niger* était remarquablement pur après un procédé d'extraction simple.

## II. Les composés phénoliques

### 1. Généralités

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes, mais avec une répartition quantitative qui varie entre les différents tissus. Plus de 8000 structures ont été identifiées, allant de simples comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins (*Dai et Mumper, 2010*). Ils sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (*Bruneton, 1999*).

Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales; ils ont la capacité de moduler l'activité d'un grand nombre d'enzymes et de certains récepteurs cellulaires. En outre, *in vitro*, un grand nombre de polyphénols sont reconnus pour leurs propriétés antioxydant, anti-inflammatoire, antifongique, antivirale et anticancéreuse (*Khan, 2010*).

Ils sont présents dans les vacuoles des tissus. Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stade de développement.

Les recherches récentes sur les polyphénols sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques (tableau 05).

**Tableau n° 05:** Importance des composés phénoliques (*Dehak, 2013*).

Polyphénols	Utilisations
<b>Flavonols</b>	Luttent contre la sénescence cérébrale, propriétés neurosédatives, Antispasmodiques, antioxydants, anti-inflammatoire, diurétiques.
<b>Anthocyanes</b>	Utilisés dans les troubles de fragilité capillaire, antiseptique urinaires, propriétés d'améliorer la vision nocturne, diurétiques.
<b>Tanins</b>	Pouvoir astringent propriétés vasculoprotectrices, propriétés cicatrisante, anti-diarrhéique.
<b>Acides phénoliques</b>	Propriétés antipyrétique, propriétés anti-inflammatoires.
<b>Coumarines</b>	Propriétés vasculoprotectrices, neurosédatives, diurétiques.
<b>Quinones</b>	Laxatifs stimulants.

## 2. Classification des polyphénols

D'après *Motilva* et ses collaborateurs (2013), il n'existe pas de classification universelle des polyphénols. De nombreux auteurs ont donc proposé leur classification.

### 2.1. Acides phénoliques

Le terme d'acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (*Beddou, 2015*).

#### 2.1.1. Acides benzoïques

Les acides benzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque (figure 03) et ont une structure générale de base de type (C6-C1). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides (*Harrar, 2012*).

Ils sont principalement représentés dans le raisin par l'acide gallique, qui est généralement lié par une liaison ester à l'épicatéchine (*Zga, 2010*).

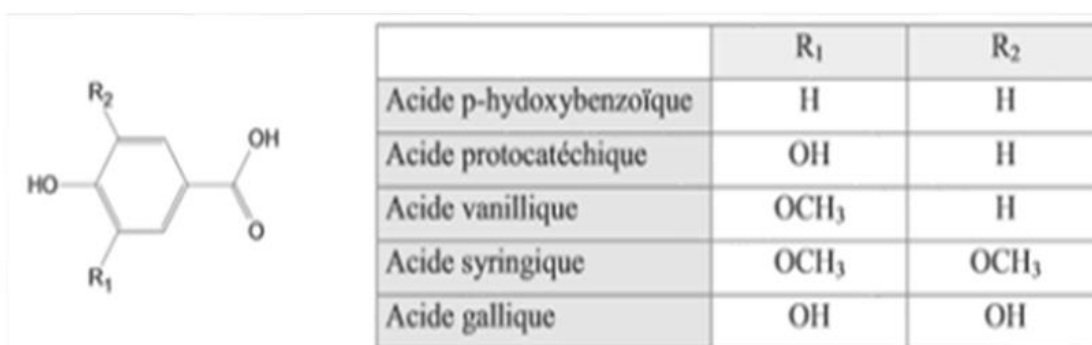


Figure n° 02: Les dérivées de l'acide benzoïque (*Khater, 2011*).

#### 2.1.2. Acides cinnamiques

Les acides cinnamiques sont dérivés de l'acide cinnamique (figure 03) et ont une structure générale de base de type (C6-C3). Ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent une réactivité chimique importante de ces molécules (*Harrar, 2012*).

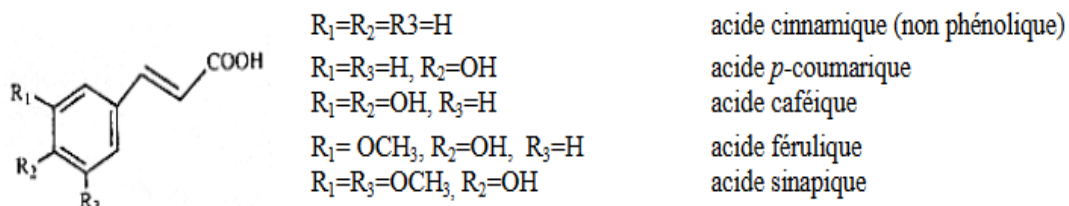


Figure n° 03: Les dérivés de l'acide cinnamique (*Bellebcir, 2008*).

## 2.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes représentant une large gamme de composés naturels. Ils sont des pigments végétaux et sont responsables de la couleur des fleurs, des fruits et des feuilles (*Anderson, 1995*).

Les flavonoïdes sont présents en toutes les parties des végétaux supérieurs. Dans la plupart des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosidiques dans les vacuoles des fleurs, des feuilles, des tiges ou des racines. Les flavonoïdes aglycones, notamment les flavonoïdes simples et polyméthylés, sont plutôt présents sous forme de cires dans les feuilles, les écorces, et les bourgeons floraux (*Iwashina, 2000*).

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et ils possèdent, comme montrant la figure tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques, de cycle en C<sub>6</sub> (A et B), reliés par une chaîne en C<sub>3</sub> (figure 04) (*Bruneton, 1999*).

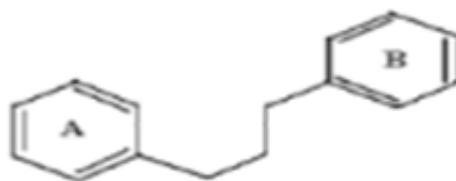


Figure n° 04: Squelette de base des flavonoïdes (*Dean, 1963*).

La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (*Medic et al., 2004*).

**a) Flavonols**

Les composés les plus représentatifs de cette famille sont le kaempferol et la quercétine. Cette dernière est connue pour posséder un très fort pouvoir antioxydant en raison de sa structure chimique favorable au piégeage des radicaux libres. A des concentrations de l'ordre de 15 à 30 mg/kg de matière fraîche (*Manach et al., 2004*).

**b) Les flavones**

Cette sous-classe est la moins abondante dans les fruits et légumes, parmi les flavonoïdes. Ils sont essentiellement constitués de lutéoline et apigénine glycosylés. Les seules denrées comestibles connues à ce jour qui en possèdent sont le persil et le céleri (*Manach et al., 2004*).

**c) Les flavanones**

Ils dérivent des chalcones et aurones par une cyclisation au centre du squelette, d'où un hétérocycle. Ils se caractérisent par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 par la présence des centres d'asymétrie (*Bruneton, 1999*).

**d) Les flavanols**

Les flavanols existent sous forme de monomères, dont l'unité la plus simple est la catéchine, et sous forme polymérique appelés les proanthocyanidines (*El Gharras, 2009*).

**e) Les isoflavones**

Les produits dérivés du soja sont la principale source d'isoflavones dans l'alimentation, qui peuvent être glycosylées ou non. On les rencontre aussi dans les légumineuses (*Manach et al., 2004*).

**2.3. Tanins**

Les tanins végétaux sont des composés phénoliques solubles dans l'eau et ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3000 unités. Ils sont aptes à la préparation du cuir et donnent les réactions classiques des phénols. En outre, ils ont certaines propriétés spéciales telles que l'aptitude à la précipitation des alcaloïdes, de la gélatine et des autres protéines (*Sereme et al., 2010*). Ils se divisent en deux catégories : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

### 2.3.1. Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des oligo ou poly-ester d'un sucre, en général le glucose, et de molécules d'acide-phénol (figure 05)

En général, ce type a un faible poids moléculaire. Cependant, des couplages oxydatifs entre les tanins hydrolysables peuvent produire des polymères de poids moléculaire importants. Le terme "tanin hydrolysable" décrit leur sensibilité à l'hydrolyse acide. Ils sont facilement hydrolysés par voie chimique ou enzymatique (*Sereme, 2010*). Ils sont notamment hydrolysés dans le tractus digestif des ruminants et leurs produits de dégradation sont absorbés (*Zhu, 1992*). Ce groupe est principalement responsable des effets toxiques pouvant apparaître lors de la consommation de certaines plantes (*Virginie et al., 2003*).

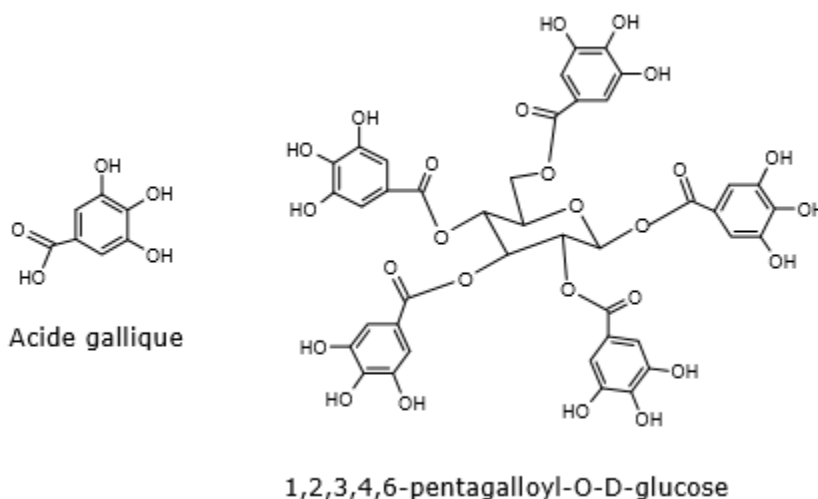


Figure n° 05: La structure de l'acide gallique et d'un tanin gallique (*Burnet, 2008*)

### 2.3.2. Tanins condensés

Les tanins condensés ne traversent pas la barrière intestinale, ils sont donc beaucoup moins toxiques que les tanins hydrolysables (*Virginie et al., 2003*).

Les tanins condensés ou proanthocyanidols (figure 06) résultent de la polymérisation de molécules élémentaires de flavanes (flavane ol-3, flavane ol-4, flavane diol -3,4). Ils sont désignés aussi sous le nom de tanins catéchiques (*Sereme, 2010*).

En fonction du degré de polymérisation, on distingue généralement les oligomères, comprenant de 2 à 10 monomères, des polymères contenant plus de 10 monomères (*Brunet, 2008*).



#### 4. Rôles et propriétés des composés phénoliques

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de l'utilisation :

##### 4.1. Dans l'aliment

Dans les aliments, ils sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux, ils peuvent contribuer à l'amertume (principalement les flavonones), l'astringence, la couleur, la flaveur, l'odeur et la stabilité de l'oxydation de l'aliment (*Lugasi et al., 2004*).

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines: la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (*Leong, 2002*). Les polyphénols sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique. Les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidiques. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classe (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (*Hennebelle et al., 2004*).

##### 4.2. Chez les végétaux

Les composés phénoliques représentent un système de défense pour les plantes contre les micro-organismes pathogènes, comme ils participent à deux principaux processus de l'activité des plantes, la photosynthèse et la respiration. De plus, ils interviennent dans d'autres processus tels que : la croissance, la germination, la morphogénèse des tiges et dans le processus de lignification (*Merghem, 2009*).

##### 4.3. Chez l'homme

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leur divers propriétés physiologiques comme les activités antiallergique, antiarthérogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (*Middleton et al., 2000 ; Ksouri et al., 2007*).

La capacité anti-radicalaire de ces métabolites secondaires, plus particulièrement les flavonoïdes fait sujet de nombreuses études récentes dans le domaine des thérapeutiques antioxydants, pour compenser l'insuffisance des moyens naturels de protection dans certains désordres comme le vieillissement cellulaire, le cancer. Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (*Madi, 2010*).

### III. Présentation du yaourt

#### 1. Historique

Origine d'Asie, le mot yaourt (yoghourt ou yogourt) vient de « yoghurmark », mot turc signifiant « épaissir » (*TAMIME et DEETH, 1980*).

Dans le sillage des découvertes de *Louis Pasteur* sur la fermentation lactique, de nombreux chercheurs s'intéressent aux micro-organismes présents dans le lait. En **1902**, *RIS et KHOURY*, deux médecins français isolent les bactéries présentes dans un lait fermenté égyptien. *METCHNIKOFF (1845-1916)* isole ensuite la bactérie spécifique du yaourt « la bacille bulgare », analyse l'action acidifiante du lait caillé et suggère une méthode de production sûre et régulière (*ROUSSEAU, 2005*).

De nombreux autres produits sont arrivés par la suite sur le marché: laits fermentés probiotiques, laits fermentés de longue conservation (pasteurisés, UHT, lyophilisés ou séché) et produits « plaisirs » (à boire, pétillants ou glacés).

Traditionnellement, c'est le yaourt dit « nature » et ferme qui constituait l'essentiel des productions de laits fermentés. Dans les années 1960-1970, sont apparus les produits sucrés puis aromatisés et aux fruits. Actuellement, ils sont majoritaires sur le marché.

L'apparition du yaourt brassé a constitué une autre étape importante de la commercialisation des laits fermentés. En outre, le développement commercial des produits probiotiques est important et correspond à une demande du consommateur (*BRULE, 2003*).

#### 2. Définition et réglementation du yaourt

D'après le *Codex Alimentarius*, le yaourt est un produit laitier coagulé obtenu par fermentation lactique grâce à l'action de *Lactobacillus delbrueckii* sous-espèce *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*) et de *Streptococcus salivarius*, sous-espèce *thermophilus* (*St. thermophilus*) à partir du lait frais ainsi que du lait pasteurisé (ou concentré, partiellement écrémé, enrichi en extrait sec) avec ou sans addition de substances ( lait en poudre, poudre de lait écrémé, les protéines lactosériques concentrées ou non, la caséine alimentaire ...etc.). Les micro-organismes du produit final doivent être viables et abondants.

Les bactéries lactiques doivent êtreensemencées simultanément et trouvées vivantes dans le produit à raison d'au moins 10<sup>7</sup> bactéries/g.

La législation de nombreux pays exige que les bactéries du yaourt soient vivantes dans le produit mis en vente. Certains pays néanmoins admettent qu'à la suite d'un traitement thermique destiné à améliorer la durée de conservation, le produit ne contienne plus de

bactéries vivantes. Cette pratique n'est toutefois pas recommandable, car elle modifie les propriétés du yaourt (ANONYME, 1995).

Lors de la mise en consommation, la quantité d'acide lactique libre contenue dans le yaourt ne doit pas être inférieure à 0,8g pour 100g de produit (Mahaut et al., 2000).

Les critères pris en compte par le *codex alimentarius* et la F.I.L dans la réglementation du yaourt sont les suivants :

- **Dénomination du produit:** elle varie selon les langues, mais les termes les plus utilisés sont « yoghurt », « yoghurt » ou « yaourt ».
- **Le type de produit:** il est défini souvent en fonction de teneur en matière grasse ou de l'adjonction éventuelle d'ingrédients (yoghurt partiellement écrémé ou maigre, yoghurt écrémé, le yoghurt sucré et le yoghurt nature).
- **Le type de ferment utilisé:** La dénomination « yaourt » nécessite l'utilisation obligatoire et exclusive des deux ferments caractéristiques *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* sous-espèce *bulgaricus* (Luquet et carrieu, 2005).
- **La quantité de ferment contenue dans le produit fini :** la FIL fixe la quantité de ferments vivants, égale à  $10^7$  bactéries par gramme apportés à la partie lactée jusqu'à la date limite de consommation.
- **La viabilité de la flore lactique:** flore viable pendant toute la durée de vie.
- **Ingrédients laitiers:** lait pasteurisé, congelé, écrémé, concentré, en poudre, crème et caséines...etc.
- **Ingrédients non laitiers:** une multitude d'ingrédients peut être incorporée dans le yaourt. Il peut s'agir par exemple de fruits sous différents forme (purée, jus, pulpe, sirop...etc), de céréales, de légumes ou de sucre. La quantité d'ingrédients non laitiers est fixée par le *codex alimentarius*, la FIL et la plupart des pays à moins de 30% en poids du produit fini.
- **pH :** La FIL préconise une teneur de 0,7% d'acide lactique. Cette valeur est respectée dans certains pays avec une variabilité de 0,6% à 15%. Certaines normes imposent un pH inférieur à 4,5 ou 4,6.
- **Taux de matière grasse:** Il doit être minimum, inférieur à 3% dans le cas des yaourts (nature sucre ou aromatisé) compris entre 0,5 et 3% dans le cas des yaourts partiellement écrémé et 0,5% dans les yaourts écrémés.

- **Teneur en protéines:** elle est égale à 2,8% dans le produit fini (*Luquet et Carrieu, 2005*).

En fonction de la technologie de fabrication, les yaourts sont divisés en deux groupes:

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

### **3. Les différents types de yaourt**

Il existe plusieurs variétés de yaourt qui diffèrent par leur composition chimique, leur technologie de fabrication ainsi que leur saveur.

Le tableau 06 résume les différentes catégories de yaourt.

Tableau n° 06: Différents types du yaourt et leurs caractéristiques (Vignola, 2002).

Les différents types		Caractéristiques
a) Selon la teneur en matière grasse	• Yaourt entier	MG minimum 3%.
	• Yaourt partiellement écrémé	MG moins de 3% et plus de 0,5% .
	• Yaourt écrémé	MG maximale 0,5.
b) Selon la technologie de fabrication	• Yaourt étuvé ou ferme	Ce sont des yaourts nature ou aromatisés, qui ont une texture ferme à surface lisse incubé et refroidi en pot.
	• Yaourt brassé	Il présente une texture presque fluide. Amené à une consistance crémeuse après coagulation, incubé en cuve et refroidi avant le conditionnement.
	• Yaourt à boire	Similaire au type brassé mais dont le coagulum est réduit à l'état liquide avant conditionnement.
c) Selon les additifs alimentaires	• Yaourt aromatisé	Addition d'arôme.
	• Yaourt fruité	Addition de fruit.
	• yaourt light	Addition d'édulcorant sans sucre.

#### **4. Matières utilisées pour la production du yaourt**

##### **4.1. Lait frais**

La principale matière pour la fabrication des yaourts est le lait de vache. Il est constitué d'environ 88% d'eau et de 12% de matière sèche contenant des glucides, des protéines, des lipides et des minéraux (*Amellal-Chibane, 2008*).

