

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLEB de BLIDA

Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie



Mémoire de fin d'étude

En Vue de l'Obtention de Master en Biologie

Option : Microbiologie et Toxicologie Alimentaire

Thème

*Etude de la cinétique de croissance et de la
viabilité des ferments lactiques d'un
yaourt préparé à base du miel et des
bifidobactéries*

Réalisé par :

M^{elle} Si Mohamed hadjer

Soutenu le : 19/12/2013

Devant le jury composé de :

M ^{me} CHAALAL.	MAB	Présidente	USDB
M ^{elle} MEKLAT .A	MCB	Examinatrice	USDB
M ^{me} CHERAALLAH.A	MCA	Examinatrice	USDB
M ^{er} BADIS.A	Pr	Promoteur	USDB

2013/2014

Remerciements

Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

J'adresse mes plus vifs remerciements à mon promoteur Mr. BADIS Abdelmalek professeur à l'Université de Blida, pour m'avoir aidé dans ce sujet, et pour son suivi durant la période de la réalisation de ce travail malgré ses charges professionnelles.

Merci à tous les membres de jury qui ont accepté de juger mon travail : M^{me} CHAALAL, M^{me} MEKLAT.A, et M^{me} CHERRALLAH.A

Ma plus sincère gratitude à Mr. Sadek Anis pour m'avoir accueilli au sein des laboratoires et m'avoir donné les moyens de mener à bout cette étude.

Nous tenons aussi à remercier les personnes de laboratoire des analyses physico-chimique et microbiologique de la laiterie de Trèfle qui a accepté de nous guider pendant notre stage, en particulier M^{elle} karima, soumia, et Mr. mohamed .

Enfin, je remercie tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand Merci.



Dédicace

Je dédie cet événement marquant de ma vie :

*A celui qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté fait
toujours les grandes femmes : à ma mère.*

A celui qui me donne la force : à mon père

A celle qui me comble de tendresse : ma grande mère « many khira »

A mes chères sœurs : Sara, Soumia, et Insaf

A mes chères frères : Abdou et Hassen

A mon petit choukou « lilou »

A toute ma famille surtout ma tante « Wassila », « Zakia »

*A mes amis qui ont toujours pris soin de moi à m'aider et me donner joie et
courage à : Assia, Amina, Nabila, Soumia*

ET enfin, à tous mes collègues de la promotion de 2^{ème} année Master de

Microbiologie et toxicologie alimentaire (2012-2013)

Résumé

Trois souches lactiques appartenant aux espèces : *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* ont été étudiées d'une part, sur le plan de leur cinétique de croissance et d'acidification dans le lait écrémé reconstitué (10% : P/V) additionné de 5 ou 10% de miel polyfloral, et d'autre part, sur le plan de leur viabilité et activité post-fermentaire pendant 21 jours d'entreposage à 4°C. Les résultats obtenus ont montré que, selon la souche considérée,

Le miel utilisé à concentrations (5 %) améliore significativement ($P < 0.05$) la croissance des bactéries lactiques durant les premières phases de la fermentation, cette évaluation de la vitesse de croissance présente des similitudes entre les *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, l'évaluation est due à la présence de nutriments supplémentaires apportés par le miel.

Concernant les *Bifidobacterium longum*, le miel polyfloral utilisé à 10% permet la poursuite de la synthèse d'acide lactique au bout de 21 jours avec un pH (5,20), dans la culture associée, le nombre des cellules bifides viables a été nettement amélioré par la présence du miel dans le lait fermenté et dépasse largement ($P < 0.05$) le niveau requis par la législation ($> 10^6$ cellules/g). Cette amélioration par rapport au témoin (sans miel) est variable de 16,8 et 15,1% selon la concentration du miel.

Ces résultats confirment l'effet protecteur du miel polyfloral sur la viabilité des ferments lactiques pendant la durée de leur conservation.

Mots clés : acidification, bactéries lactiques, croissance, le miel, viabilité.

Abstract

Three stocks of lactic acid bacteria belonging to the species: *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus bulgaricus* et *streptococcus thermophilus* were studied on the one hand on the plan of their kinetics of growth and acidification in skimmed milk reconstituted (10%: P/V) added with 5 or 10% of honey polyfloral and in addition, on the plan of their viability and post-acidifying activity during 21 days of storage to 4°C. The results obtained showed that, according to the stock considered:

Honey used with concentrations (5%) significantly improve ($P < 0.05$) the growth of the lactic bacteria during the first phases of fermentation, this evaluation the speed of growth presents similarities between *Lactobacillus bulgaricus* and *streptococcus thermophilus*. The evaluation due to the presence of nutrient additional is brought by honey.

Concerning *Bifidobacterium longum*, honey polyfloral used to 10% allows the continuation of the synthesis of lactic acid at the end of 21 days with a pH (5, 20) in the associated culture, the number of the viable cells bifides clearly improved by the presence of honey in fermented milk and largely exceeds ($P < 0.05$) the level required by the legislation ($> 10^6$ cellules/ g). This improvement compared to the witness (without honey) is variable of 16,8% and 15,1% according to the concentration of honey.

These results confirm the protective effect of honey polyfloral on the viability of the lactic leavens throughout their conservation.