Le lait est un produit de forte valeur nutritionnelle. C'est l'un des rares aliments à contenir une teneur équilibrée en nutriments de base (glucides, lipides et protides). C'est aussi l'un des rares à convenir à toutes les tranches d'âge (nourrissons, enfants, adolescents, adultes, personne âgées) qui le consomment tel quel à l'état liquide (lait frais) ou sous forme de produits dérivés (fromage, yaourt, crèmes glacées...etc). Avec une valeur énergétique de l'ordre de 700Kcal/l, le lait de plusieurs espèces animales constitue une source importante et relativement bon marché d'apport quotidien en acides aminés et acides gras essentiels ainsi qu'en calcium alimentaire. Le lait est aussi riche en d'autres sels minéraux (notamment phosphore et magnésium) et en vitamines du groupe B(B1, B2, B5 et B12) et en vitamine A.

Pour répondre à ces besoins, le lait bovin est le plus utilisé dans le monde et dans notre pays. Les espèces voisines (ovin, caprin, camelin) représentent un pourcentage de production relativement faibles, n'excédant pas 10%.

##### **4.2. La poudre de lait**

L'industrie laitière en Algérie fonctionne essentiellement sur la base de matières premières importées, c'est-à-dire de la poudre de lait et de la matière grasse laitière anhydre. Sur le plan technologique, elle est fondamentalement un «processus de recombinaison» consistant en la réhydratation de poudre de lait à laquelle est associée de la matière grasse (*Amellal, 2000*).

La poudre de lait constituée essentiellement de matière sèche du lait et d'une très faible quantité d'eau (de 2 à 5%), elle a l'avantage de pouvoir se stocker et se transporter aisément pour être utilisée via la recombinaison comme matière première pour la production de fromages, de laits fermentés, de crème glacées...etc.

Les poudres commercialisées sont en réalité de trois types, classées selon l'intensité du traitement de déshydratation (et le degré de dénaturation qu'il génère) opéré. Le degré de dénaturation est exprimé par l'indice d'azote protéique en milligrammes de protéines sériques non dénaturées par gramme de poudre considérée.

Les poudres ayant été préparées avec un traitement thermique bas (low heat, égal ou supérieur à 6) contiennent une faible quantité de protéines dénaturées et sont utilisées dans des produits où les propriétés de solubilité, de gélification et d'émulsion sont recherchées. Il

s'agit des poudres de meilleure qualité convenant aussi bien à la préparation du lait de consommation que celui destiné à la fromagerie ainsi qu'à la fortification du yaourt (NOZINCK, 1982 ; MODLER, 1985).

#### 4.3. L'eau

L'eau est l'une des matières premières de tous les types des produits laitiers reconstitués et recombinaison. Elle doit être potable, de bonne qualité, dépourvue de micro-organismes et d'un niveau de dureté acceptable (Gosta, 1995).

#### 4.4. Les additifs

En outre, d'autres composés sont rajoutés au mélange afin d'améliorer les caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles ainsi que la consistance du produit fini. Ces composés comportent du sucre, arôme, épaississants... (Gosta, 1995).

Dans le cas des yaourts brassés sans matière grasse, des agents de texture (épaississants ou gélifiants) sont souvent ajoutés. Ils améliorent l'apparence, la viscosité et la consistance des yaourts. Les additifs les plus fréquemment utilisés sont : la gélatine, les alginates, les celluloses, les amidons, et les pectines (Amellal-Chibane, 2008).

Les fruits dans les yaourts sont apportés sous forme de préparations de fruits avec ou sans sucres ajoutés. Les agents de texture, incorporés dans la préparation de fruits, 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. Bactéries caractéristiques du yaourt

Les deux bactéries utilisées dans la préparation de yaourt, ont pour rôle principale d'abaisser le pH du lait au point isoélectrique de la caséine (pH 4,6) de façon à former un gel. Outre le goût acidulé qu'elles donnent au gel, elles assurent une saveur caractéristique due à la production des composés aromatiques et à la production de polysaccharides (Sodini et Beal, 2012).

#### 5.1. *Streptococcus thermophilus*

*St. thermophilus* est un cocci gram positif, anaérobie facultative, non mobile. On le trouve dans les laits fermentés et les fromages (DELLAGLIO *et al*, 1993 ; ROUSSEL *et al*, 1994). C'est une bactérie dépourvue d'antigène du groupe D, thermorésistante, sensible au bleu de méthylène (0,1%) et aux antibiotiques. Elle est aussi résistante au chauffage à 60°C pendant 30 minutes (DELLAGLIO *et al*, 1994). Elle est isolée exclusivement du lait et des produits laitiers sous forme de coques disposées en chaînes de longueurs variables ou par

pires. Sa température optimale de croissance varie entre 40 et 50°C. Son métabolisme est du type homofermentaire (LAMOUREUX, 2000).

Le rôle principal de *St. thermophilus* est la fermentation du lactose du lait en acide lactique et en plus de son pouvoir acidifiant, elle est responsable de sa texture dans les laits fermentés. Elle augmente la viscosité du lait par production de polysaccharides (Bergamairer, 2002).

### 5.2. *Lactobacillus bulgaricus*

*Lactobacillus bulgaricus* est un bacille gram +, immobile, asporulé, microaérophile (Doleyres, 2003) et thermophile. Cette bactérie possède un mécanisme strictement fermentaire avec production exclusive d'acide lactique à partir des hexoses. Sa température optimale de croissance est approximativement 42°C. Elle a un rôle essentiel dans le développement des qualités organoleptique et hygiénique du yaourt (Marty-Teysset et Garel, 2000).

*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 a un rôle essentiel dans le développement des qualités organoleptiques et hygiéniques du yaourt (MARTY-TEYSSET et al, 2000).

Ces deux bactéries lactiques tolèrent de petites quantités d'oxygène. Ceci peut être probablement relié au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui est produit dans les cellules en présence d'air. Le système le plus efficace pour éliminer le peroxyde d'hydrogène est l'utilisation d'une enzyme, la catalase, dont les bactéries lactiques sont déficientes. Ces dernières possèdent plutôt une peroxydase qui est moins efficace que la catalase. Comme les bactéries lactiques n'éliminent pas facilement le peroxyde, elles sont dites microaérophiles (DOLEYRES, 2003).

## 5.3. Intérêt et fonctions des bactéries du yaourt

### 5.3.1. 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 (SCHMIDT et al, 1994). Le métabolisme est du type homofermentaire (production exclusif de l'acide lactique).

L'acidité du yaourt est communément exprimée en degré Dornic (1°D= 0,1g/l d'acide lactique). Elle se situe entre 100 et 130°D (LOONES, 1994).

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 (*TAMIME et ROBINSON, 1999 ; SINGH et al, 2006*).

Il intervient comme inhibiteur vis-à-vis des micro-organismes indésirables (*LEORY et al, 2002*).

### 5.3.2. Activité protéolytique

pour satisfaire leurs besoins en acides aminés, les bactéries du yaourt doivent dégrader la fraction protéique du lait constituée de caséine et protéines sériques, leur système protéolytique est constitué de deux types d'enzymes distinctes : les protéases et les peptidases.

*Lb. bulgaricus* possède des protéases localisées, pour l'essentiel, au niveau de la paroi cellulaire. Cette activité protéasique permet d'hydrolyser la caséine en polypeptide.

*St. thermophilus* est considéré comme ayant une faible activité endopeptidasique. Elle dégrade les polypeptides par son activité exopeptidasique en acides aminés libres.

### 5.3.3. Activité aromatique

Divers composés volatiles et aromatiques interviennent dans la saveur et l'appétence du yaourt. C'est principalement le lactose qui intervient dans la formation de ces composés dans une fermentation de type hétérofermentaire. Parmi ceux-ci l'acide lactique confère au yaourt son goût acidulé. L'acétaldéhyde, qui provient en grande partie de la thréonine, joue un rôle essentiel dans ces caractéristiques organoleptiques recherchées. Sa production, due principalement au lactobacille, est augmentée lorsque ce dernier est en association avec le streptocoque qui en élabore de faibles quantités.

Le diacétyl contribue à donner un goût délicat qui est dû à la transformation de l'acide citrique et, secondairement, le lactose par certaines souches de streptocoques. D'autres composés (acétone, acétoïne,...etc) contribuent à l'équilibre et à la finesse de la saveur. Ceci résulte d'un choix avisé des souches, de leur capacité à produire dans un juste rapport les composés aromatiques et du maintien de ce rapport au cours de la conservation des levains et de la fabrication (*ANONYME, 1995*).

Notons que la saveur caractéristique du yaourt, due à la production du diacétyle et de l'acétaldéhyde et qui est recherchée dans les produits type «nature», est en partie masquée dans les yaourts aromatisés.

#### 5.3.4. Activité texturante

La texture et l'onctuosité constituent, pour le consommateur, d'importants éléments d'appréciation 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 (EPS) qui, selon une étude portant sur plusieurs souches serait essentiellement composé de rhamnose, arabinose et mannose (*SCHMIDT et al., 1994*).

Il est couramment admis que la production des EPS est le résultat de l'action exercée par *St. thermophilus*. Mais d'après *TAMIME (1999)*, *Lb. bulgaricus* possède une aptitude à produire des EPS composés de galactose, glucose, rhamnose à des rapports de 4/1/1.

#### 5.3.5. Comportement associatifs des deux souches

*St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* se développent en association (appelée proto-coopération) dans des cultures mixtes ayant un intérêt à la fois d'ordre technologique et nutritionnel.

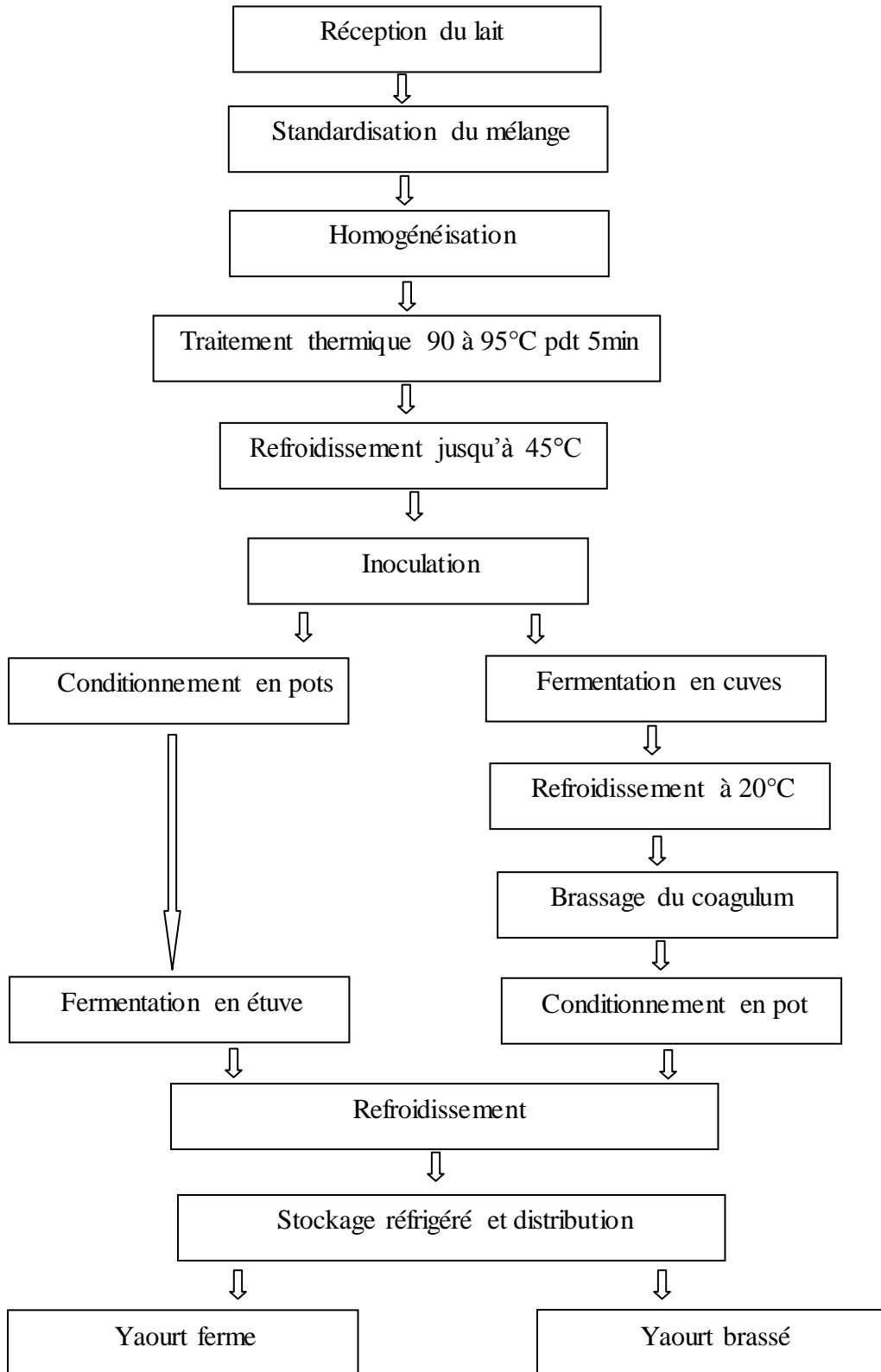
Ces deux bactéries, par leur activité acidifiante, ont un effet bénéfique du point de vue qualité hygiénique du produit. En parallèle, elles engendrent des produits secondaires qui contribuent à la qualité organoleptiques du yaourt. D'un point de vue nutritionnel, l'activité fermentaire de ces espèces lactiques favorise une solubilisation des différents constituants du lait, améliorant ainsi leur biodisponibilité (*COURTIN et al, 2002 ; NGOUNOU et al., 2003*).

### 6. Technologie du yaourt

La fabrication du yaourt, même si elle est connue depuis des temps très lointains, demeure un procédé assez complexe et en perpétuelle évolution car, il intègre à chaque fois les connaissances et les progrès réalisés dans des domaines variés tels: la biologie moléculaire et cellulaire, la chimie, la biophysique ...etc.

Les étapes de fabrication peuvent différer selon qu'on a affaire à un yaourt « étuvé » dont la fermentation se fait après conditionnement en pots et le yaourt « brassé », dont la fermentation se fait en cuve. Le coagulum obtenu dans ce dernier cas est brassé pour être rendu plus ou moins visqueux, puis conditionné en pots.

Le procédé de fabrication diffère d'un type de yaourt à un autre, et les principales étapes sont illustrées dans le diagramme 01.



**Diagramme n° 1:** Diagramme général de fabrication du yaourt ferme et du yaourt brassé (Beal et al., 2008).

### a) Réception du lait

Le lait destiné à la production de yaourt doit être d'une qualité bactériologique très élevée. Il doit avoir une faible teneur en bactéries et substances susceptibles d'empêcher le développement du levain du yaourt. Le lait ne doit pas contenir des antibiotiques et des bactériophages (*Sodini et Béal, 2012*).

Il est primordial de mettre en place dès la réception du lait ou toutes autres matières premières, des méthodes et des procédures rapides et simples permettant de détecter les anomalies et les pertes possibles de contrôle (*Amellal-Chibane, 2008*).

### b) Standardisation

Pour remédier aux variations naturelles de la composition, le lait est standardisé aux de matière grasse désiré (écrémage total ou partiel) et peut être enrichi en extrait sec laitier par addition de la poudre de lait ou les protéines laitières ou addition d'autres ingrédients comme le sucre et les arômes. Et ceci, afin de répondre aux spécifications nutritionnelles et organoleptiques du produit (*Pernoud et al., 2005*) et aussi améliorer la qualité organoleptique du yaourt.

### c) Homogénéisation

L'homogénéisation a principalement des effets sur deux composantes du lait soit, les matières grasses et les protéines:

- **Effet sur la matière grasse :** l'homogénéisation réduit la taille des globules gras et empêche la séparation entre le gras et le reste du mélange évitant ainsi la remontée de la crème à la surface durant la fermentation (*Lamontagne, 2002*).
- **Effet sur les protéines :** cette opération augmente également la viscosité du lait et par conséquent, celle du yaourt en lui conférant une meilleure stabilité des protéines et réduisant l'exsudation du sérum lors du stockage.

Enfin, l'homogénéisation confère un aspect plus blanc au produit fini (*Pernoud et al., 2005*). pour des raisons hygiéniques et pour éviter une recontamination du lait, l'étape d'homogénéisation est généralement positionnée avant le traitement thermique du mix ou au cours de sa montée en température vers 64°-70°C (*Lamontagne, 2002; Sodini et Béal, 2012*).

#### d) Traitement thermique

Une fois la préparation du lait terminée, celui-ci est soumise à un traitement thermique de pasteurisation (90°C à 95°C pendant 3 à 5 min). Ce traitement permet de créer des conditions favorables au développement des bactéries lactiques, détruire les bactéries pathogènes et indésirables, et inactiver les inhibiteurs de croissance (*Paci kora, 2004 ; Jeantet et al., 2008*).

Le traitement thermique a également un effet sur la conformation tridimensionnelle des protéines, induisant la modification de leurs propriétés fonctionnelles. Il dénature la majorité des protéines du lactosérum (85%) qui se fixent ainsi sur les molécules de caséines. En fin, il modifie les équilibres salins, en entraînant une augmentation de la taille des micelles de caséines, de leur stabilité et de la qualité de l'eau liée (*Mahaut et al., 2000*).

#### e) Fermentation lactique

Le lait, enrichi et traité thermiquement, est refroidi à la température de fermentation 40-45°C. Cette température correspond à l'optimum de développement symbiotique des bactéries lactiques (*Loones, 1994*). Leur inoculation se fait à un taux assez élevé, variant de 1 à 7%, pour un ensemencement indirect à partir d'un levain avec un ratio *Streptococcus thermophilus/ Lactobacillus bulgaricus* de 1,2 à 2 pour les yaourts naturels, et pouvant atteindre 10 pour les yaourts aux fruits (*Mahaut et al., 2000*).

L'ensemencement direct à partir de bactéries lactiques concentrées congelées se fait à deux taux de l'ordre de 0,003%. Une bonne agitation est nécessaire pour rendre parfaitement homogène le mélange lait/ferment.