Key words: acidification, lactic bacteria, honey, growth, viability

الملخص

ثلاثة أنواع بيكيرييا لبنية تابعة للأصناف *Bacillus Lacto bulgaricus*, *Bifidobacterium*, *unguolm*, و *thermophilus Streptococcus* درست من جهة, على مستوى حركة نموها و درجة حموضتها داخل حليب منزوع الدسم معاد تشكيله و مضاف له العسل بكمية 5% و 10% و من جهة أخرى, على مستوى إمكانية بقاء البكتيريا حية و فاعلية حموضتها بعد 21 يوما من التخزين في درجة 4°.

النتائج المحصل عليها تظهر بحسب نوع البكتيريا بصفة تعبيرية ($P < 0,05$) أن العسل المستعمل بكمية 5% يحسن من حركة نمو البكتيريا طوال الأطوار الأولى من التخمير, هذا التطور في سرعة النمو مماثل لكل من *bulgaricus* و *Lactobacillus* و *thermophilus Streptococcus* و راجع إلى عناصر إضافية موجودة في العسل.

في ما يخص *Bifidobacterium mongul* العسل متعدد الورد مستعملة بتركيز 10% سمح أيضا بمتابعة إنتاج حمض اللبن حتى 21 يوما بدرجة حموضة 5,20 في الوسط.

في زرع بكتيري مختلط, ظهر تحسين في عدد خلايا *Bifidobacterium longum* المزروعة في الحليب المخمر (غ/خلية $10^6 >$) بالعسل ($P < 0, 05$) و تجاوزت المستوى المحدد من طرف التشريع هذا التحسن مطابقة مع الشاهد (بدون عسل) معتبر بنسبة 16,8% مع 10% من العسل. هذه النتائج تحقق على أن العسل له اثر وقائي على بقاء البكتيريا اللبنية حية .

الكلمات الدالة: الخمائر اللبنية, النمو, عسل, إمكانية البقاء, التخمير

Liste des abréviations

- D° : degré dornic
- Abs : Absence
- AFNOR : Association Française de Normalisation
- DLC : date limite de consommation
- FAO : Food Agriculture Organisation (Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)
- FOS : Fructo-oligosaccharide
- GOS : Gluco-oligosaccharide
- MG : Matière grasse
- MRS : Milieu de Man Rogosa et Shap
- M17 : Milieu de Terzaghi
- HMF : hydroxyMéthyl-furfural
- NA : norme algérienne
- NF : norme française
- OGA : Glucose à l'Oxytétracycline
- OMS : Organisation Mondiale de la santé
- TSE : Tryptone-Sel – Eau
- UFC : Unité Formant colonie
- VF : viande fois
- VRL : lactose au vert brillant

TABLE DES MATIÈRES

Avant-propos	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Introduction.....	1

CHAPITRE I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le yaourt.....	4
I.1. Définition.....	4
I.2. Provenance et historique.....	4
I.3. Classification.....	4
I.3.1.Selon la technologie	5
I.3.2.Selon la teneur en matière grasse.....	5
I.3.3.Selon les ingrédients additionnés.....	7
I.4.Valeurs nutritionnelles et thérapeutiques.....	7
I.5.Description du processus de fabrication du yaourt.....	7
I.6.La fermentation lactique.....	8
I.6.1. Distinction entre les deux souches.....	8
I.6.2.La croissance associative dans le yaourt.....	8
I.7.Action des bactéries lactiques.....	8
I.7.1.Production d'acide lactique.....	9
I.7.2.Activité protéolytique.....	9
I.7.3.Activité lipolytique.....	9
I.7.4.Activité aromatique.....	10
I.8.Aperçue économique sur les yaourts probiotiques.....	10
I.9.Bifidobactéries.....	10
I.9.1.Taxonomie.....	12
I.9.2.Morphologie.....	13
I.9.3.Métabolisme.....	14
I.9.4.Effets probiotiques de la présence des bifidobactéries.....	14

CHAPITRE II LE MIEL

II.Le miel.....	16
II.1.Description et composition.....	16
II.1.1.Le miel.....	17
II.1.2.Propolis.....	17
II.1.3.La cire.....	18
II.1.4.Le venin	19
II.1.5.La gelée royale	19
II.1.6.Le pollen.....	20
II.2.Origine du miel.....	20
II.2.1.Nectar	20
II.2.2.Miellat.....	20

II.3.Types de miel.....	21
II.4.Composition chimique du miel	
II.4.1.Composants majeurs	
II.4.2.Composants mineurs	
II.5.Propriétés physico-chimiques du miel	
II.6.Propriétés nutritives	
II.7.Propriétés thérapeutiques	
II.8.Propriétés antimicrobiennes	
II.8.1.Effets de peroxyde d'hydrogène (inhibine)	
II.8.2.Effet antimicrobiens	