Le lait ainsiensemencé est amené à une température généralement voisine de 45°C par un passage à travers des réchauffeurs à plaques. La température optimale de développement du streptocoque est de 42-45°C, celle du lactobacille de 47-50°C. Selon les régions, les consommateurs préfèrent des yaourts plus ou moins acides et plus ou moins aromatique. Les caractères recherchés dépendent des souches utilisées et de la température d'incubation. L'abaissement de celle-ci de 1 à 3°C (42-44°C), favorise le développement du streptocoque et donc la production d'arôme. L'augmentation légère (45-46°C), favorise le lactobacille donc la production d'acides (*Enkelejda, 2004*).

## **f. Conditionnement et stockage**

L'ajout éventuel des fruits intervient avant le conditionnement. Enfin, les yaourts, conditionnés dans des pots en verre ou en plastique, sont stockés en chambre froide à 4°C. A ce stade, ils sont prêts à être consommés. La durée limite de leur consommation est de 28 jours (**Paci kora, 2004; Luquet et Carrieu, 2005**).

Pendant le stockage, les bactéries lactiques maintiennent une activité réduite. Cette évolution, appelée post-acidification, se traduit par une légère baisse du pH, surtout pendant les 2 premiers jours de stockage (**Amellal-Chibane, 2008**).

## **7. Qualité du yaourt**

### **7.1. Paramètres physico-chimiques**

#### **7.1.1. pH et taux d'acide lactique**

La Fédération Internationale du lait (F.I.L), préconise une teneur de 0,7% d'acide lactique. Cette valeur est respectée dans certains pays avec une variabilité allant de 0,6 à 1,5%. Certaines normes imposent un pH inférieur à 4,5 ou 4,6 (**Luquet et Carrieu, 2005**).

La réglementation Algérienne exige que, lors de la mise en consommation, la quantité d'acide lactique libre contenu dans le yaourt ne doit pas être inférieure 0,8g pour 1000g de produit. Selon l'article (02) de l'arrêté interministériel du 07 Octobre 1998, qui apprécie la spécification technique des yaourts (**JORA, n° 86**).

#### **7.1.2. Taux de matière grasse (MG)**

Il doit être au minimum inférieur à 3% dans le cas des yaourts (nature, sucré ou aromatisé), compris entre 0,5 et 3% dans le cas des yaourts partiellement écrémés et 0,5% dans les yaourts écrémés (**Ozer et al., 1998**).

#### **7.1.3. Extrait sec totale (EST)**

La matière sèche est la fraction massique des substances restantes après dessiccation complète de l'échantillon. Elle est exprimée en pourcentage ou en g/l (**Nongonierma et al., 2006**).

### **7.2. Paramètres microbiologiques**

Selon la norme nationale de 1998, n°35 parue au journal officiel, les yaourts ne doivent contenir aucun germe pathogène.

Le traitement thermique appliqué sur le lait avant la 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 indésirables.

Les levures et les moisissures peuvent 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*).

Les critères microbiologiques sont illustrés dans le tableau ci-dessous

**Tableau n° 07 : Critères microbiologiques du yaourt (*J.O.R.A, 1998*).**

Yaourt	N	C	M
Coliformes totaux	5	2	10
Coliformes fécaux	5	2	1
<i>St.aureus</i>	5	2	10
Levures	5	2	≤10 <sup>2</sup>
Moisissures	5	0	Absence
<i>Salmonella</i>	5	0	Absence

**N:** Nombre d'unités composant l'échantillon. **C:** Nombre d'unités de l'échantillon donnant des valeurs situées entre m et M. **m:** Le seuil au dessous duquel le produit est considéré comme étant de qualité satisfaisante. **M:** Seuil limite d'acceptabilité au delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants, sans pour autant que le produit soit considéré comme toxique.

### 7.3. Qualité organoleptique

#### 7.3.1. Gélification acide

Les structures principales impliquées lors de la gélification acide du lait sont les micelles de caséines. Lors de la baisse du pH, due à la fermentation lactique, les micelles de caséines subissent des changements substantiels. Le déplacement de l'équilibre acido-basique entraîne une diminution progressive de la charge ionique des micelles qui devient nulle. EN parallèle, une solubilisation du phosphate de calcium micellaire est observée, entraînant la structure micellaire. La gélification du lait dépend de la température et des prétraitements thermiques (*TAMIME et ROBINSON, 1985*).

Les études réalisés sur les microstructure du gel ainsi formé montrent que celle-ci dépend de plusieurs facteurs dont la concentration en matière sèche (*SCHKODA et al., 1998 ; VAN MARLE, 1998*), La méthode d'enrichissement du lait (*TAMIME et al, 1984*), le traitement thermique subi (*KESSLER, 1998*) et enfin, la nature des souches bactériennes

utilisées et de leur capacité à synthétiser des polysaccharides exocellulaires (EPS) capables d'augmenter la viscosité du gel (*HASSAN et al., 1995*).

Ainsi, les travaux de *KESSLER (1998)* montrent que les micelles de caséines issues d'un yaourt fabriqué à partir de lait chauffé forment des chaînes bien liées entre elles, tandis qu'elles forment des agrégats dans un yaourt fabriqué à partir du lait non chauffé. Cette différence est essentiellement due au comportement de la  $\beta$ -Lactoglobuline (protéine sérique majoritaire) qui a la propriété de former un complexe protéique avec la caséine kappa (*DALGLEISH, 1990*).

### 7.3.2. Comportement rhéologique

La transformation du lait en yaourt s'accompagne aussi d'un changement des propriétés rhéologiques 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 (*PACIKORA, 2004*).

## 8. Intérêts nutritionnels et thérapeutiques

Les produits laitiers fermentés sont largement consommés et présentent des caractéristiques nutritionnelles et probiotiques bien spécifiques (*Serra et al., 2009 ; Sodini et Béal, 2012*).

### 8.1. Intérêts nutritionnels

Un pot de yaourt nature possède la même valeur nutritive qu'un verre de lait (*Jeanet et al., 2008*).

Au cours de la fermentation, la composition du lait subit un certain nombre de modifications, dont certaines font que le produit soit de meilleure valeur nutritionnelle et thérapeutique (*Serra et al., 2009 ; Sodini et Béal, 2012*) à savoir:

- **Amélioration de l'absorption du lactose**

La présence des bactéries vivantes dans le yaourt permet une meilleure assimilation du lactose chez les personnes déficientes en lactase (*Jeanet et al., 2008*).

- **Amélioration de la digestibilité de la matière grasse**

Bien que l'activité lipolytique soit faible, une augmentation significative en acides gras libres dans un yaourt est constatée (*Jeanet et al., 2008*).

- **Amélioration de la digestibilité des protéines**

Le yaourt est deux fois plus digeste que le lait et contient deux fois plus d'acides aminés libres. Cette propriété résulte du traitement thermique et de l'activité protéolytique des bactéries (*Jeantet et al., 2008*).

## 8.2. Effets thérapeutiques

- **L'activité antimicrobienne**

Le yaourt joue un rôle important dans la prévention contre les infections gastro-intestinales, son intérêt dans le traitement contre les diarrhées infantiles, à été démontré par (*Lucas et al., 2004*). Les bactéries du yaourt produisent des substances antimicrobiennes et des probiotiques (*Jeantet et al., 2008*). Leur pouvoir antagoniste résulte aussi de la production du peroxyde d'hydrogène et de bactériocines, limitant la croissance de certains germes pathogène (*Tabak et Bensoltane, 2011*).

- **Activité anti-cholestérolémiante**

La consommation de yaourt permet de prévenir les maladies coronariennes et serait plus efficace que le lait, pour maintenir une cholestérolémie basse (*Jeantet et al., 2008*).

- **Stimulation de système immunitaire**

Le yaourt a un effet immunitaire régulateur, qui permet d'augmenter la production d'interférons et d'immunoglobulines et d'exciter l'activité des lymphocytes B. Cet effet est attribué à *Lactobacillus bulgaricus* (*Jeantet et al., 2008*).

- **Action sur les vitamines**

Certaines vitamines sont utilisées par les bactéries (vitamine B12), d'autres en sont produites (acide folique) (*Martin, 2004*).

## IV. Matériels et méthodes

### 1. Matériels

#### 1.1. Site et conditions d'échantillonnage

Le matériel végétal utilisé est composé d'écorces de grenade (*Punica granatum*). Les fruits de grenade ont été récoltés en mois de novembre 2018 à la région d'Aïn El Arbaa de la wilaya d'Aïn Témouchent, située dans le Nord Ouest du territoire national, elle est située au carrefour de trois grandes villes (Oran, Tlemcen et Sidi Bel Abbès) à une centaine de Kilomètres de la frontière marocaine.



**Figure n° 07:** Carte géographique de la zone d'Aïn Arbaa-Aïn Témouchent

Les écorces ont récupérées, puis nettoyées et séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité durant 4 mois. Le séchage étant le moyen de conservation le plus simple, sa durée dépend de la teneur en eau dans le végétal, ainsi que la température ambiante.

Les écorces ont été par la suite, mises à sécher pendant 7 jours à l'étuve à une température relativement stable de 35°C. Cette partie végétative a été, ensuite, finement broyées à l'aide d'un mortier en porcelaine, suivi par un passage dans un broyeur électrique. Le broyage a permis de rompre les membranes cellulaires et la matrice extracellulaire et de libérer, en même temps les organites et les molécules contenues dans la cellule. Sous cette forme, la drogue présente une plus grande surface de contact avec le solvant extracteur et permet ainsi d'améliorer le rendement des extractions (*Gaucher et Lussan, 2001*). Pour son

utilisation ultérieure, la poudre d'écorces de grenade a été conservée à l'obscurité dans des bocaux hermétiquement fermés et cela pour empêcher l'oxydation. Les précautions prises visent à réduire les divers mécanismes de dégradation relatifs aux caractères organiques de ses matières premières (*Ferrari, 2002*).



**Figure n° 08:** L'échantillon avant le séchage.



**Figure n° 09 :** L'échantillon après séchage.

## 1.2. Appareillages

Les différents appareils utilisés sont :

Balance de précision (KERN AES 200-4N), étuve (Memmert), évaporateur rotatif (rotavapor, "Büchi"), spectrophotomètre UV-visible (Jenway), vortex (Nahita), lyophilisateur (Martin-Chris), bain marie, réfrigérateur, pH mètre, viscosimètre.

### 1.3. Produits chimiques

Les produits utilisés sont :

#### Etude biochimique

Ethanol 70%, Méthanol 80%, Acétone, Acide gallique (AG), réactif de Folin-Ciocalteu (FCR), carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), acide ascorbique.

#### Etude microbiologique

Souches lactiques lyophilisées pures (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*), Gélose de Man, Rogosa, Sharpe (MRS), Gélose M17, eau physiologique, phénoptaléine, Hydroxyde de sodium NaOH préparée à 1/9 N.

## 2. Méthodes

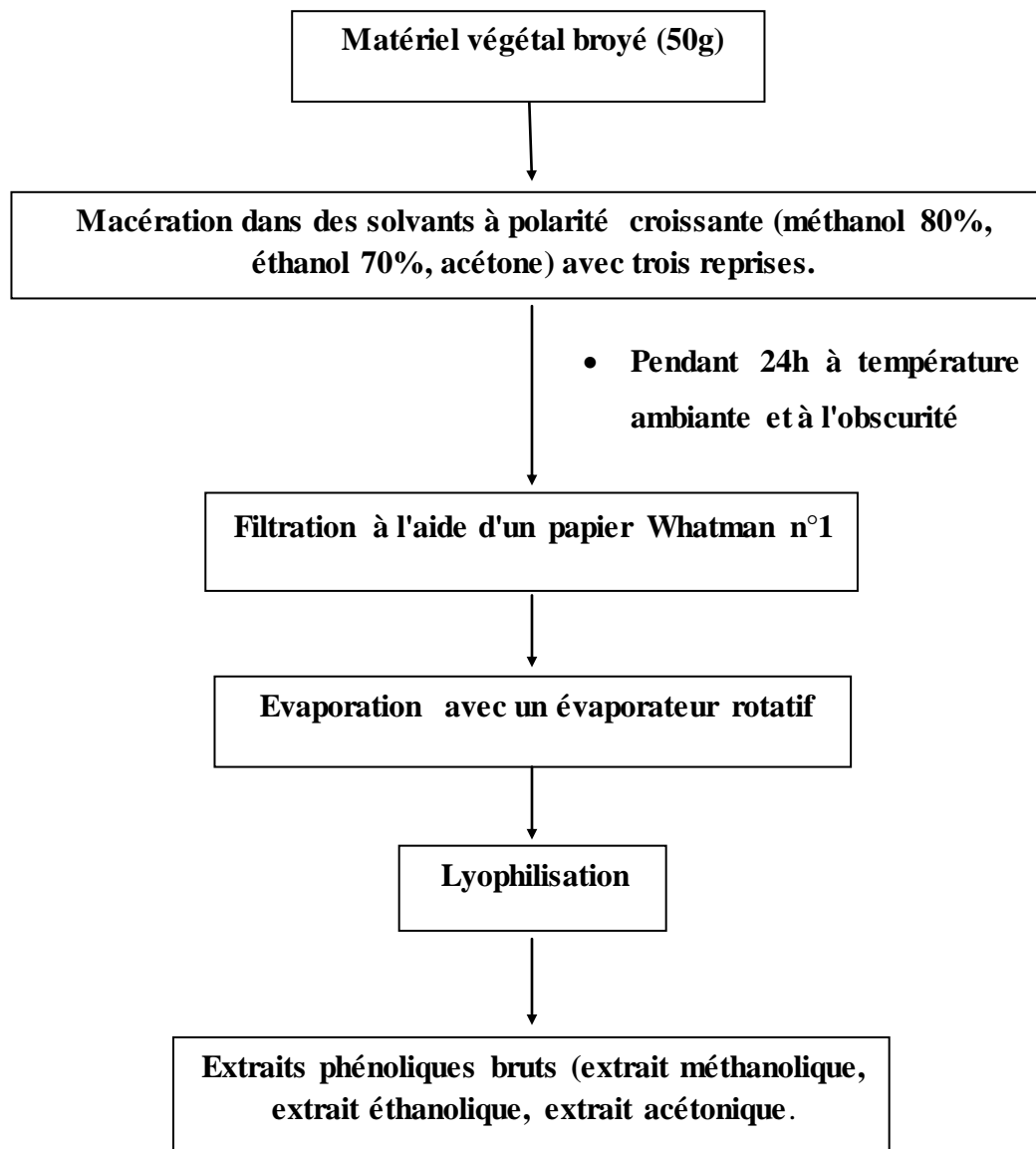
### a) Etude biochimique

#### 2.1. Préparation des extraits

Cette extraction est basée sur le degré de la solubilité des composés phénoliques dans les solvants organiques. La méthode faite sur la poudre des écorces de grenade, correspond à une macération à froid, suivie d'une évaporation et une lyophilisation.

##### 2.1.1. Extraction des polyphénols totaux (macération)

La poudre de l'écorce de grenade finement broyé (50g) a été soumis à une extraction par macération dans un récipient sombre dans 175 ml de solvant (extraction alcoolique solide-liquide), cette macération a été réalisée en utilisant une série de solvants à polarité croissante (méthanol 80%, éthanol 70%, acétone), et refaite trois fois successifs à une température ambiante et à l'obscurité avec renouvellement de solvant chaque 24 heures. Elle a pour but une meilleure extraction des composés phénoliques. Après avoir mélangé et filtrer les trois macéras à l'aide d'un papier Whatman n°1, le solvant a été évaporé en utilisant un évaporateur rotatif (Rotavapor, Büchi) à une température de 40°C (éliminer le solvant et concentrer l'extrait). Enfin, l'extrait méthanolique brut, l'extrait éthanolique brut et l'extrait acétonique brut ainsi obtenus ont été lyophilisés à l'aide d'un lyophilisateur (Martin-Chris) afin d'obtenir des extraits secs. Les lyophilisats ont été pesés pour calculer le rendement de l'extraction, exprimé en gramme de lyophilisat par 50g de matière sèche.



**Diagramme n° 2:** Extraction des polyphénols totaux par macération.

## 2.2. Etude quantitative

### 2.2.1. Rendement des extraits

Les rendements des fractions des extraits des écorces de grenade (extrait méthanolique, extrait éthanolique, extrait acétonique) ont été calculés selon la formule :

$$\text{Rdt (\%)} = (P1-P2)/P3*100$$

**p1** : Poids du ballon après lyophilisation.

**P2** : Poids du ballon avant lyophilisation (ballon vide).

**P3** : poids de la matière végétale de départ.

### 2.2.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été fait selon la méthode de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé (*Boizot et Charpentier, 2006*).

La teneur des polyphénols contenus dans les extraits des écorces de grenade a été déterminée suivant la méthode décrite par *Miliauskas et al. (2004)*. Cette méthode consiste à mélanger un volume de 1 ml d'extrait (0,5 mg/ml) avec 5 ml de Folin-Ciocalteu (2M) dilués 10 fois. Après 5 minutes d'incubation, 4 ml de carbonate de sodium à concentration de 75g/l ont été additionnés. Parallèlement, dans les mêmes conditions, un étalon a été réalisé avec des concentrations croissantes d'acide gallique (standard) allant de 0 à 100 µg/l. Après une heure d'incubation à la température ambiante, l'absorbance a été lue à 765 nm contre un blanc (eau distillée) à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Jenway 6715). Les teneurs en polyphénols totaux ont été exprimées en milligramme équivalent standard (acide gallique) par gramme d'extrait "lyophilisat" (mg EAG/g). Toutes les mesures ont été réalisées en triplicata.

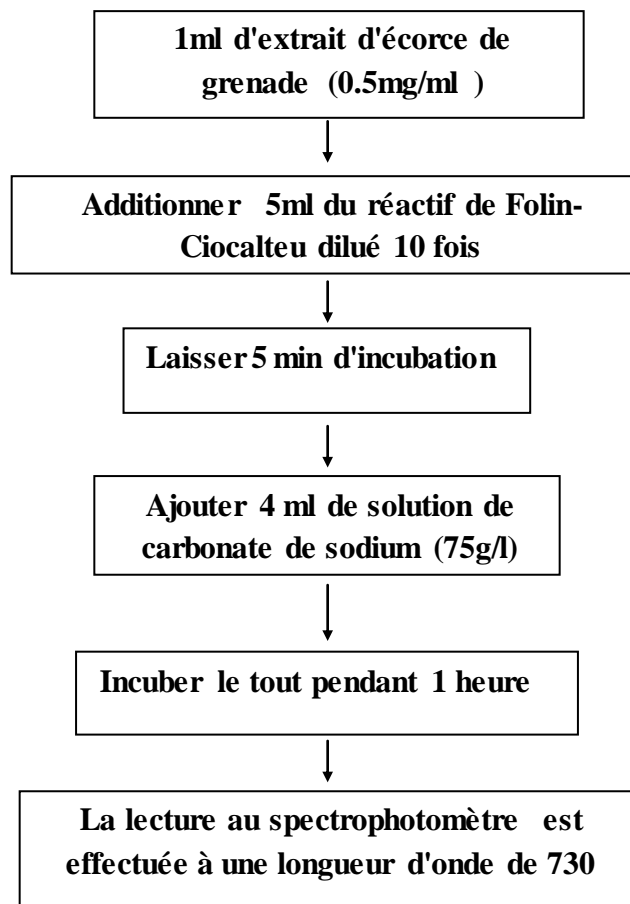


Diagramme n° 3: Dosage des polyphénols totaux.