CHAPITRE III MATERIEL ET METHODES

III. Objectif de l'étude.....	23
III.2.Matériels	23
1. Matériel non biologique.....	23
2. Matériel biologique	25
III.3.L'ajout du miel	25
3.1. Méthodologie de travail	
4. Méthodes	
4.1. Détermination de la cinétique de croissance.....	26
4.2. Détermination de la cinétique d'acidification.....	26
4.3. Suivie de la post-acidification du lait fermenté entreposé à 4°C.....	26
4.4. Détermination de la survie des ferments dans le lait fermenté antéposé à 4°C	
III.5.Protocole expérimentale.....	27
6.Méthodes d'analyses.....	
6.1. Analyse statistique	27
6.1.1. Interprétation des résultats.....	27
6.2. Analyses microbiologiques.....	28
6.2.1. Principe	29
6.2.2. Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.....	29
6.2.3. Dénombrement.....	30
a-Dénombrement des <i>Lactobacillus bulgaricus</i> sur milieu MRS	30
b-Dénombrement de <i>Streptococcus thermophilus</i> sur milieu M17	
c-Dénombrement des Bifidobactérium longum sur milieu Columbia	
6.2.4. Confirmation par examen microscopique des colonies développées.....	32
6.3. Recherche des contaminants.....	32
6.3.1. Dans la matière première et produit fini.....	33
7. Analyses physico-chimiques	
7.1. pH	
7.2. Détermination de l'acidité titrable	
8. Analyse organoleptique	

CHAPITRE IV
RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV. 1. Résultats des analyses microbiologiques et physico-chimiques	35
1.1. Analyses microbiologiques.....	35
1.2. Examen microbiologiques d'identification des bactéries	
2. L'évolution de la cinétique de croissance des bactéries lactiques au cours de la fermentation	
a-Streptococcus thermophilus.....	36
b-Lactobacillus bulgaricus.....	36
c-Bifidobactérium longum.....	37
3. Evolution de la biomasse bactérienne au cours de la conservation.....	38
a-Streptococcus thermophilus	38
b-Lactobacillus bulgaricus	41
c-Bifidobactérium longum	43
4. Résultats des analyses physicochimiques.....	45
4.1. Evolution du pH.....	47
4.1. Evolution de l'acidité.....	47
Discussion	49
Références bibliographiques	
Annexe	

Introduction

Si l'introduction des bifidobactéries en industrie laitière s'est faite il y a plus d'une vingtaine d'années dans les pays technologiquement avancés, elle n'est pas encore envisageable dans certains autres pays en voie de développement. Cette situation est liée en premier lieu aux contraintes posées par le genre *Bifidobacterium* qui est très sensible à l'acidité développée dans le lait et à l'aérobiose relative qui y règne. Ce genre est rarement utilisé seul en raison de ses faibles aptitudes fermentaires sur milieu lait et il est souvent associé aux ferments lactiques classiques tels que *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Dans ce cas de cultures associées, la survie des bifidobactéries reste faible. Néanmoins, cette survie peut-être sensiblement améliorée par l'addition de substances indigestes communément appelées «prébiotiques» (A.S.Akalin et al., 2004) (Pestka et Ustunol, 2000). Parmi les prébiotiques les plus utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, nous citons l'inuline et l'oglio-fructose (Roberfroid, 1997).

Le miel d'abeille est un produit noble réputé et doué de nombreuses propriétés thérapeutiques et dont l'utilisation par l'homme à cet effet remonte à l'antiquité. A cet effet, de nombreuses études avaient souligné l'action inhibitrice du miel sur divers microorganismes pathogènes (P.E .Lusby et al., 2005).

Cependant, l'influence du miel sur la croissance des bactéries lactiques et des bifidobactéries sur le milieu lait n'a fait l'objet que de très peu de travaux. Selon (Lagrange et al., 1993).

Le miel a été utilisé pour exalter la flaveur des yaourts et des crèmes glacées. En ce qui concerne les bifidobactéries, plusieurs publications ont rapporté que la croissance et la survie des bifidobactéries dans le lait et dans le tractus gastro-intestinal étaient stimulées par la présence du miel d'abeille (Z.Ustunol et H. Gandhi, 2001) (H. Chick et al., 2001).

L'idée d'ajouter le miel à des préparations de lait fermenté en présence de bifidobactéries en vue d'améliorer leurs aptitudes fermentaires de ces microorganismes constitue le point de départ de cette étude qui a été complétée par l'évaluation de leur viabilité au cours de l'entreposage à +4°C pendant 3 semaines.

Dans cette présente étude, nous étudierons la capacité de deux ferments du yaourt (*St. thermophilus* et *L. bulgaricus* ssp. *delbrueckii*) de fermenter le lait en présence de miel

polyfloral d'eucalyptus à 10% (p/v) et de déterminer l'effet du miel comme agent protecteur de la viabilité de cellules bactériennes pendant l'entreposage frigorifique.

**Synthèse
bibliographique**

Chapitre I :

Le yaourt

I.1. Définition

Selon la définition de 1977 établie par la FAO et l’OMS, le yaourt est un lait coagulé obtenu par la fermentation lactique acide due à deux ferments spécifiques : *Lactobacillus delbrueckii* sous-espèce *bulgaricus* et *Streptococcus salivarius, subsp. thermophilus* (Fredot, 2005). ces bactéries lactiques thermophiles spécifiques doivent êtreensemencées simultanément et se trouve vivantes dans le produit fini à raison d’au moins 10 millions de bactéries par gramme rapportées à la partie lactée. Lors de sa mise à la consommation, la qualité d’acide lactique libre contenue dans le yaourt ne doit pas être inférieure à 0,8 gramme pour 100 gramme de produit. **(Arrêté interministériel ,1998)**

I.2. Provenance et historique :

L’origine du mot yaourt vient du turc « yoğurt » voulant dire « épaissir ».

Le yaourt aurait deux origines possibles : La Bulgarie ou le moyen orient (Turque, Kurdistan,....)

La Bulgarie et le moyen Orient procédaient de façon différente pour fabriquer le yaourt .Selon d’anciens écrits rédigés par Pline l’Ancien, la Bulgarie « épaississait le lait en une matière d’une agréable acidité ». Les régions du Moyen Orient, quand à elles, se servaient d’un sac de peau de mouton, ou chèvre, dans lequel ils plaçaient le lait qu’ils laissaient fermenter en exécutant un mouvement de va et vient .D’autre techniques furent également employées ; laisser chauffer le lait au soleil, (n’oublions pas que le Moyen Orient est une région du monde assez chaude), placer le lait ensuite dans des peaux de bêtes afin qu’il fermente de manière naturelle pour obtenir au final un gel : le yaourt

Les premières traces du yaourt remontent au III^e siècle avant JC.

Depuis des siècles, le yaourt était couramment consommé en Turque et en Asie, mais ce ne sera que dans les années 20 que sa consommation deviendra courante en Europe de l’Ouest. Sa commercialisation dans nos régions, qui remonte à la première moitié du XX^e siècle. **(Anonyme, 1995)**

I.3 .Classification :

Le yaourt peut être classé selon les paramètres suivant :

I.3.1. Selon la technologie : On distingue

I.3.1.1. Yaourt étuvé :

Les yaourts étuvés nature, sucrés ou aromatisés ont une texture ferme a surface lisse. La fermentation s'opère dans des pots après le conditionnement.

Le laitensemencé à bonne température est rapidement réparti en pots (en verre, carton paraffiné, en plastique) d'une contenance habituelle, de 12,5 cl dans le cas des yaourts sucrés, aromatisés, aux fruits,.....etc.

L'apport des additifs se fait avant ou après le remplissage des pots, Après le capsulage (aluminium, carton paraffiné), les pots sont placés dans une étuve (à air chaud) ou parfois au bain- marie pour permettre la fermentation.

L'acidification dépend de la température et de la durée d'incubation, la température choisie entre (42 et 46 C°) est maintenue constante. L'incubation dure environ 2à 3 heures.1% environ d'acide lactique, soit 75 à 100 D°. Ace moment , le caillé doit être alors immédiatement sorti de l'étuve refroidis le plus rapidement possible à la température de 4 C°, ce refroidissement a pour but d'arrêter l'acidification par inhibition des bactéries lactiques ,il se fait en chambre froide bien ventilée ou en tunnel de réfrigération, les pots sont ensuite stockés a +2 à 4 C° pendant 12 à 24 h de façon a augmenter la consistance sous l'action du froid et de l'hydratation des protéines . (Guyot. A, 1992)

- Dans ce type de yaourt en peut trouver ;

Yaourt étuvé probiotique : incorporé de probiotiques.

Yaourt étuvé aromatisé : contient des arômes.

Yaourt étuvé aux fruits : contient morceaux de fruits.

1.3.1.2. Yaourt brassé :

Les yaourts brassés sont fluides, la fermentation a lieu en cuve avant le conditionnement, il peut être soit nature, soit préparé avec des pulpes ou des morceaux de fruits ou aromatisés. Le laitensemencé est maintenu en cuve ou en tank à la même température que dans le cas des pots (entre 42 et 46 C°) jusqu'à l'obtention de l'acidité voulue. Celle- ci est souvent un peu plus élevée que pour le yaourt ferme : de 1 à 1,2% d'acide lactique, soit 100 à 120 D°.On procède alors au découpage et au brassage du caillé par l'un des procédés ci-après :

Agitation mécanique à l'aide d'un brasseur à turbine ou à hélice : passage du gel a travers un tamis.

- Dans ce type de yaourt en peut trouver :

Yaourt brassé aux fruits.

Yaourt brassé aromatisé.

Yaourt brassé fruité probiotique. (Guyot, A, 1992)

I.3.1.3. Yaourt à boire :

Le yaourt à boire est un yaourt qui se différencie du brassé par état liquide qui s'assimile à une boisson. Sa fluidité est obtenue par une diminution de la teneur en matière sèche. Le brassage fait par passage à l'homogénéisateur sous pression inférieure à 50 atmosphères, donne une viscosité inférieure d'environ 50% à celle obtenue par brassage mécanique, il peut être nature ou aromatisé.

Ce sont des yaourts veloutés fruités conditionnés en bouteilles et non en pot. Les yaourts sont nature quand on y ajoute rien, sucre, paraffinés, aux fruits, au chocolat.....etc.