### 2.2.3. Mesure de l'activité antioxydante

- L'activité anti-radicalaire des composés phénoliques contenus dans les extraits préparés a été évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical libre DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl). Sa couleur violette foncée se transforme en jaune lors de sa réduction (capté par les produits testés) (Zeghad, 2009).

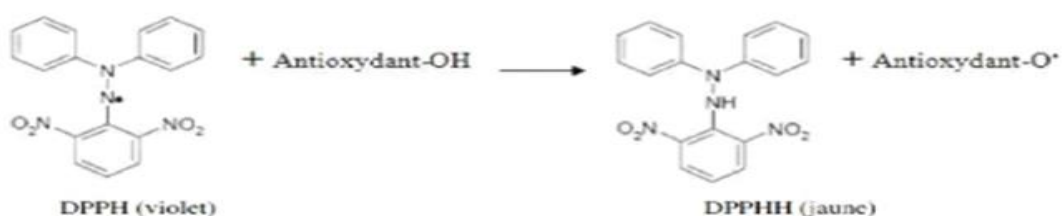


Figure n°10 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

L'effet de chaque extrait sur le DPPH a été mesuré par la procédure décrite par *Zuraini et al. (2008)*.

Une prise de 5 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004%) a été ajoutée à 50 µl d'extrait à une concentration de 2mg/ml (retenue après des essais préliminaires). Après une période d'incubation de 30 minutes à la température de laboratoire, l'absorption a été lue à 517 nm. L'acide ascorbique à des concentrations allant de 0 à 1 mg/ml a servi pour tracer la courbe d'étalonnage.

Le pourcentage de piégeage du radical DPPH est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{Inhibition} = [(A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) / A \text{ blanc}] \times 100$$

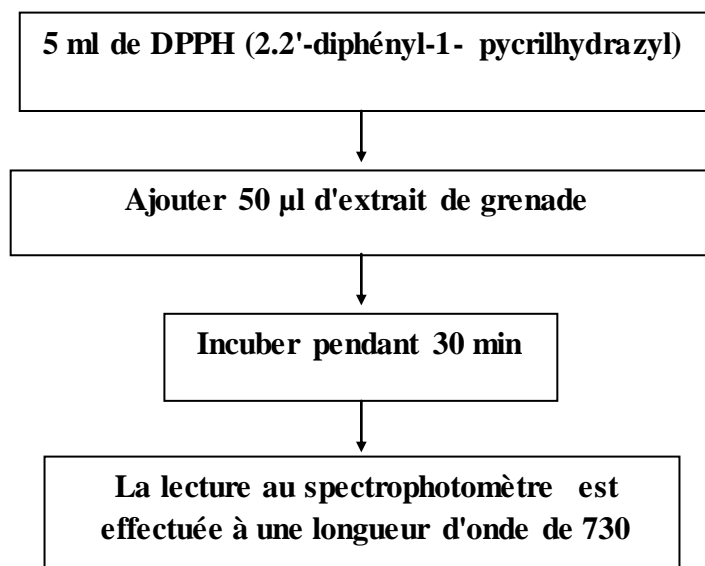
où :

**A blanc** : Absorbance du blanc (absorbance de la solution en absence de molécules testées).

**A échantillon** : Absorbance de la solution en présence de molécules testées.

- **Détermination des IC50**

La valeur IC50 ou concentration d'inhibition 50 est la concentration du substrat qui assure la réduction de 50% de l'activité du DPPH déterminée graphiquement (*Samarth et al., 2008*).



**Diagramme n°4:** Mesure de l'activité antioxydante.

### 3. Essai de fabrication d'un lait fermenté alicament enrichi d'extrait d'écorces de grenade (*Punica granatum*)

#### 3.1. Protocole expérimental

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

Les extraits purs aux solvants à différentes polarités de la plante (*Punica granatum*) sont incorporées au cours du process de fabrication d'un lait fermenté type yaourt étuvé (directement dans le lait cru pasteurisé refroidi et maintenu chauffé à 45 °C) à des taux variables de 0, 2, 4 et 6%, respectivement.

Les échantillons de lait enrichis d'extrait d'écorces de grenade 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* (St) sur *Lactobacillus bulgaricus* (Lb) 2St/1Lb (v/v). Aucun additif pouvant masquer les caractéristiques organoleptiques et rhéologiques n'est ajouté aux produits transformés (ni saccharose, ni arôme, ni autre additif).

Chaque concentration d'extrait étudié est représenté par un nombre de répétitions de trois pots d'une capacité de 100 ml de produits finis; soit un nombre total de 15 échantillons expérimentaux.

#### 3.2. Préparation des levains

Un litre de lait servant à la préparation du ferment a été préparé à un taux de 130g/l de poudre de lait «écrémé», qui subie une pasteurisation durant 2 minutes à 100°C, suivi d'un refroidissement à 45°C.

Ce lait a été réparti en deux échantillons de 500 et 250 ml. Le premier a étéensemencé avec 0,5 g d'une prise de la souche lactique lyophilisée pure de *Streptococcus thermophilus*. Le second échantillon a étéensemencé avec 0,25 g de la souche pure de *Lactobacillus bulgaricus*. Ces deux échantillons après ensemencement, ont été mélangés ensemble dans un bécher et étuvés à 45°C pendant 1 heure.

Ce levain prés a l'emploi avec un rapport de souches de 2 *Streptococcus thermophilus* pour 1 *Lactobacillus bulgaricus* (2S/1L, v/v) sera 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 cru pasteurisé enrichi d'extrait d'écorces de grenade et maintenu durant environ 3 heures à 45°C).

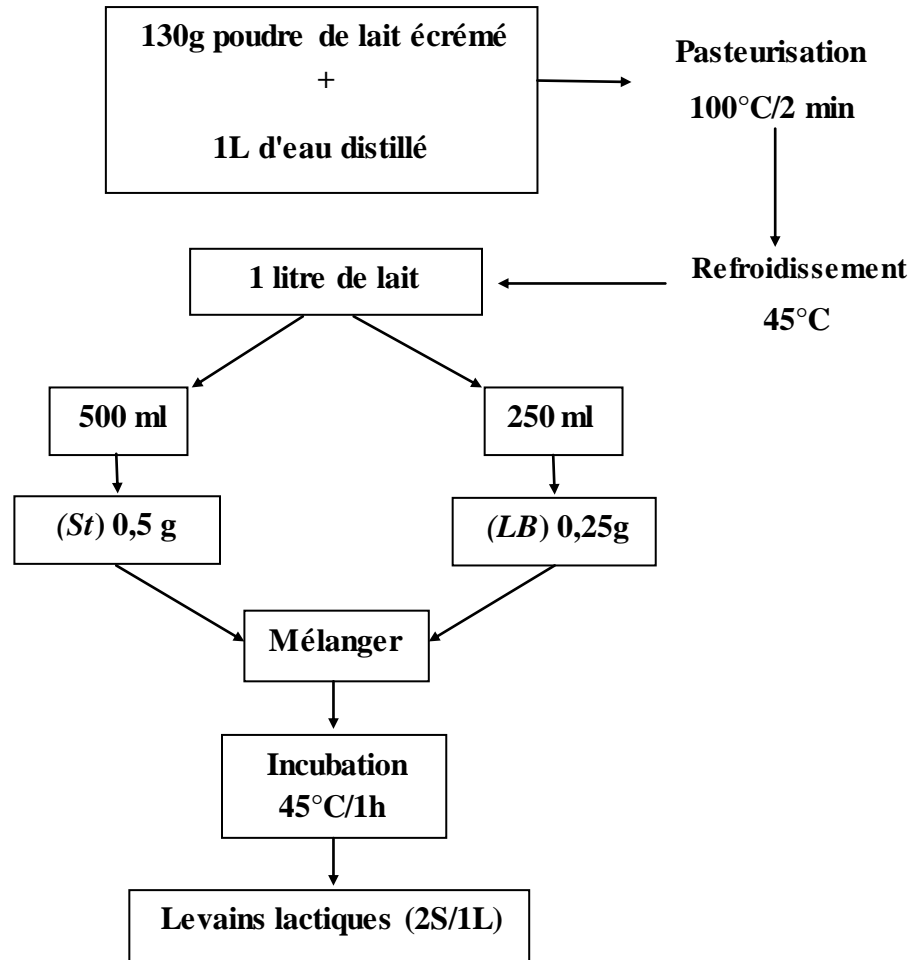
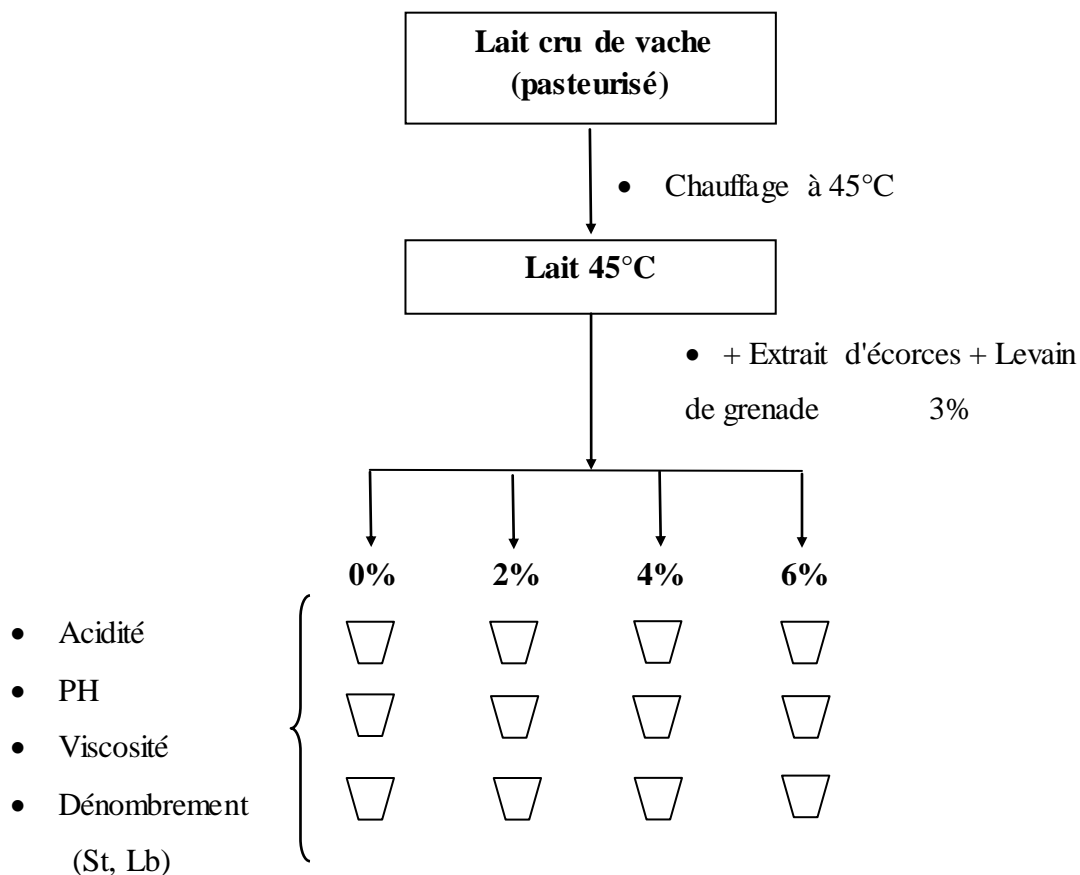


Diagramme n° 5: Préparation des levains lactiques.

### 3.3. Technologie de fabrication des laits fermentés expérimentaux

Le lait utilisé dans l'étude est un lait cru de vache pasteurisé conservé au froid à 4°C. Après un léger chauffage à 45°C, à des prises (de 03 X 100ml) d'échantillons de lait maintenus à cette température, sont additionnés chaque extrait de l'écorces de grenade (*Punica granatum*) obtenu selon le type de solvant utilisé (méthanol) lors de l'extraction à raison de 0, 2, 4 et 6% respectivement. Les échantillons sont enfin,ensemencés à raison de 3% du levain lactique préparé. Les pots des différentes préparations sont par la suite recouverts par du papier aluminium pour être destinés à la fermentation pendant 4 heures dans une étuve réglée à 45°C.

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



**Diagramme n°06:** Technologie de fabrication des laits fermentés expérimentaux.

#### 4. Mesure et contrôle sur les laits fermentés

Les analyses expérimentales seront réalisées en triples essais, dans chaque pot de lait fermenté et pour chaque traitement effectué.

##### 4.1. Paramètres physicochimiques

###### 4.1.1. Acidité

L'acidité sera déterminée d'une façon précise par titration de 10 ml 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.

###### 4.1.2. pH

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

### 4.1.3. Viscosité dynamique

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

## 4.2 Analyses microbiologiques

- *Streptococcus thermophilus* : Le dénombrement des germes sera réalisé par culture d'une prise de dilution sur un milieu de culture sélectif « M17 » incubé à 37°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 30°C pendant 48h.

## V. Résultats et discussion

### 1. Etude physicochimique

#### 1.1. Extraction des polyphénols totaux

##### 1.1.1. Le rendement

Après extraction et récupération, différents extraits ont été obtenus successivement. Il s'agit de l'extrait méthanolique, l'extrait éthanolique et l'extrait acétonique sous forme de poudre.

Le rendement, la couleur et l'aspect physique de chaque extrait sont illustrés dans le tableau 08. Les rendements (%) sont déterminés par rapport à 50 grammes de broyat.

**Tableau n° 08** : Tableau récapitulatif regroupant le rendement, la couleur et l'aspect physique des divers extraits à partir des écorces de fruit du *Punica granatum L.*

Extrait	Aspect physique	Couleur	Rendement (%)
Méthanol	Poudre	Marron caramel	50.14%
Ethanol	Poudre	Marron caramel	50.64%
Acétone	Poudre	Marron caramel	54.44%

Le rendement désigne la masse de l'extrait lyophilisé, il est exprimé en pourcentage par rapport à 50g de matière sèche. D'après, les rendements en extrait obtenus des écorces de fruit de *Punica granatum L.*, varient entre 50.14 et 54.44%. L'extrait acétonique présente un rendement élevé soit un taux de l'ordre de 54.44% MS par rapport au poids du broyat (50g), suivi par l'extrait éthanolique avec un taux de 50.64 MS. Cependant l'extrait méthanolique présente une valeur proche de celle de l'extrait éthanolique se chiffrant ainsi à 50.14%.

Le rendement dépend de plusieurs paramètres tels que les conditions de séchage de la plante, le broyage, la polarité des solvants et la nature des composés à extraire, le temps d'extraction et la qualité de solvant, la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (*Bourgou, 2016*).

Le méthanol est le solvant le plus employé afin d'obtenir des extraits riches en polyphénols totaux (*Escribano-Bailón et Santos-Buelga, 2003*).

La méthode d'extraction affecte également tout le contenu total en phénols et flavonoïdes et l'activité antioxydante (Lee et al., 2003).

### 1. 2. Analyses des extraits des écorces de grenade (*Punica granatum L.*)

La teneur en polyphénols totaux des différents extraits obtenus à partir des écorces de fruit de *Punica granatum L.*, a été estimée par des dosages spectrophotométriques, en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

La raison principale pour le choix des polyphénols totaux réside dans leurs propriétés antioxydantes plus importantes (Haleng et al., 2007), ainsi qu'à leur large utilisation en phytothérapie (Hennebelle et al., 2004).

L'analyse quantitative des polyphénols totaux est déterminée à partir d'équation de la régression linéaire ( $y = 0.012x$ ) et le coefficient de corrélation ( $R^2 = 99.3\%$ ) de courbe d'étalonnage exprimée en mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait "lyophilisat" (mg EaG/g) (figure 11).