(FAO, 2004)

I.3.1.4. Yaourt glacé :

Le yaourt glacé est incubé en cuve et sa congélation est réalisée comme pour la crème glacée. On trouve dans le yaourt glacé de la gamme de cellulose modifiée, de la gamme de guar, de la carraghénine et des arômes artificiels. (FAO, 2004)

I.3.2. Selon la teneur en matière grasse :

La teneur en matière grasse dans le yaourt fait distinguer :

I.3.2.1. Yaourt entier :

Comme sa dénomination l'indique, ce yaourt est à base de lait entier, sa teneur en matière grasse est de 3,5%(3,5 g/l), c'est un yaourt très onctueux et crémeux. (Anonyme, 2006)

I.3.2.2. Yaourt partiellement écrémé :

Le yaourt partiellement écrémé est le plus fréquemment consommé. Il s'agit du yaourt fabriqué à partir de lait partiellement écrémé, il contient 1% de matière grasse (10g/l) à 3% (30g/l). (Anonyme, 2006)

I.3.2.3. Yaourt maigre :

C'est un yaourt préparé à partir de lait écrémé, le yaourt maigre a une consistance gélifiée. Il est moins moelleux, ne contient plus de vitamines A et D, sa teneur en matière grasse au maximum 1%. (FAO, 2004)

I.3.3. Selon les ingrédients additionnés (additifs) :

I.3.3.1. Yaourt nature :

Le yaourt nature non sucré à peu près la même valeur nutritive que le lait avec lequel il est fabriqué, soit une excellente source de protéines, de calcium, de potassium, et de vitamines A et B, il apporte en plus tous les bienfaits associés à la fermentation tout en ne fournissant que très peu de calories. de plus, le yaourt est rapidement digéré : plus de 90% du produit en une heure, comparé à 30% pour le lait. Il offre une alternative nutritive intéressante pour les personnes intolérante au lactose (présent dans le lait). En effet, nous perdons à l'âge adulte la faculté de protéine de lactose, enzyme digestive dégradant le lactose dans l'intestin. Le moindre taux de lactose du yaourt le rend plus digeste, d'autant plus que ses bactéries continuent d'agir dans notre organisme lors de sa consommation.

(Luquet.1990)

I.3.3.2 .Yaourt aromatisé :

Ajouter des aliments aromatisants ou d'autres substances aromatisants, avec ou sans adjonction d'ingrédients facultatifs.

I.3.3.3. Yaourt fruité :

Il s'agit de yaourt a la confiture composé de morceaux de fruits (moins 30% d'elements ajoutés) choisi de l'appart de l'industrie.

I.3.3.4. Yaourt light :

Il s'agit d'un yaourt fabriqué à partir de l'ajoute de l'aspartame pour qualifier du faux sucre(E951). **(Anonyme, 2001)**

I.4. Valeurs nutritionnelles et thérapeutiques du yaourt :

I.4.1. valeurs nutritionnelles :

Un pot de yaourt nature possède la même valeur nutritive qu'un verre de lait (tableau N°1) : protéines : 4 à 5% glucides : 5 à 20% selon qu'il est nature ou sucré lipides à un taux variable.

Au cours de fermentation la composition du lait subit une certaine modification, certaines des ces modifications en font un produit de meilleure valeur que le lait. **(Tamime et Robinson, 2001)**

Tableau (01) : composition du lait et du yaourt

Composant	Pour 100g de lait	Pour 100g de yaourt
Proteine	3,5	5
Lipide	0,1	1
Lactose	5	4,5
Calcium	0,12	0,18
Phosphore	0,1	0,14
Acide lactique	0	1
Bactéries	0	0 15

- La teneur en vitamines varie en fonction du type du yaourt, de la température, de la préparation des souches utilisés et de stockage. Les minéraux et les oligo-éléments sont naturellement en concentration inchangée dans le lait après la fermentation, le cuire, le zinc, et le fer sont partiellement solubilisés. . **(Tamime et Robinson, 2001)**
- Le yaourt est un allié pour entretenir un bon capital osseux car il est très riche en calcium, l'idéal serait de manger quatre produits laitiers par jour, dont un ou deux yaourt. Les yaourts au lait entier nature aromatisés ou fruités, sont plus riches en vitamines A et D ceux à possèdent les mêmes qualités mais avec minimum de calories. **(Tamime et Robinson, 2001)**

I.4.2. valeurs thérapeutiques :

Le yaourt est un produit vivant, donc il est presque comme un médicament antiseptique et cela par ses vertus thérapeutiques :

I.4.2.1. Amélioration de la digestibilité du lactose :

Libération de lactose lors de la destruction des bactéries lactiques pendant le transit. Le lactose serait libérés dans l'intestin grêle et garderait une activité permettant l'hydrolyse du lactose pendant au moins 12 heures.

I.4.2.2. Amélioration de la digestibilité de la matière grasse :

Bien que l'activité lipolytique des bactéries lactiques soit peu élevée, il ya une augmentation significative de la teneur en acides gras libre dans le yaourt, de plus l'homogénéisation améliore la digestibilité en augmentant la surface des globules. (Michel .M ,2000)

I.4.2.3. Activité antimicrobienne :

Le yaourt à un rôle préventif contre les infections gastro-intestinales, l'intérêt du yaourt dans le traitement des diarrhées infantiles a été démontré par de nombreux auteurs, en dehors de l'acide lactique, les bactéries du yaourt produisent des substances antimicrobiennes et des pro biotiques. (Debry,et Coord, 2000)

1.5. Description du processus de fabrication du yaourt : le processus de fabrication d'un yaourt est présenté dans le tableau ci après

Tableau (02) : La technologie de fabrication du yaourt (Christian, et al., 2001)