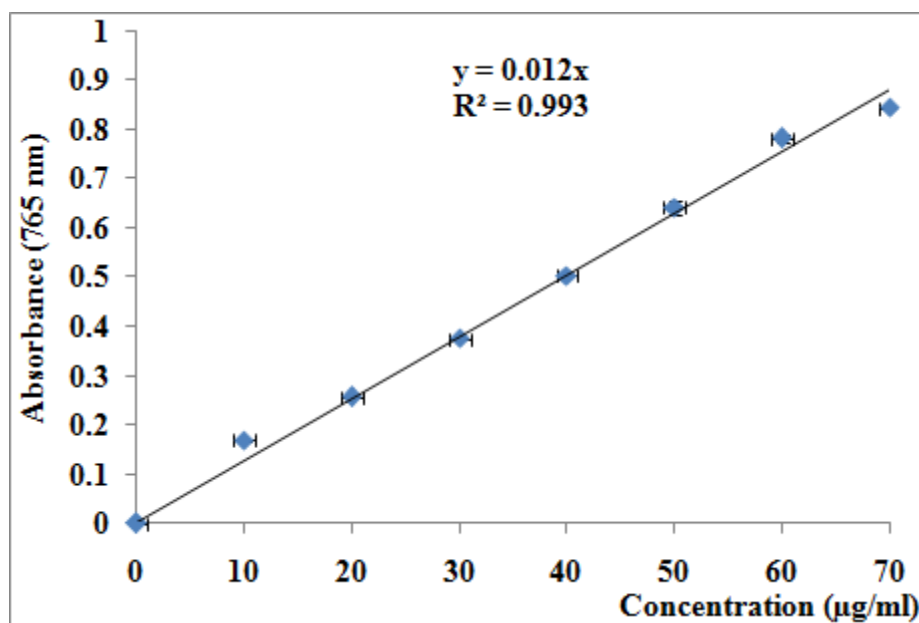
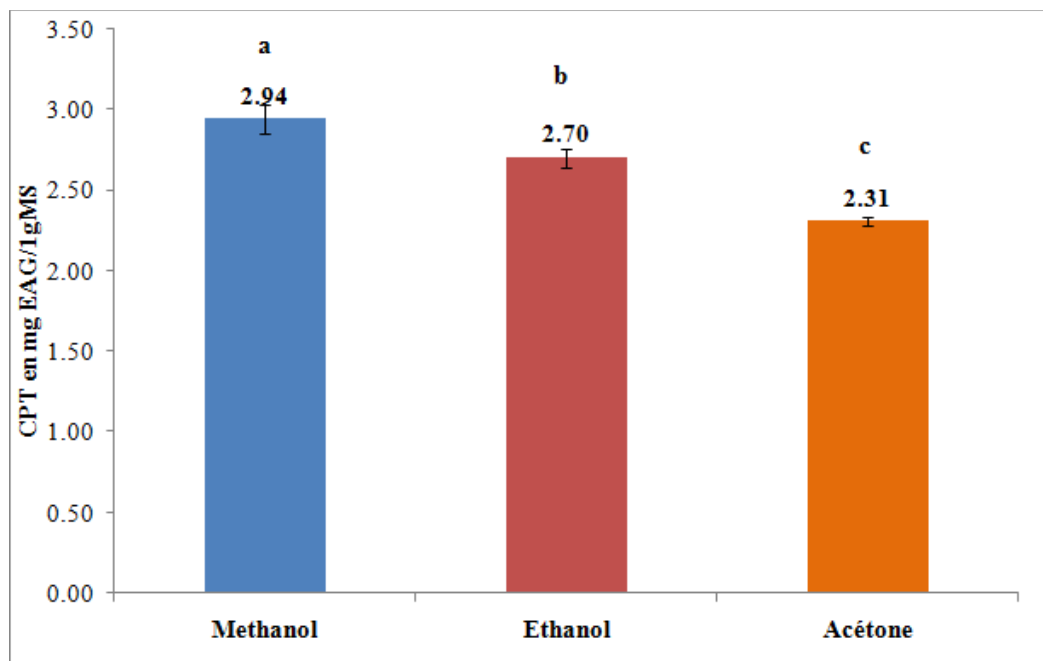


Figure n° 11 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux révèlent la richesse de l'extrait méthanolique en composés phénoliques totaux avec un taux estimé à  $2.940 \pm 0.087g$  EAG/g lyophilisé. De même, l'extrait éthanolique a également montré un contenu élevé,

suivie de l'extrait acétonique, soit des teneurs de l'ordre de  $2.699 \pm 0.057$ g EAG/g et  $2.306 \pm 0.026$ g EAG/g lyophilisé respectivement.



**Figure n° 12 :** Teneurs en polyphénols totaux des extraits de l'écorce de *Punica granatum* L.

La diversité structurale des composés phénoliques est responsable de la grande variabilité des propriétés physicochimiques influençant l'extraction des polyphénols (*Koffi et al., 2010*).

Entre autre, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé (*Garcia-Salas et al., 2010; Jokic et al., 2010*). Alors les différences teneurs en polyphénols totaux obtenus peuvent être attribuées aux différences de composition qualitative et quantitative en polyphénols totaux.

Toute fois il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études.

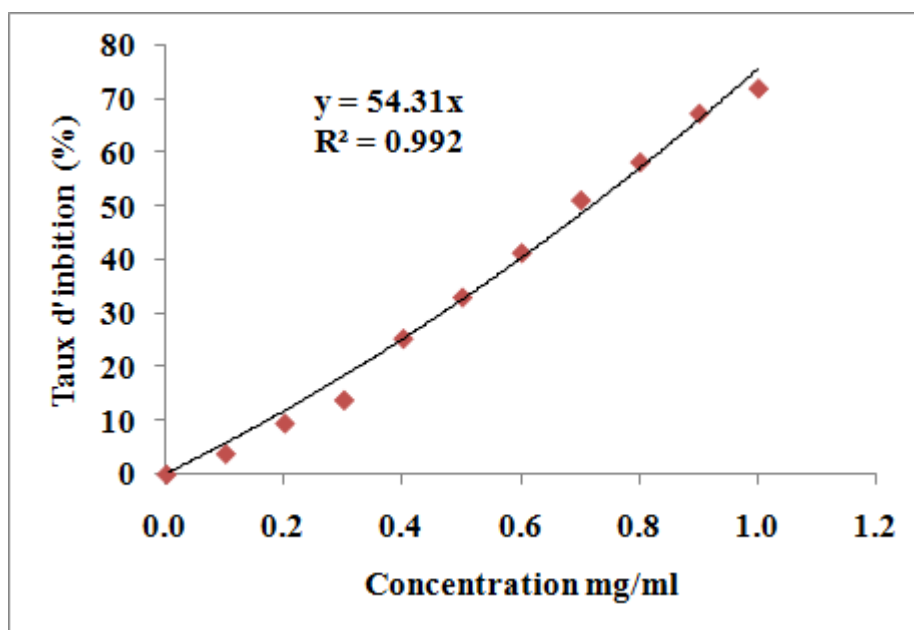
Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques. Des études ont montré que les facteurs extrinsèques tels que des facteurs géographiques, climatiques et les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation du plant et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (*Fiorucci, 2006*).

### 1. 3. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des trois extraits a été évaluée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, dans le but de déterminer la concentration de l'antioxydant permettant d'inhiber la moitié du radical. Cette méthode s'accompagne par le passage du radical DPPH de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm (**Prakash et al., 2007**).

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C) (**Alyafi, 2007**).

Une droite d'étalonnage a été établie en tenant compte des différentes solutions d'acide ascorbique (Vit C) préparées et leurs densités optiques correspondantes, avec  $R^2 = 99.20\%$  (figure 13). Les taux d'inhibition ont été calculés pour chacune des concentrations, en se basant sur les densités optiques obtenues à partir des préparations (les différents extraits et Vit C).



**Figure n° 13 :** Courbe étalon de l'activité antioxydante de l'acide ascorbique.

Les courbes de régression (figures 14, 15 et 16) montrent que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits de la plante étudiée jusqu'à un niveau maximal (**Motalleb et al., 2005**).

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée par le calcul de la valeur IC<sub>50</sub>, qui indique la concentration nécessaire de l'extrait qui inhibe 50% du radical libre DPPH. Il est à noter que plus la concentration de l'extrait est petite plus l'extrait est un bon antioxydant.

La valeur d'IC<sub>50</sub> est liée à la capacité antioxydante d'un composé, plus IC<sub>50</sub> est faible plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée (*Villaño et al., 2007*).

Les résultats relatifs à ce test sont consignés dans le tableau 09. Parmi les trois extraits, celui du méthanol présente la meilleure activité inhibitrice de radicale DPPH. C'est ainsi que le maxima d'inhibition se chiffre, à  $93.020 \pm 0.535$  % pour la dose de 2mg/ml. Ce constat se confirme également par les valeurs des IC<sub>50</sub> déterminées. L'extrait méthanolique a présenté donc l'activité antioxydante la plus importante à 0.68mg/ml. En revanche, les taux d'inhibition diminuent dans les extraits éthanolique et celui d'acétone avec des taux respectifs de  $91,558 \pm 0,718$  et  $91,451 \pm 0,476$  %, obtenus à raison de 2mg/ml. De même, les doses inhibitrices 50% (IC<sub>50</sub>) sont plus importantes que celle d'extrait méthanolique soient 0,7473 et 0,817 mg/ml respectivement.

Par comparaison des extraits étudiés, l'acide ascorbique se montre similairement actif vis-à-vis du radical DPPH avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de  $0,714 \pm 0,004$ mg/ml. Le taux d'inhibition maximum de  $72,077 \pm 1,350$ % a été atteint lorsque l'acide ascorbique a été additionné à raison de 1 mg/ml.

Dans cette partie, il est important d'établir une relation pouvant exister entre la présence des composés phénoliques et l'activité antioxydante. En effet les résultats de cette régression indiquent une relation positive entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante des différents extraits des écorces de fruit de *Punica granatum*. Les résultats de cette expérience obtenus révèlent que les extraits de ce fruit possèdent une activité antioxydante importante, qu'on attribue à ses richesses en composés phénoliques. En effet les travaux réalisés par *Kang et al., (2003)* ont suggéré que les molécules polaires polyphénoliques présentes dans l'extrait végétal contribuent à l'augmentation de l'activité antiradicalaire, et ceux de *Seeram et al., (2006)* ont démontré que les tiges et l'écorce du grenadier possèdent des propriétés antioxydantes très importantes.

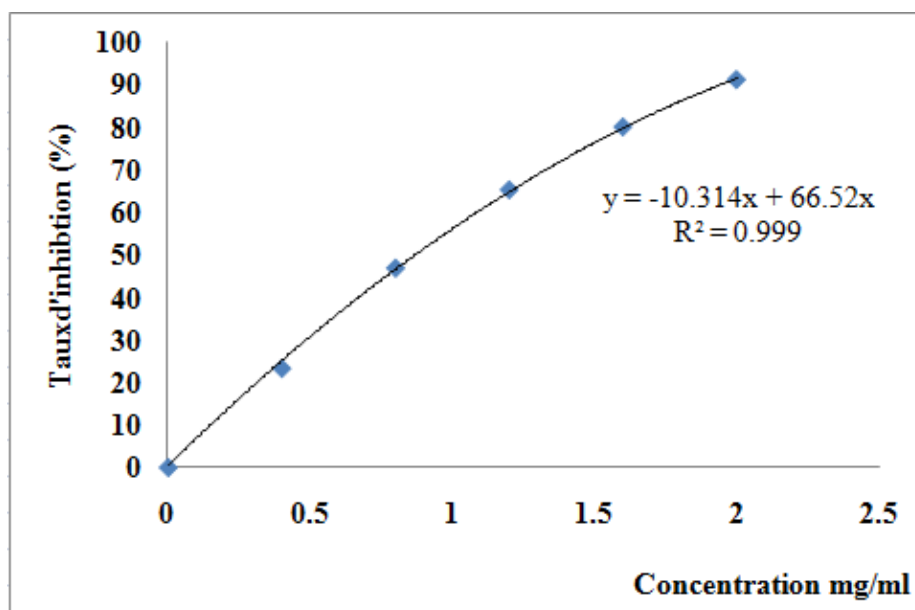
(*Negi et Jayaprakasha . 2003*) ont aussi rapporté que l'extrait d'écorces de la grenade présente une forte activité antioxydante.

Selon *Bhat et al.*, (2012), la récupération des polyphénols et d'autres composés antioxydants de la matière végétale dépend considérablement, de la solubilité de ces composés dans un solvant donné, de la polarité des solvants et de la viscosité. Ainsi, les solvants tels que le méthanol ou l'acétone peuvent atteindre facilement les endroits intracellulaires, afin de lixivier au maximum les constituants actifs.

**Tableau 09:** IC50 et inhibitions maximales des extraits déterminé par la méthode de DPPH

Extraits	I.max (mg/ml)	IC50(mg/ml)
Méthanol	93.020 ± 0.535 % (à 2mg/ml)	0,68
Ethanol	91,558 ± 0,718% (à 2mg/ml)	0,7473
Acétone	91,451 ± 0,476 % (à 2mg/ml)	0,817

Chaque résultat constitue la moyenne des trois valeurs obtenues (n=3).



**Figure n° 14:** Evolution des taux d'inhibition de DPPH par l'extrait méthanolique.

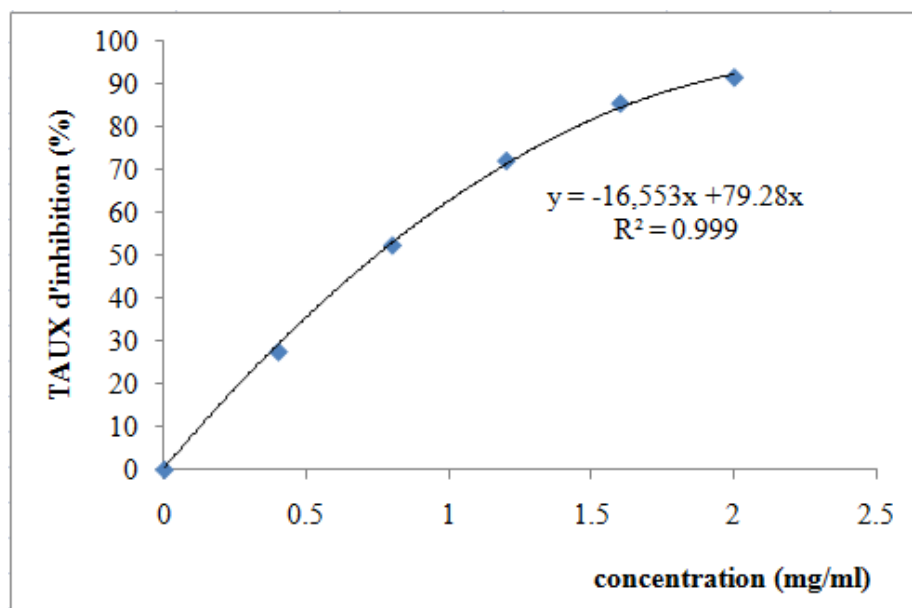


Figure n° 15 : Evolution des taux d'inhibition de DPPH par l'extrait éthanolique.

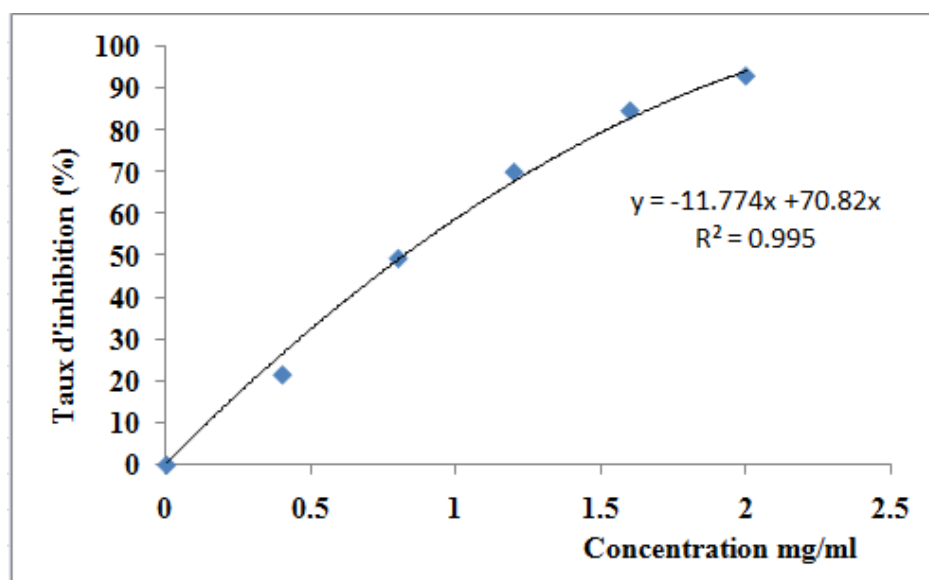


Figure n° 16: Evolution des taux d'inhibition de DPPH par l'extrait acétonique.

#### 1.4. Essai de fabrication d'un lait fermenté alicament enrichi d'extrait d'écorces de grenade (*Punica granatum*)

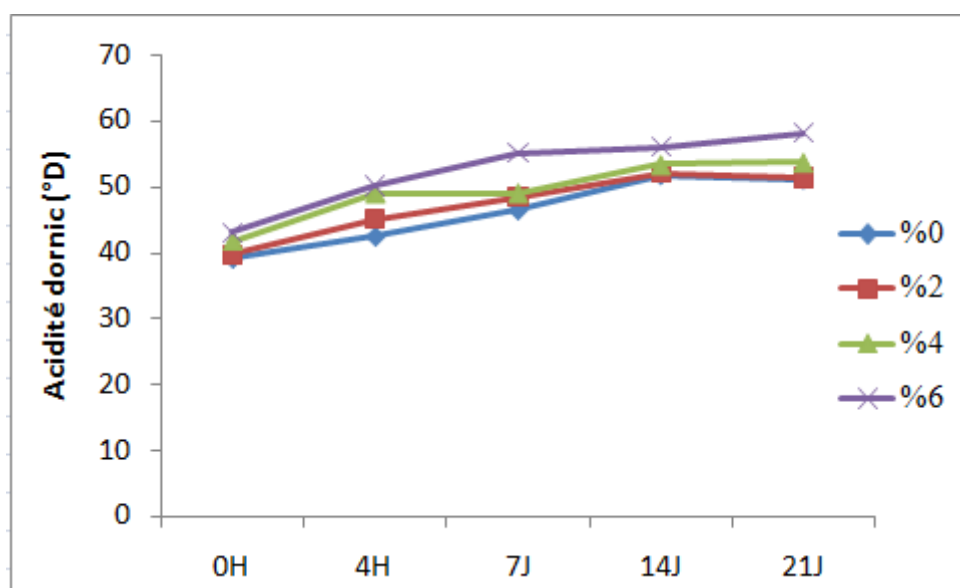
- Mesure et contrôle sur les laits fermentés

##### 1.4.1. Paramètres physicochimiques

##### 1.4.1.1. Acidité

Durant l'expérimentation, au cours de la première période de fermentation, on a noté une augmentation explicite de l'acidité des yaourts de 40,835°D à 0 heure à 46,582°D après 4 heures de fermentation.

Au cours de la phase de poste acidification, il est remarqué une augmentation de l'acidité des yaourts de 49.66°D au 7<sup>ème</sup> jour à 53.5°D au 21<sup>ème</sup> jour en moyenne à la fin de la période de conservation à 4°C. Les résultats sont illustrés dans la figure 17 et le tableau 10.



**Figure n° 17:** Evolution de l'acidité Dornic des yaourts additionnés de l'extrait de grenade à différentes doses.

**Tableau n° 10:** Effet d'incorporation d'extrait de grenade sur l'acidité (°D) des yaourts expérimentaux

Période	Temps	Taux d'incorporation d'extrait de grenade				Moyenne
		0%	2%	4%	6%	
Période de fermentation	<b>0h</b>	39 ± 0,894	39,67 ± 0,516	41,67 ± 0,516	43 ± 0,894	40,835
	<b>4h</b>	42,333 ± 0,516	45 ± 0,894	49 ± 0,894	50 ± 0,894	46,582
Période de poste acidification	<b>7j</b>	46,333 ± 0,516	48,333 ± 0,516	49 ± 0,894	55 ± 0,894	49,66
	<b>14j</b>	51,667 ± 0,516	52 ± 0,894	53,333 ± 0,516	56 ± 0,894	53,25
	<b>21j</b>	51 ± 0,756	51,333 ± 0,873	53,667 ± 0,873	58 ± 0,756	53,50

Chaque résultat constitue la moyenne des trois valeurs obtenues (n=3) plus ou moins écarts types. H : heures ; J : jours.