Opération	Explication et commentaires	Technologie
Contrôle du lait Filtration	Mesure de la densité et du degré Dornic Mesure de volume	Filtration sur Tamis
Ecrémage facultatif	Une écrémeuse manuelle ou Electrique permet de séparer la Crème du lait écrémé	
Ajout dans le lait 1-Le sucre	Mélange énergiquement pour bien Diluer le sucre dans le lait	
2-Les aromes et les colorants	Les aromes et les colorants sont Ajoutés après le traitement thermique. Ils permettent de proposer une Grande variété de caillé avec des Couleurs et des parfums différents Les aromes et les colorants sont importés et ils sont relativement couteux	Pour les yaourts brass Ajouter de 12 à 20% de Sucre Pour yaourts étuves : De 8 à 10%
Traitement thermique	La pasteurisation va permettre la Destruction de tous les germes pathogènes Et indésirables (bactéries, levures, Moisissures)	
Refroidissement	Le lait est ensuite refroidi à la température D'ensemencement des bactéries du yaourt 38 à 45 °C.	Pasteurisation à double Paroi

Ensemencement	<p>Utilisation des ferments lyophilisés pour Ensemencement direct.</p> <p>Le yaourt du commerce est utilisé comme Ferment (1 à 2 pots de yaourt de 125 ml Pour 10 litres de lait)</p>	<p>Le taux est de 8 à 10 Unités pour 100L de lait</p> <p>Le mélange est soumis à Une agitation Lente</p> <p>Pendant 1h jusqu'à Acidité de 25 à 30°D.</p> <p>Attention à la qualité des produits</p> <p>.La réussite de vos fabrications va dépendre de la qualité des ferments utilisés dans la fabrication du yaourt acheté</p>
	<p>Yaourt ferme mise en pot</p>	<p>Le laitensemencé est directement Conditionné dans les emballages destinés aux consommateurs (des pots ou des sachets plastiques)</p> <p>Les pots ou récipients remplis sont déposés Dans des casiers et placés en bain- marie ou encore dans les étuves pour incubation</p>
Incubation	<p>Incubation en bain-marie présente des avantages :</p> <ul style="list-style-type: none"> -technologie facile ne demandant pas de matériel couteux -moins de consommation d'énergie -échange thermique plus rapide 	<p>Incubation à 43°C</p> <p>Pendant la fermentation 2h30-3h jusqu'à Formation du caillé (environ 0,9 acidité Lactique/100g-110 Dornic)</p>
Refroidissement	<p>Dès que l'incubation est terminée, il faut Refroidir énergiquement les yaourts Pendant environ 1h à 2h afin d'abaisser la Température du produit, ce refroidissement Rapide permet de bloquer l'acidification et d'éviter l'exsudation</p>	<p>Le refroidissement se fait Dans une chambre froide Ou dans congélation : Température : 4 à 6°C</p> <p>Max l'acidité finale ne doit</p>

	du sérum du lait	Pas dépasser 105 °D
Stockage	Les yaourts sont groupés par lot de vente après mise en carton .Ils passent en fin Dans les chambres froides de stockage	Température : 4°C en chambre froide
Yaourt brasé Incubation	Elle se fait intégralement dans la Cuve d'ensemencement, le caillage A donc lieu dans la masse et Non pas dans les pots individuels	L'incubation est réalisée à 43- 45 °C .Elle dure de 3h à 3h30 L'acidité finale est : 120- 130°D
Brassage et Refroidissement	Pour les ateliers disposant d'une cive De fabrication, après coagulation on Refroidit le produit en brassant le caillé Par une agitation lente et régulière Jusqu'à la température de moins De 6°C avant conditionnement A ce stade on peut ajouter les pulpes Ou les morceaux de fruits pour Les fabrications artisanales, il est Conseillé de refroidir à 4°C Avant brassage du caillé.	Pulpes : 2 à 5% Morceaux de fruits : 8 à 10 %
Conditionnement	Il se pratique comme dans La fabrication du yaourt étuvé (mise en pot)	La sou tireuse pour les yaourts aux fruits doit être muni de bec de plus grand dimension pour ne pas détériorer les morceaux de fruits