Durant toute l'expérimentation en fonction des taux d'extrait de fruit de *Punica granatum* incorporés variables de 2, 4 et 6%, l'acidité des laits fermentés expérimentaux connaît des augmentations significatives (tableau10).

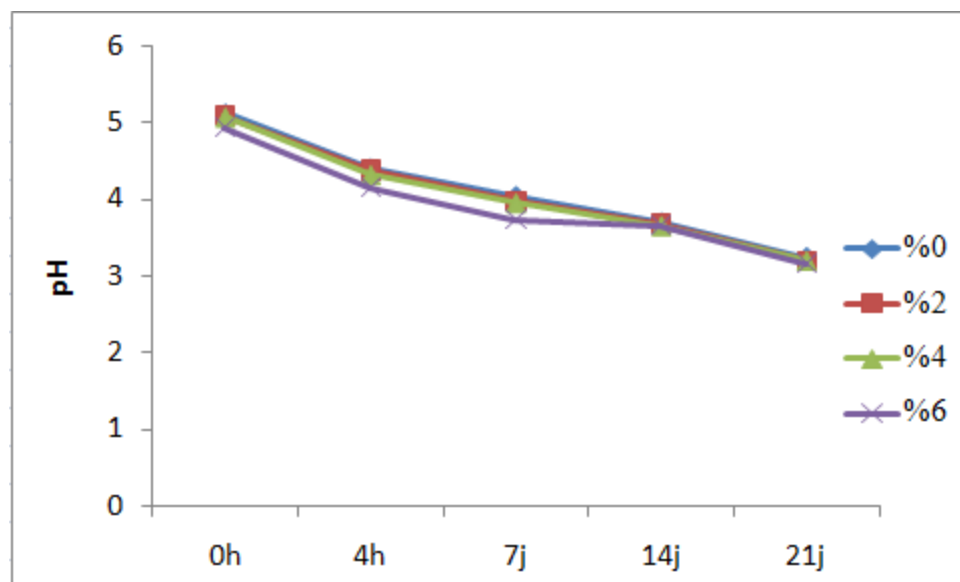
Contrairement au pH, l'acidité a marqué une augmentation durant tout la période expérimentale à partir de 40,835°D à 0 heures pour atteindre 53.5°D en moyenne au 21ème jour. Cette acidité, même au 21ème jour de conservation reste dans les normes admises puisqu'elle ne dépasse pas 150°D.

#### 1.4.1.2. pH

Le pH est un des paramètres physicochimiques qui jouent un rôle important dans la prolifération microbienne dans les denrées alimentaires. Un pH acide est favorable à la croissance des levures et des moisissures, tant dis que les bactéries préfèrent un pH neutre.

D'une façon générale, le pH a marqué une évolution décroissante de 5,059 à 3,199 en moyenne durant les deux périodes de fermentation et de post-acidification.

Par ailleurs, les valeurs de pH ont connu durant ces périodes une augmentation inversement proportionnelle en fonctions des taux d'extrait incorporés dans les yaourts expérimentaux (figure 18, tableau 11).



**Figure n° 18:** Effet d'incorporation de l'extrait de grenade sur l'évolution de pH des yaourts étuvés expérimentaux.

Tableau n° 11 : Evolution de pH des yaourts incorporés d'extrait de grenade.

Période	Temps	Taux d'incorporation d'extrait de grenade				Moyenne
		0%	2%	4%	6%	
Période de fermentation	0h	5,127 ± 0,014	5,093 ± 0,010	5,077 ± 0,005	4,940 ± 0,015	5,059
	4h	4,407 ± 0,005	4,377 ± 0,005	4,323 ± 0,014	4,147 ± 0,010	4,314
Période de poste acidification	7j	4,043 ± 0,019	3,977 ± 0,010	3,953 ± 0,005	3,74 ± 0,009	3,928
	14j	3,697 ± 0,023	3,68 ± 0,032	3,653 ± 0,029	3,66 ± 0,032	3,673
	21j	3,24 ± 0,018	3,197 ± 0,042	3,197 ± 0,014	3,16 ± 0,018	3,199

Chaque résultat constitue la moyenne des trois valeurs obtenues (n=3) plus ou moins écarts types. H : heures ; J : jours.

Pendant les deux périodes de l'étude, du début de la fermentation à la fin de la phase de post-acidification soit 21 jours de conservation au froid à 4°C, les valeurs de pH ont tendance à diminuer de 5,059 à 3,199. Ces réductions de pH résultent sans doute d'une production d'acide lactique suite à une fermentation du lactose du lait par les deux souches spécifiquesensemencées à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* (Alias et Lenden, 1984 ; Luquet, 1990). Par ailleurs les valeurs de pH ont connu une décroissance en fonction des doses incorporées de l'extrait de fruit de *Punica granatum* dans les yaourts expérimentaux.

Nos résultats montrent des valeurs de pH plus acides par rapport à celles rapportées par Mediani et Guerhli, (2015) soit  $4,77 \pm 0,023$  et Achtiouane et Benamrouche, (2015) estimée à 4,40. Cependant il se rapproche de celui rapporté par Sidoummou, (2011) avec une valeur de  $4,02 \pm 0,042$ . Ces valeurs de pH sont en partie liées à la richesse de la poudre d'écorces de grenade (PEG) en composés acides l'acide hydroxybenzoïque, l'acide gallique et l'acide ellagique (Ilham Hmid, 2014).

Ces écarts enregistrés sont dus à plusieurs facteurs tels que la variété et le stade de maturation.

La fermentation modifie les composants du lait et les caractéristiques organoleptiques de celui-ci. Certaines de ces transformations sont communes aux divers laits fermentés; c'est le cas surtout de l'acidification et la gélification. D'autres sont, au contraire spécifiques à chaque type de lait fermenté, comme la formation de composés aromatiques, de gaz et l'hydrolyse des protéines (Bylund, 1995).

La fonction acidifiante est la plus recherchée des bactéries lactiques, qui a pour effet une production importante d'acide lactique conduisant à une acidification rapide et durable (Jones, 2004).

#### 1.4.1.3. Viscosité

La viscosité a nettement augmenté du début de fermentation au 21<sup>ème</sup> jour de conservation (post-acidification) de 3,073 à 29,461 m<sup>2</sup>/s. De plus il est remarqué que pendant les deux périodes de l'étude (fermentation et post-acidification), il existe une relation proportionnelle de variation des valeurs de la viscosité avec l'augmentation des taux d'incorporation de l'extrait de grenade (2%, 4% et 6%) (figure 19, tableau 12).

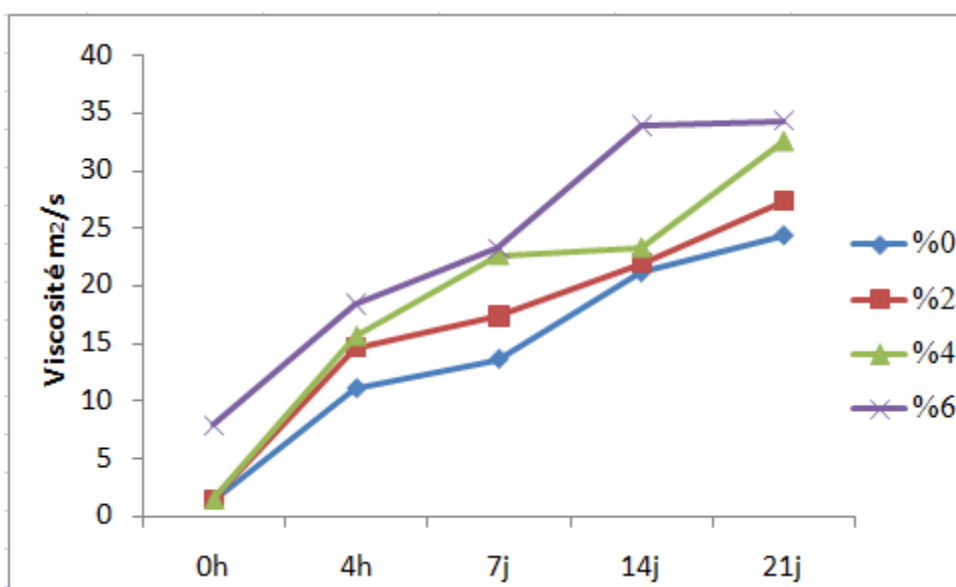


Figure n° 19: Evolution de la viscosité des yaourts expérimentaux additionnée de l'extrait de fruit de grenade (*Punica granatum*).

**Tableau n° 12 :** Effet de l'incorporation de l'extrait de grenade sur la viscosité des laits fermentés expérimentaux.

Période	Temps	Taux d'incorporation d'extrait de grenade				Moyenne
		0%	2%	4%	6%	
Période de fermentation	0h	1,366 ± 0,073	1,507 ± 0,073	1,507 ± 0,073	7,913 ± 0,379	3,073
	4h	11,021 ± 0,789	14,648 ± 0,263	15,637 ± 0,696	18,369 ± 0,253	14,919
Période de poste acidification	7j	13,565 ± 0,335	17,38 ± 0,456	23,267 ± 0,842	34,242 ± 0,812	22,11 4
	14j	21,054 ± 0,126	21,949 ± 0,193	22,608 ± 0,126	23,173 ± 0,126	22,196
	21j	24,257 ± 0,193	27,318 ± 0,386	32,452 ± 0,570	33,818 ± 0,146	29,461

Chaque résultat constitue la moyenne des trois valeurs obtenues (n=3) plus ou moins écarts types. H : heures ; J : jours.

La texture et l'onctuosité constituent, pour le consommateur, d'importants éléments d'appréciation de la qualité du yaourt. Certaines souches bactériennes produisent, à partir du glucose, des exopolysaccharides qui, en formant des filaments pouvant se lier aux caséines, limitent l'altération du gel par le traitement mécanique et contribuent à la viscosité du yaourt.

L'augmentation de la viscosité dans différents laits fermentés est en général, attribuée à la production de ces exopolysaccharides (EPS) qui, selon une étude portant sur plusieurs souches serait essentiellement composés de rhamnose, arabinose et mannose (*Shmidt et al., 1994*).

Les laits fermentés additionnés de l'extrait de fruit de grenade (*Punica granatum*) sont nettement plus visqueux. Cette viscosité s'avère augmenter avec l'augmentation des taux d'extrait incorporés dans les yaourts. Au cours l'expérimentation, il est apparaît donc que

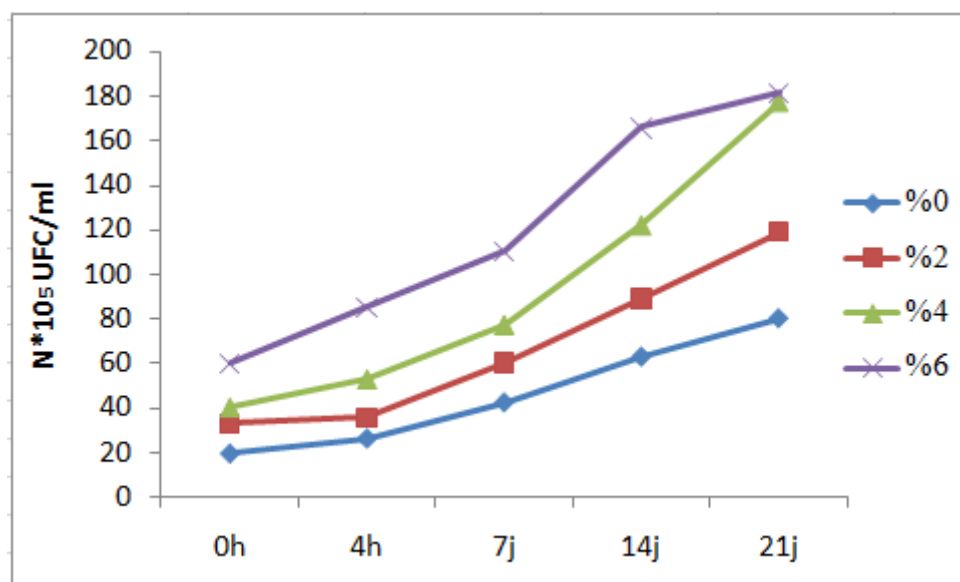
plus le taux d'incorporation de l'extrait est élevé, plus est la viscosité des laits fermentés expérimentaux augmente.

#### 1.4.2. Paramètres microbiologiques

##### 1.4.2.1. *Streptococcus thermophilus*

Le nombre des *Streptococcus thermophilus* dans les essais expérimentaux a connu d'une façon globale une augmentation de  $42.10^5$  à  $131.10^5$  UFC/ml en moyenne du début de la période de fermentation jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour de post-acidification.

Au cours de l'étude expérimentale, il a été remarqué une évolution croissante du nombre de *Streptococcus thermophilus* en fonction des doses incorporés de l'extrait de l'écorce de *Punica granatum* (figure 20, tableau 13).



**Figure n° 20:** Evolution du nombre de *Streptococcus thermophilus* des yaourts étuvés additionnés de l'extrait de l'écorce de *Punica granatum*.

**Tableau n° 13:** Evolution du nombre de *Streptococcus thermophilus* ( $N \times 10^5$  UFC/ml) des yaourts expérimentaux additionnés de l'extrait des écorces de grenade (*Punica granatum*)

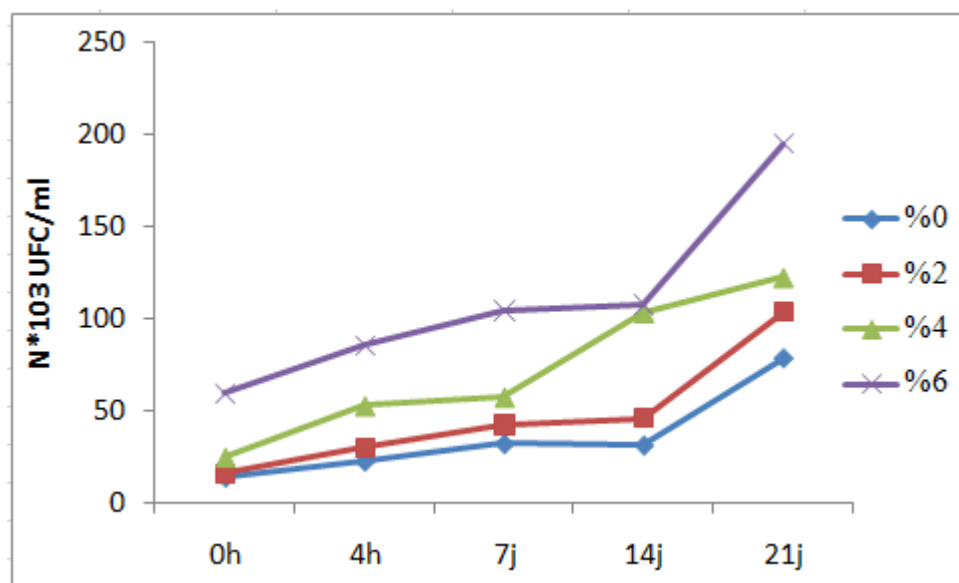
Période	Temps	Taux d'incorporation d'extrait de grenade				Moyenne
		0%	2%	4%	6%	
Période de fermentation	0h	20 ± 0,894	33,333 ± 1,862	53 ± 1,789	60 ± 0,894	41,583
	4h	26,667 ± 1,862	36 ± 0,894	40,333 ± 1,366	110 ± 0,894	53,250
Période de poste acidification	7j	42,667 ± 1,862	60,333 ± 1,366	77,333 ± 1,862	85 ± 0,894	66,333
	14j	63,667 ± 1,366	119 ± 0,894	122 ± 0,894	165,667 ± 1,862	117,417
	21j	80 ± 0,894	82 ± 1,789	177,333 ± 1,366	181,333 ± 1,366	131,917

Chaque résultat constitue la moyenne des trois valeurs obtenues (n=3) plus ou moins écarts types. H : heures ; J : jours.

#### 1.4.2.2. *Lactobacillus bulgaricus*

D'après les résultats obtenus, on remarque que le nombre des germes *Lactobacillus bulgaricus* a augmenté du début de fermentation au 21ème jour de conservation (post-acidification) soit de  $29.10^5$  à  $125.10^5$  UFC/ml.

Par ailleurs, le nombre des *Lactobacillus bulgaricus* a connu durant ces périodes une augmentation proportionnelle en fonction des taux d'extrait d'écorce de *Punica granatum* incorporés dans les yaourts expérimentaux (figure 21, tableau 14).



**Figure n° 21:** Evolution du nombre de *Lactobacillus bulgaricus* des yaourts étuvés additionnés de l'extrait d'écorce de *Punica granatum*.

**Tableau n° 14:** Evolution du nombre de *Lactobacillus bulgaricus* (N×10<sup>3</sup>UFC/ml) des yaourts expérimentaux additionnés de l'extrait des écorces de *Punica granatum*

Période	Temps	Taux d'incorporation d'extrait de grenade				Moyenne
		0%	2%	4%	6%	
Période de fermentation	0h	14 ± 0,894	16,667 ± 1,862	25 ± 0,894	60 ± 0,894	28,917
	4h	22,667 ± 1,862	30,667 ± 1,366	53 ± 1,789	85 ± 0,862	48
Période de poste acidification	7j	32 ± 0,894	43 ± 1,789	57,667 ± 1,366	104,667 ± 1,366	59,334
	14j	31,333 ± 1,366	46,667 ± 1,366	103,667 ± 1,862	108 ± 1,789	72,417
	21j	78,333 ± 1,366	104 ± 1,789	122,667 ± 1,862	195 ± 1,789	125

Chaque résultat constitue la moyenne des trois valeurs obtenues (n=3) plus ou moins écarts types. H : heures ; J : jours.