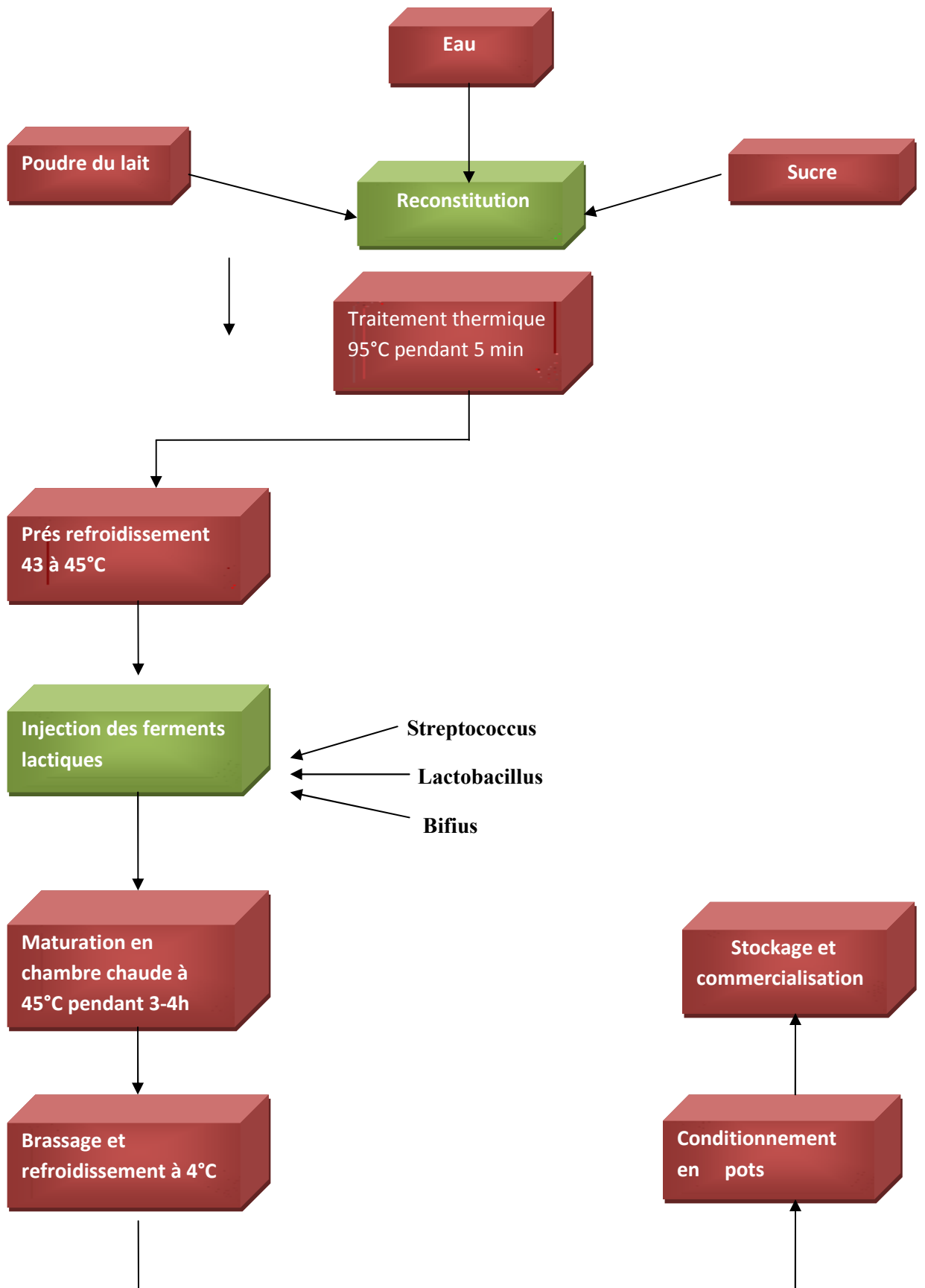


Figure N° (01) : Diagramme de fabrication du yaourt probiotique

1.6. La fermentation lactique :

Elle correspond à la fermentation du lactose du lait en acide lactique sous l'action de micro-organismes spécifiques appelés bactéries lactiques (*Lactobacillus bulgaricus* et du *Streptococcus thermophilus*), elle s'accompagne des modifications biochimiques, physico-chimiques et organoleptiques.

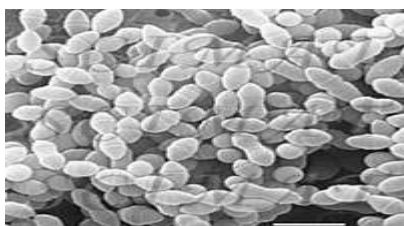


Figure : *Streptococcus thermophilus*



Figure : *Lactobacillus bulgaricus*

L'objectif de la fermentation lactique est tout d'abord d'augmenter la stabilité du produit, par inhibition des altérations microbiennes et enzymatiques, elle permet également d'obtenir des produits sains, c'est-à-dire exemptes des micro-organismes pathogènes, elle confère aux produits obtenus des propriétés nutritionnelles et organoleptiques particulières (arôme, texture, couleur). (Roissard. H et Luquet.F,1993)

• La fermentation est dite :

Homolactique : si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé.

(Bourgeoise.et al, 1996)

-Hétérolactique : si la production de l'acide lactique est accompagnée par la formation de l'acide acétique, éthanol, acétate et CO₂. (Novel, 1993)

Ces bactéries servent à des très nombreux procédés aussi bien dans la transformation du lait que dans la fermentation des végétaux.

I. 6.1. Distinction entre les deux souches :

- *Lactobacillus bulgaricus* : ne produit que l'acide lactique au cours de la fermentation du lactose, il se développe bien à la température de 40 à 45 °C en acidifiant fortement le lait jusqu'à 1,8% (pH 4,5) voire avec certaines souches jusqu'à 2,7% d' (pH 3,8 à 3,6) (Figure 02)

- *Streptococcus thermophilus*: se développe de 37 à 40°C ,mais croit encore à 50°C thermorésistant, il survit au chauffage à 65°C pendant 30 minutes ou à 74°C pendant 15 secondes, nettement moins acidifiant que le lactobacille, il produit généralement de 0,5 à 0,6 % d'acide lactique (pH voisin de 5,2) certaines souches capables de supporter un pH de 4,3 à 3,8.
(Novel, 1993)

I.6.2 .La croissance associative dans le yaourt :

Il y a de nombreux exemples d'association bactérienne dans les produits laitiers. L'exemple le plus classique est la symbiose observée dans le yaourt, avec *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*.