Il est bien connu que l'association symbiotique nommé actuellement « protocoopération » de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* se traduit par un effet synergique notable sur l'activité acidifiante du milieu. Le démarrage de la fermentation lactique est ainsi assuré par les *Streptococcus thermophilus* qui utilisent comme facteur de croissance les acides aminés et les peptides se trouvant dans le milieu et libérés des caséines par l'hydrolyse partielle enzymatique des amino-peptidase sécrétée par *Lactobacillus bulgaricus*. Durant cette première phase de la période de fermentation, l'acide lactique produit, abaisse le pH du milieu ou la croissance des *Streptococcus thermophilus* est freiné. La fermentation est ensuite relayée par *Lactobacillus bulgaricus* qui utilise comme facteurs de croissance le CO<sub>2</sub> et l'acide formique produit au préalable par *Streptococcus thermophilus* (Ebenzer et Vedamuthu, 1991).

Etant riche en principaux composés nutritionnels et en facteurs de croissance, l'élévation des taux d'extrait de grenade dans les yaourts expérimentaux a sans doute favorise une plus ample prolifération et donc la fermentation des germes lactiques spécifiques du yaourt et qui, par voie de conséquence ont gardé une plus grande production de lactate accompagné d'une nette diminution du pH du milieu (Blanc, 1984).

La flore lactique est responsable de la texture dans les laits fermentés, augmente aussi la viscosité du lait par production de polysaccharides (EPS), composé de galactose, glucose ainsi que de petites quantités de rhamnose, arabinose et mannose (Schmidt et al., 1994 ; Bergamaier, 2002). Il est couramment admis aussi que *Lb. bulgaricus* possède une aptitude à fermenter d'avantage le lactose lors de la conservation des yaourts au froid positif à 4°C et à produire des EPS composés de galactose, glucose et de rhamnose à des rapports de 4/1/1, respectivement (Tamime, 1999).

Les taux d'extraits des écorces de grenade ont augmenté la prolifération des germes spécifiques au cours de la fermentation et donc leur pouvoir acidifiant et à produire des EPS responsables de la viscosité et de la qualité rhéologique des laits fermentés.

Les résultats préliminaires d'essai d'incorporation d'extrait de fruit de grenade dans les yaourts étuvés présentent une bonne fermentation (levain de bonne qualité).

En outre, le nombre de germes lactique au terme de la production est conforme à la norme dictée par le codex alimentarius de < 10<sup>7</sup> germes UFC/ml.

## **Conclusion**

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possèdent des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

A travers les résultats obtenus, les grenades peuvent être valorisés grâce à l'exploitation des écorces en les incorporant dans un yaourt afin d'obtenir un aliment fonctionnel à caractère nutritionnel et thérapeutique.

La poudre d'écorce de grenade constitue une source importante de polyphénols. Ces constituants présentent divers activités biologiques dont l'activité antioxydante. Cela justifie son utilisation comme ingrédient fonctionnel dans l'industrie alimentaire. Toute fois, du fait du goût astringent de la poudre d'écorces de grenade, cette dernière doit être purifiée avant son incorporation dans les préparations alimentaires.

Dans le présent travail, la teneur totale en composés phénoliques varie selon la nature du solvant, elle est beaucoup plus importante dans l'extrait méthanolique que dans les extraits d'acétone et d'éthanol.

L'activité antioxydante des différents extraits d'écorces de la grenade évaluée par la méthode de réduction du radical libre DPPH a révélé que l'activité la plus élevée a été obtenu dans l'extrait méthanolique.

L'activité antiradicalaire des extraits par le test de DPPH a révélé l'effet très actif de l'extrait comme piègeurs du radical DPPH. Ces résultats pourraient servir à développer des techniques de valorisation des écorces de fruit de *Punica granatum* comme agent de conservateur à effet antioxydant dans l'industrie agroalimentaire.

Les résultats de l'incorporation de l'extrait des écorces de grenade (*Punica granatum*) dans un lait fermenté de type yaourt ont révélé que ce dernier a durant sa conservation à 4°C, présenté une diminution de pH, une augmentation de l'acidité titrable et de la viscosité avec une nette évolution de nombre des germes spécifiques. En outre, les extrait phénoliques des écorces de grenade ont stimulé la prolifération de la

flore lactique et donc leur pouvoir acidifiant et à produire des exo-polysaccharides (EPS) responsables de la viscosité et la qualité rhéologique des yaourts.

Au terme de ce travail, il ressort qu'il est possible de valoriser un déchet ménager, type écorces de grenade afin de produire un yaourt aromatisé, coloré naturellement par son utilisation sous forme de poudre. De plus, ce yaourt est enrichi en polyphénols et est doté d'un pouvoir antioxydant intéressant faisant de lui, un aliment bénéfique pour l'organisme et donc fonctionnel.

**Références bibliographiques**

**Abbasi H., Rezaei K. et Rashid L. (2008).** Extraction of Essential Oils From the Seeds of Pomegranate Using Organic Solvents and Supercritical CO<sub>2</sub>. *J Am Oil Chem Soc*, 85: 83–89.

**Aberoumand A. et Deokule S.S. (2008).** Comparison of phenolic compounds of some edible plants of Iran and India. *Pakistan Journal of Nutrition* 7: 582-585.

**Achtiouene, S. et Benamrouche, R. 2015.** Contribution à l'évaluation des propriétés physicochimiques, fonctionnelles et biologiques de la poudre de peaux de grenade (*Punica granatum*) d'Algérie (région de Bordj Menail) Mémoire de Master, Département de Technologie Alimentaire, FSI, Université de Boumerdes.

**Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C.G., Reed, J.D., Mukhtar, H., 2005.** Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK & NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int. J. Cancer*. 113(3), 423-433.

**Aguilar C. N., Aguilera-Carbo A., Robledo A., Ventura J., Belmares R., Martinez D., Rodriguez-Herrera R. and Contreras J., 2008.** Production of Antioxidant Nutraceuticals by Solid-State cultures of pomegranate (*Punica granatum*) peel and creosote bush (*Larrea tridentata*) Leaves. *Food Technol. Biotechnol.* 46(2) 218-222.

**ALAIS C et LINDEN G, (1994).** Abrège biochimie alimentaire . Ed Massons, paris, 172-182.

Alais C., Linden G. Miclo L.(2003). Biochimie alimentaire, 6ème édition de l'abrégé. Edition: Dunod. Paris, p41-68.

**Al-Said F.A., Opara U.L. Al-Yahyai R.A. (2009).** Physico-chemical and textural quality attributes of pomagranate cultivars (*Punicagranatum* L.) grown in the Sultanate of Oman. *Journal of Food Engineering* 90: 129-134

**Alyafi A.G(2007).** Détermination of chemical composition of prangos and the possibility to use in the applied field, Damascus University. 54.

**Al-Zoreky NS., 2009.** Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit peels. *International Journal of Food microbiology* 134, 244-248.

**Amellal, R. (2000).** La filière lait en Algérie : entre l'objectif de la sécurité alimentaire et la réalité de la dépendance. Institut National d'Agronomie El- Harrache. Option méditerranéenne. Sér.B N° 14.Pp. 230-232.

**Amellal-Chibane, H. (2008).** Aptitude technologiques de quelques variétés communes de dattes : formulation d'un yaourt naturellement sucré et aromatisé. Thèse de doctorat en technologies alimentaires. Faculté des sciences de l'ingénieur. Université BOUMERDES. Pp. 164.

**Anderson J. W., Johnstone B. M. et Cook-Newell M.E. (1995).** Meta-Analysis of the Effects of Soy Protein Intake on Serum Lipids. The New England Journal of Medicine 333: 276-282.

**ANONYME. (1992).** *Norme Internationale ISO 5492.* Analyse sensorielle ; contrôle de la qualité des produits alimentaires. AFNOR.

**Aviram M., Dornfeld L., Kaplan M., Coleman R., Gaitini D., Nitecki S., Hofman A., Rosenblat M., Volkova N., Presser D., Attias J., Hayek T. et Fuhrman B. (2002).** Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular disease: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs under experimental and clinical research* 28: 49-62.

**Beddou F. (2015).** Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex Vesicarius* L. et *Anvillea radiata*Coss. Thèse de doctorat en biologie cellulaire et biochimie, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 164p.

**Bellebcir L. (2008).** Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales. Mémoire de magister en biodiversité et production végétale, Université Mentouri, Constantine, 1119p.

**Bennick A.(2002).** Interaction of plant polyphénols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 13(2):184-196.

**Bergamaier, D. (2002).** Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *lb. rhamnosus* rw 9595m d'un milieu à base de perméat de lactosérum. Thèse doctorat, université de Laval, Canada. Pp149.

**Bhat R.,Liong M.T.,Abdorrezza M.N., Karim A.A., (2012).** Evaluation of free radical scavenging activity and antioxydant potentiel of a few popular green leafy vegetables of malaysia. *Int.J. Food prop.*(16):1371-1379.

**Bohrom N .1997** : les huiles essentielles extraites des plantes médicinales : moyen efficace de lutte contre les ravageurs de denrées alimentaires stockées. Université du Maroc pp162

**Boizot N., et Charpentier L.P., (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le Cahier des Techniques de l'Inra: 79-82.

**Boullard B. (1997).** Dictionnaire plantes et champignons. Edition ESTEM, Paris, p : 380. ISBN : 2-909455-99-8.

**Bourgou S., Serairi B.R., Medini F. et Ksouri R. (2016).** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'Euphorbiahelioscopia. Journal of new sciences 32:1649-1655.

**Brulé, G. (2003).** Annexe au rapport commun de l'académie des technologies et de l'académie d'agriculture de France. In de l'évolution des technologies de production et de transformation sur la qualité des produits laitiers. Pp47.

**Brunet S. (2008).** Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestifs des ruminants. Thèse de Doctorat en Pathologie et Nutrition, Université Paul Sabatier, Toulouse, 246 p.

**Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie : Phytochimie. Plantes médicinales. Paris: 3e édition Technique & Documentation (274) : 654-655.

**Bylund G., (1995)** : Dairy processing handbook. Edition Tetra Pak Processing Systems. Sweden. p.436.

**Calin Sanchez A. et CarboneliBanaching A.A. (2012).** La grenade cultivées en Espagne Punicalogine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les L'aliment fonctionnel du fruit. Livre. Natural ontioxydantgranatum+ et université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne, p.77.

**Calin, S.A., et Carboneli, B.A.A. 2005.** La grenade cultivées en Espagne Punicalagine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les l'aliment fonctionnelle du fruit. Livre. Natural ontioxydant granatum, université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne, 77p.

**Çam M., Hısil Y. et Durmaz G. (2009).** Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. Food Chemistry, 112 : 721–726

**Cerda B., Ceron J.J., Tomas-Barberam F.A., Espin J.C.,2003.** Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *Journal of Agricultural and food chemistry* 51:3493-3501.

**COURTIN P., MONNET M. and RUL F. (2002).** Cell- wall proteinases PrtS and Prt B have a different role in streptococcus thermophilus / Lactobacillus bulgaricus mixed cultures in milk. *Microbiology*, 148, 3413 -3421.

**Dai. J., et Mumper. R. (2010).** *Plant Phenolics* : Extraction, Analysis and their antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15 (10): 7313-7352.

**DALGLEISH D. G. (1990).** Denaturation and aggregation of serum proteins and caseins in the heated milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1995-1999.

**Dean F.M. (1963).** Natural occurring Oxygen Ring Compounds. *Butterworths*. Londres.

**Dehak K. (2013).** Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles : Polyphénols. Université KasdiMerbah.Ouargla, 19 p.

**DELLAGLIO F., DE ROSSART H., TORRIANIS S., CURK M. et JANSSENS D. (1994) .** Caractérisation générale des bactéries lactiques. Tec&Doc (Eds), Loriga, 1, 25-116.

**Devatkal Suresh K., Narsaiah K., Borah A., 2010.** Anti-oxidant effect of extracts of kinnow rind, pomegranate rind and seed powders in cooked goat meat patties. *Meat science*, Vol.85,no. 1, pp.155-159.

**Doleyres, Y. (2003).** Production en continue du ferment lactique probiotique par la technologie des cellules immobilisées. Thèse Doctorat. Université de Laval. Canada. Pp148.

**EL Gharras. H. (2009).** Polyphenols: food sources. Properties and applications- review. *International Journal of food Science and technology* 44(12) : 2512-2518.

**El-Nemr S.E., Ismail I.A. et Ragab M. (1990).** The chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruits. *Die Nahrung* 11: 162-164.

**Elodie W. (2009).** Le grenadier (Punicagranatum): Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Faculte de pharmacie, université Henripoincare-Nancy1.

**Enkelejda, P. (2004).** Interactions physico-chimiques et sensorielles dans le yaourt brassé aromatisé : quels impacts respectifs sur la perception de la texture et de la flaveur. Thèse de doctorat en Science des Aliments. Institut national agronomique paris grignon. Pp205.

**Escribano-Bailôn M.T. et Santos-Buelga C. (2003).** Polyphenols extraction from foods. In Methods in polyphenol analysis. Royal Society of Chemistry 1-16.

**Esmailzadeh A., Tahbaz F., Gaieni I., Alavi-Majd H. et Azadbakht L. (2006).** Cholesterol lowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia. *International Journal For Vitamin And Nutrition Research*. 76:147-151.

**Espiard E. (2002).** Introduction à la transformation industrielle des fruits. TEC&DOC-Lavoisier, Paris, France, 181-182.

**Evreinoff, V. (1957).** Contribution à l'étude du Grenadier. Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée. 124-138p.

**Fabre B. et Ermosilla V. (2008).** Utilisation d'un extrait de grenadier pour le maintien de la coloration capillaire. Fascicule de brevet européen. Bulletin 2008/01

**Fawole O.A., Opara U.L. Theron K.I. (2011).** Chemical and phytochemical properties and antioxidant activities of three pomegranate cultivars grown in South Africa. *Food Bioprocess Technology* <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-011-0533-7>.

**Ferrari, J. (2002).** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. LAUSANNE.

**Fiorucci S. (2006).** Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de Doctorat, université de Nice-Sophia Antipolis, Nice (France). p.211.

**Forjicq, J. V., et Regelson. W. (1995).** Review of the biology of quercétin and related Bioflavonoids. *Fd Chem.Toxic.* (33): 1061-1080.

**Garcia-Salas P., Morales-Soto A. Segura-Carretero A. et Fernández-Gutiérrez A. (2010).** Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules* 15 : 8813-8826.

**Gil M. I., Toms-Barbern F. A., Hess-Pierce B., Holcroft D. M. et Kader A. A. (2000).** Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *J. Agric. Food Chem.*, 48 : 4581-4589.

**Gosta, B. (1995).** Manuel de transformation du lait. Ed Etat pack processing systems AB. Sweden.

**Guo C., Wei J., Yang J., Xu J., Pang W. et Jiang Y. (2008).** Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects. *Nutrition Research*, 28 : 72–77.

**Hadi M. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractèrepooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de Doctorat en pharmacochimie. Université de Louis Pasteur Strasbourg I, Faculté des sciences, p22-24.

**Hagerman A.E., Muller-Harvey I. etMakkar H.P.S. (2000).** Quantification of tannins in tree foliage. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Vienna. p.26.

**Haidari M., Ali M., Casscell S.W. et Madjid M. (2009).** Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has asynergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine*, 16 : 1127–1136.

**Harrar A-E N. (2012).** Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Mémoire de Magister enet physiologie expérimentale, Université de Ferhat Abbes, Sétif. p. 95.

**Hartman R. E., Shah A., Fagan A. M., Schwetye K. E., Parsadonian M., Schulman R. N., Finn M. B. et Holtzman D. M. (2006).** Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 24 : 506–515.

**HASSAN A.N., FRANK J.F., FARMER M.L., SCHMIDIT K.A. and SHALABI S.A. (1995).** Observation of encapsulated lactic acid bacteria using confocal scanning laser microscopy. *Journal of Dairy Science*, 78, 2624-2628

**Hemingway R. W. (1992).** Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: *Lpant polyphenols: synthesis, properties, significande*. Hemingway R W, Laks P. E. New York.

**Hennebelle. T., Sahpaz. S., et Bailleul. (2004).** Polyphénols végétaux. Sources. utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*. vol. 2. no(1):36.

**Hmid I. (2013).** Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade (*Punica granatum L.*) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Thèse de Doctorat présenté en cotutelle entre l'Université d'Angers (France) et l'Université de Béni Mellal, Maroc. p. 180.

**Hmid, I. 2014.** Contribution à la valorisation alimentaire de la Grenade marocaine (*Punica granatum*) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leurs jus vrais. Food and nutrition, archives ouvertes de l'université d'Anger

**Iddleton, E., Kandaswami. C., et Theoharides. T.(2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammations. heart disease and cancer. *PharmacolRev.* (52) : 673-839.

**INRAA,2006.** deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétique pour l'alimentation et l'agriculture

**Iserin P. (2001).** Encyclopédie des Plantes Médicinales : identification, préparation, soin. 2ème édition, Larousse. 335p, ISBN: 2-03-560252-1.

**Iwashina T. (2000).** The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research* 113: 287-299.

**J.O.R.A. N°86 du 18 Novembre 1998** (Article 2 Page 22) Arrêté interministériel du 16 jourmada-ethania 1419 correspondant au 7 octobre 1998 relatif aux spécifications techniques des yaourts et aux modalités de leurs mises à la consommation.

**Jahfar M., Vijayan K.K. et Azadi P. (2003).** Studies on a polysaccharide from the fruit rind of *Punica granatum*. *Research Journal of Chemistry and*

**Jeantet, R., Croguennes, T., Mahaut, M.,Schuck, P.,Brulé , G. (2008).** Les produits laitiers. Ed Techniques et Documentations. Lavoisier-Paris .Pp185.

**Jiménez-Atiénzar M., Escribano J., Cabanes J., Gandía-Herrero F. etGarcía-Carmona F. (2005).** Oxidation of the flavonoïdeeriodictyol by tyrosinase. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 866-873.

**Jokić S., Velić D., Bilić M., Bucić-Kojić A., Plan inić M. et Tomas S. (2010).**Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *Journal of Food Scienc* 28: 206- 212.

**Kang, D-G., Yun, C-K., Lee H-S.** Journal of Ethno pharmacology, 87 (2003) 231-23. 21.

**Kawaii S. et Lansky E.P. (2004).** Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punicagranatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocyticleukaemia cells. *Journal of Medicinal Food*. 7: 8-13.

**KESSLER H.G. (1998).** The structure of fermented milk products as influenced by technology and composition. Texture of fermented milk products and dairy dessert. Proceedings of the IDF . Symposium. Vicenza, Italy, 5-6 May 1997, 93-105

**Khan. M. K. (2010).** Polyphénols d'grumes (flavanones) : extraction de glycosides de la peau d'orange. Synthèse de métabolites chez l'homme (glucuronides) et étude physico-chimique de leur interaction avec le sérum albumine. 169. Thèse de doctorat. Univ.Marrakech.

**Khater F. (2011).** Identification et validation fonctionnelle de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse des composés phénoliques.Thèse de Doctorat en Biochimie, Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques-Montpellier Supagro. P. 203.

**Kim N. D., Mehta R., Yu W., Neeman I., Livney T., Amichay A., Poirier D., Nicholls P., Kirby A., Jiang W., Mansel R., Ramachandran C., Rabi T., Kaplan B. et Lansky E. (2002).** Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 71: 203–217.

**Knatt S.R,Chander R.Sharma A., 2010.** Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *INter.J. of food andtech*,45,216-222.

**Koffi E., T. Sea T., Y. Dodehe Y. etSoro S. (2010).***Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty-three Ivorian plants. Journal of Animal and Plant Sciences* 5: 550-558.

**Kulkarni A. P., Aradhya S. M. et Divakar S. (2004).** Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant : punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. *Food Chemistry*, 87 : 551–557.

**Lairini, R., Bouslamti, F., Zerrouq et A., Farah. 2014.** Valorisation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de *Punica granatum* par l'étude de ses activités antimicrobienne et antioxydante. *J. Master.Environ. Sci.* 5(S1) : 2314-2318, ISSN : 2028-2508

**Lamontagne, M.(2002).** *Produits laitiers fermentés.* In Science et technologie du lait :transformation du lait . Chapitre 8.Vignola C.I, Ed Presses internationales. Polytechnique, Pp93-139. 557

**LAMOUREUX L. (2000).** Exploitation de l'activité  $\beta$ - galactosidase de culture de bifidobacteries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. Mémoire de maîtrise, Université de Laval, Canada.

**Lansky E. et Newman R. (2007).** Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*.109: 177–206.

**Lansky E., Shubert S. et Neeman I. (2000).** Pharmacological and therapeutic properties of pomegranate. In : Melgarejo-Moreno P. (ed.), Martínez-Nicolás J.J. (ed.), Martínez-Tomé J. (ed.) Production, processing and marketing of pomegranate in the Mediterranean region: Advances in research and technology, Zaragoza : CIHEAM-IAMZ, 2000. 253 p. ISBN 2-85352-214-8.

**LARPENT J.P. (1989).** Microbiologie alimentaire. Ed, techniques et documentation Lavoisier. Paris ,46, 1-117.

**Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J. et Lee C.Y. (2003).** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricol and Food Chemistry*51: 7292-7293.

**Leong. L., and Shui . G. (2002).** An investigation of antioxydant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.*, vol. 76.No(1):69.

**LEORY F., DEGEEST B. and DE VUYST L. (2002).** A novel area of predictive modeling : describing the functionality of beneficial micro-organisms in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 251-259.

**Levin G. M. (1994).**Pomegranete(Punicagranatum) plant genetic resources in Turkmenistan. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 97:31-37

**Lloyd J. U. (1897).** Punica granatum. The western druggist, Chicago, 9 p.

**Loones , A.(1994).** Laits fermentés par les bactéries lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques. Vol2. De Roissart, H et Luquet, F.M(Ed) ; Lorica , Uriage, 135- 154.

- Lugasi A., Hovari K., Sagi V., et Biro L. (2004).** *Acta Biologica Szegediensis.* 119-125.
- Luquet F. M , 1990.** Les produits laitiers transformations et technologie. 2 éme édition lait et produits laitiers vache, brebis, chèvre, Tech. do Apria la voisier P2- 85- 206
- Luquet, F. M., Carrieu, G. (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques. Collection sciences et techniques agroalimentaires, Ed lavoisier tec et Doc, Paris,Pp 307.
- Madi. A. (2010).** Caractérisation et comparaoson du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire de magister. Univ.Mentouri.Constantine.31.
- MAHAUT M., JEANTET R., SCHAK P. et BRUL G. (2000).** Les produits industriels laitiers. Ed ,techniques et documentation, Lavoisier, Paris. 26-40.
- Mahaut, M., Jeantet, R., Brulé, G., Schuck, P. (2000).** Les produits industriels laitiers.Tech&Doc, Lavoisier, Paris.Pp178.
- Malik A., Afaq F., Sarfaraz S., Adhami V. M., Syed D. N. et Mukhtar H. (2005).** Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. PNAS, 102 : 14813–14818
- Shi J., Yu J., Pohorly J. et Young J. C. (2003).** Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. Food, Agriculture & Environement, 1(2) : 42-47
- Manach. C., Scalbert. A., Morand. C., Rémésy. C., et Jiménez. L. (2004).** Polyphénols food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition 79(5) : 727-747.
- Mars M. et Marrakchi M. (1999).** Diversity of pomegranate (*Punica granatum L.*) germplasm in Tunisia. Genetic Resources and Crop Evolution, 46: 461–467.
- Martin, M. (2004).** Technologie des laits de consommation. Ed. Lait. Candia Direction développement technique. Pp135.
- MARTY-TEYSSET C. DE LA TORRE F. and GAREL J-R. (2000).** Increased production of hydrogen peroxide by lactobacillus delbruekii ssp bulgaricus upon aeration: involvement. Applied and Environmental Microbiology, 66(1), 262-267.

- Mediani, A. et Guerhli, A. (2015).** Essais de caractérisation et d'incorporation des poudre d'écorce de grenade dans une matrice alimentaire type L'ben et boisson bitter. Mémoire de Master, département de technologie alimentaire, FSI, Université de Boumerdes.
- Medic M.S., Ivona J., Asja S.B. et Mornar A. (2004).** Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. *Croatica Chemica Acta* 77 :361-366.
- Meerts I.A.T.M., Verspeek-Rip C.M., Buskens C.A.F., Keizer H.G., Bassaganya-Riera J., Jouni Z.E., Van Huygevoort A.H.B.M., Van Otterdijk F.M. et Van de Waart E.J. (2009).** Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Chemical Toxicology* 47 : 1085– 1092.
- Melgarejo. P., Valero, D. (2012).** International Symposium on the Pomegranat .Edition Zaragoza, Ciheam, Spain.337p.
- Merghem. R.(2009).** Elément de biochimie végétale. Edition bahaeddine.
- Milane. H. (2004).** La quercétine et ses derives: molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. These de doctorat. Université louis pasteur strasbourg I.155.
- Miliauskas. G., Venskutonis P.R., and Van Beek T.A.(2004).** Screening of radicalscavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry.* (85): 231-237.
- Mirdehghan S.H. Rahemi M.(2006).** Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*punicagranatum L.*) fruit.*Scientahorticulturae.* 111: 120-127.
- MODLER H.W. (1985).** Functional properties of nonfat dairy ingredients. A review. Modification of products containing casein. *Journal of Dairy Science,* 68, 2195-2205.
- Morton J. (1987).** Pomegranate. In: *Fruits of warm climates.* Miami, Florida. p. 352–355.
- Motilva M.J., Serra A., et Macià A.(2013).**Analysis of Food Polyphenols by Ultra HighPerformance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry: An Overview. *Journal of Chromatography A*1292: 6682.
- Nakasaki, K., Yanagisawa, M., Kobayashi, K. (2008).** Microbiological quality of fermented milk produced by repeated-batch culture. *Journal of Bioscience and bioengineering,* 105(1): 73, 76.

*Naveena B.M, Sen, A.R. Vaithyamthan S., Babji Y., Kondaiah N., (2008).* Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Science* 80, 1304-1308.

*Negi P. and Jayaprasha, J., (2003).* Antioxidant and Antibacterial Activities of Punica granatum Peel Extracts. *Journal of food science*, Vol 68, No. 4, pp. 1473-1477.

*Neurath A.R., Strick N., Li Y.Y. et Debnath A.K. (2004).* Punica granatum (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *Annals New York Academy Of Sciences* 1056: 311-327.

*NGOUNOU C., NDOUENKEU R., MBOFUNG F. et NOUBI I. (2003).* Mise en évidence de la biodisponibilité de calcium et du magnésium au cours de la fermentation du lait par des bactéries lactiques isolées du lait caillé du Zébu. *Journal of Food Engineering*, 57, 301-307.

*Nongonierma, A.B., Springett, M., Le Quéré, J.L., Cayot, P., et Voilley A. (2006).* Flavour release at gas/matrix interfaces of stirred yoghurt models. *International Dairy Journal*, 16, 102-110.

*NOZNICK P.P. (1982).* Dairy Ingredients in food. *Bulletin de la Fédération Internationale de Laiterie*, 142, 60-66.

*Okonogi S., Duangrat C., Anuchpreeda S., Tachakittirungrod S. et Chowwanapoonpohn S. (2007).* Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, 103 : 839-846.

*Opara L. U., Al-Ain M.R. & Al-Shuaibi Y. S., (2009).* Physico-chemical properties, vitamin C content, and Antimicrobial properties of pomegranate Fruit (*Punica granatum L.*). *Food bioprocess technol* (2009) 2:315-321.

*Oukabli A. (2004).* Le Grenadier : Des Variétés Performantes pour la Culture. *Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA. MADRPM/DERD*, 123 : 1-4.

*Oukabli A., Bellaji M., Chahbar A., Elkacemi A., Lahlou M. et Allabou M. (2004).* Comportement de clones locaux et de variétés étrangères de grenadier (*Punica granatum L.*) conduits dans la région de Meknès. *Al Awama* 3: 111.

**Ozer, B.H., Robinson, R.K., Grandison, A.S., Bell A.E. (1998).** Gelation properties of milk concentrated by different techniques. *International Dairy Journal*, 8, 793-799.

**Ozgen M., Durgaç C., Serçe S. et Kaya C. (2008).** Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in the Mediterranean region of Turkey. *Food Chemistry*, 111 : 703–706.

**Paci kora, E. (2004).** Interactions physico-chimiques et sensorielles dans le yaourt brasse aromatisé : quels impacts respectifs sur la perception et de la texture et de la saveur .Thèse de doctorat présentée à l'Institut National Agronomique. Paris. Grignon.Pp205.

**Pernoud, S., Schneid, C., Breton, S. (2005).** Application des bactéries lactiques dans les produits frais et effet probiotiques. In *bactéries lactiques et probiotiques* .CoordLuquet F.M., Corrieug., Ed Tec et Doc, pp :235-260 .306p.

**Prashanth D., Asha M.K. et Amit A. (2001).**Antibacterial activity of Punicagranatum. *Fitoterapia* 72: 171-173.

**Quiroz, I. (2009).** Granados, perspectivas y oportunidades de un negocio emergente: Antecedentes de Mercado. *Fundacion Chile*.72p. 117

**Rebledo A.,Aguilera-Carbo.,Rodriguez R.,Martinez J.L.,Garza Y., Aguilar C.N.,(2008).** Ellagic acid production by aspergillus niger in solid statefermentation of pomegranate residues.*J Ind Microbiol biotechnol*.35:507-513.

**Reddy M. K, Gupta S. K, JacobM. R, Khan S. L., Ferrira, D., (2007).** Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fraction, ellagitannins and phenolic acids from Punicagranatum L. *Planta Medicine*, 73(5), 461-467.

**Ribéreau-Gayou P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Edition. Dunod. Paris p1-23.

**Rohman, A., Riyanto, S., Yuniarti, N., Saputra, W.R., Utami, R et Mulatsih, W. (2010).** Antioxidant activity, total phenolic, and total flavonoid of extracts and fractions of red fruit (*Pandanusconoides* Lam).*International Food Research Journal*, 17, 97-106

**ROUSSEAU M. (2005).** *La fabrication du yaourt, les connaissances*. INRA. 9 pages.

**ROUSSEL Y., PEBAY M., GUEDON G., SIMONET J.P. and DECARISN B. (1994).** Physical and genetic map of streptococcus thermophilus A054. *Journal of Bacteriology*, 176(24), 7413- 7422.

**Saad Houda (2013).** Développement de bi- composite à base de fibres végétales et de colles écologiques. Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur en chimie, Université de Pau et des pays de l'Adour.

**Samarth R.M., Panawar M.,Soni A., Kumar M., (2008).** Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract, *Food Chemistry*, 106,868-873.

**SCHKODA A, STUMPH A. and KESSLER H.G. (1998).** Stability of texture of fermented milk products in relation to composition. *Texture of fermented milk products and dairy dessert. Proceedings of the IDF Symposium. Vicenza, Italy, 5-6 May 1997*, 115-121.

**SCHMIDT D.G, (1994).** Association of caseins and casein micelle structure. *Developments in dairy chemistry, Applied science publisher, London*, 61-86

**SCHMIDT J.L., TOURNEUR C. et LENOIR J. (1994).** Fonction et choix des bactéries lactiques laitières in « bactéries lactiques ». Vol II. DE ROISSART H. et LUQUET F.M. Ed. Lorica, paris. 37-46.

**Schubert S.Y., Lansky E.P. et Neeman I. (1999).** Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* 66:11-17.

**Seeram N. et Schulman R. (2006).** Pomegranates. Ancient roots to modern medicine. Editions Taylor et Francis. p.244.

**Seeram N. P., Risa N. S. et Heber D. (2006).** Pomegranates Ancient Roots to Modern. Medicine CRC Press Taylor & Francis Group Medicinal and aromatic plants–industrial profiles, 263p, ISBN : 0-8493-9812-6.

**Seeram N.P., Adams L.S., Henning S.M., Niu Y., Zhang Y., Nair M.G. et Heber D. (2005).** In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of nutritional Biochemistry* 16: 360-367.

**Seeram, N.P., Henning, S.M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z. & Heber, D.** Journal of Nutrition, 136 (10) (2006)2481- 2485.

**Seerama N. P., Adamsa L. S., Henninga S. M., Niua Y., Zhang Y., Nair M. G. et Heber D. (2005).** In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. Journal of Nutritional Biochemistry, 16 : 360–367.

**Sereme A., Millogo-Rasolodimby J., Guinko S. et Nacro M. (2010).***Anatomie et Concentration des tanins des plantes tannifères du Burkina.*Journal des Sciences 10: 24-32.

**Serra, M., Trujillo, A.J., Guamis, B., Ferragut, V. (2009).** Evaluation of physical proprieties during storage of set and stirred yoghurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk. Food hydrocolloids, 23: 82-91.

**Shabtay A., Eitam H., Tadmor Y., Orlov A., Meir A., Weinberg P., et al (2008).** Nutritive and antioxidative potential of fresh and stored pomegranate industrial by product as a novel beef cattle feed. Journal of Agricultural and chemistry, 56(21), 10063-10070.

**Sheets M.D., Du Bois M.L. et Williamson J.G. (1994).** The Pomegranate. HS, 44: 1-3. Horticultural Sciences Department, Florida Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Original publication date April 1994. Revised April 2004. Reviewed December 2008.

**Sidoummou, N. (2011).** Caractérisation physicochimique et évaluation des activités biologiques du mélange (miel-écorce de grenade). Mémoire de Master, département de Biologie, FS, Université de Boumerdes

**SINGH SUDHEER K., AHMED SYED U. and ASHOK P. (2006).** Yogurt science and technology. 2nd Ed. Cambridge : woodhead Publishing.

**Sodini, I. et Beal, C. (2012).** Fabrication des yaourts et laits fermentés. Techniques de l'Ingénieur (F 6315). Paris- France : Pp16

**Spichiger R.-E., Savolainen V. V., Fig M. et Jeanmonod D. (2002).** Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions

tempérées et tropicales. 2ème éd., Presse Polytechniques et universitaires, Lausanne, p : 286-287. ISBN : 2-88074-502-0.

*Stover E. et Mercure E. W. (2007).* The Pomegranate : A New Look at the Fruit of Paradise HortScience, 42(5) : 1088-1092.

*Syed D. N., Afaq F. et Mukhtar H. (2007).* Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. Seminars in Cancer Biology, 17 : 377–385.

*Tabak, S., Bensoltane, A. (2011).* L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. Ed Nature et Technologie. pp 71-79.

*TAMIME A. Y., KALAB M. and DAVIES G. (1984).* Microstructure of set-style yoghurt manufactured from cow's milk fortified by various methods. Food Microstructure. 3, 83-92.

*TAMIME A.Y. and ROBINSON R.K. (1999).* Yogurt science and technology. 2nd Ed. Cambridge : woodhead Publishing.

*Tamime, A.Y., Deeth, H.C. (1980).* Yogurth: technology and biochemistry. Journal of Food protection, 43, 12, 939-977.

*Tayel A.A., El-Baz A.F., Salem M.F. et ElHadary ;, H.m (2009),* Potential applications of pomegranate peel extract for the control of citrus green mould. Journal of diseases and protection, 116(6), 252-256, 2009.

*Temple N.J. (2000).* Antioxidants and disease: More questions than answers. *Nutrition Research* 20:449-459.

*VAN MARLE M. (1998).* Structure and rheological properties of yoghurt gels and stirred yoghurts. Thèse University of Twente, Enscheded, Pays Bas.

*Vidal A., Fallarero A., Peña B. R., Medina M. E., Gra B., Rivera F., Gutierrez Y. et Vuorela P. M. (2003).* Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 89 : 295–300.

*Vignola, C.I., (2002).* Science et technologie du lait : transformation du lait. Ed Lavoisier, Paris, Pp600.

**Villaño D., Fernández-Pachón M.S., Moyá M.L., Troncoso A.M. et García-Parrilla M.C. (2007).** Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71: 230–235.

**Wald E. (2009).** Le Grenadier (Punicagranatum): Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université Henri Poincaré 1.

**Walter J. S., Campbell C. S., Kellogg E. A. et Stevens P. (2002).** Botanique systématique une perspective phylogénétique. Edition De Boeck Université S. A., Paris, p : 318-320. ISBN : 2-7445-01239.

**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 doctorat, Université Mentouri Constantine.

**Zga N. (2010).** Purification et identification de polyphénols stilbeniques présents dans la vigne. Thèse de Doctorat en Chimie Organique, Université de Badji Mokhtar, Annaba. p. 114.

**Zhu J., Filippich L.J. et Al Salam M. (1992).** Tannic acid intoxication in sheep and mice. *Research in Vétérinaire. Science* 53 :280-292.

**Zuraini Z, Rais A, Yoga Latha L, Sasidharan S, Xavier R.** Antioxidant activity of Coleus Blumei, Orthosiphon stamineus, Ocimum basilicum and Mentha arvensis from Lamiaceae Family. *Int J Nat Eng Sci.* 2008;2:93–95. [[Google Scholar](#)]