Cette association, appelée protocoopération est bénéfique pour les deux espèces, mais n'est indispensable ni à leur croissance ni leur survie. Dans une protocoopération, chaque espèce produit une ou plusieurs substances, absentes initialement du milieu de culture qui stimule la croissance de l'autre espèce.

Les *Streptococcus thermophilus* était stimulé par le *Lactobacillus bulgaricus* par production d'acide lactique aminé libre et de petits peptides incluant notamment la valine, inversement, le *Lactobacillus bulgaricus* voit sa faculté de produire de l'acide lactique en présence du *Streptococcus thermophilus* augmentée par la formation de petites quantités d'acide formique. (Deroissart, et Luquet, 1994) .

Les *streptococcus thermophilus* se développent plus rapidement et rend le lait anaérobie et légèrement acide, *lactobacillus bulgaricus* acidifie le lait, les deux espèces fermentent presque tous le lactose en acide lactique et parfument le yaourt avec du diacétyle (*streptococcus thermophilus*) ou de l'acétaldéhyde (*lactobacillus bulgaricus*). (Deroissart, et Luquet, 1994) .

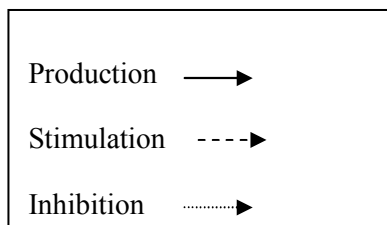
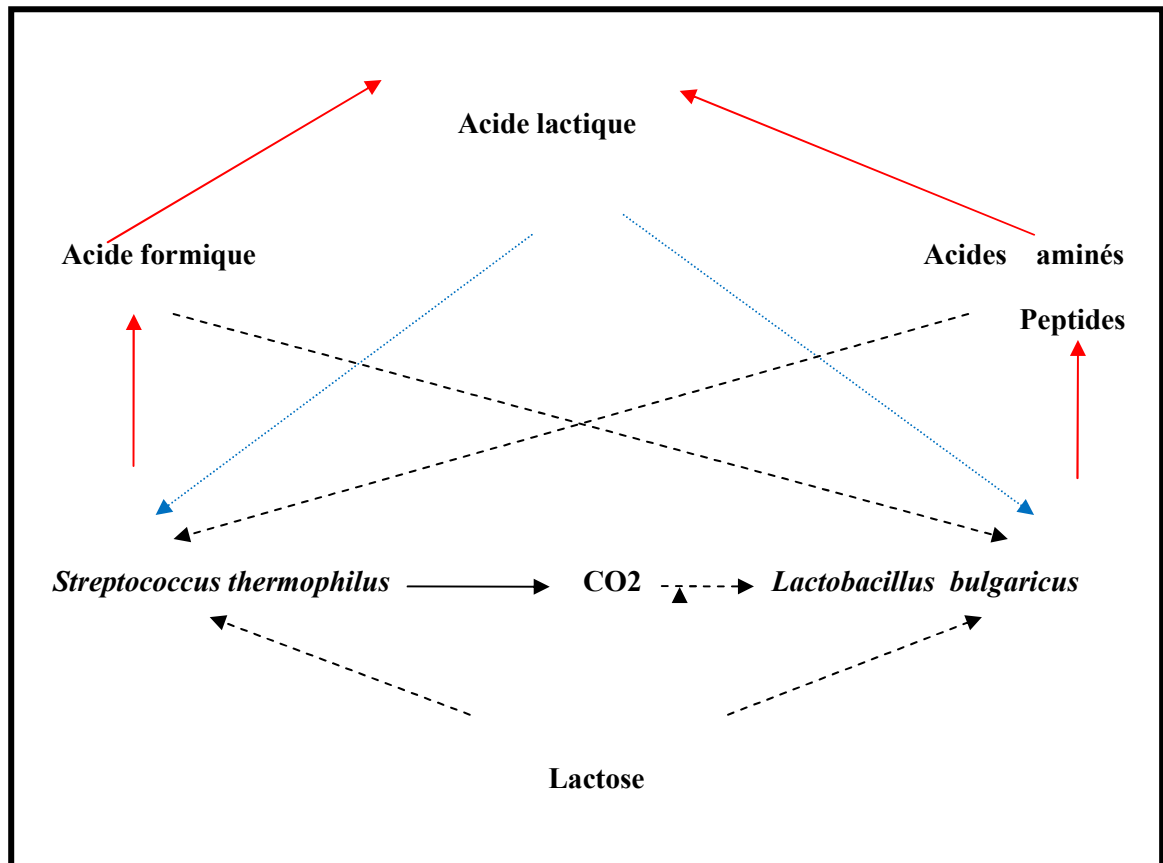


Figure (02) ; Schéma des interactions métaboliques *de Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* en culture mixte dans le lait (Mahaut, et al, 2000)

I.7. Action des bactéries lactiques :

➤ I.7.1. Production d'acide lactique :

La Production d'acide lactique est une des principales fonctions des bactéries lactiques en technologie laitière. Cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et antimicrobien. (Lenoire, et al., 1993)

Cette production d'acide lactique résulte de la dégradation d'une partie du lactose du lait « environ 30% », et aboutit à une forte diminution du PH inférieur à 4 dans le yaourt. (Alais et al., 2003)

➤ I.7.2. Activité protéolytique :

Les bactéries lactiques sont dotées de systèmes protéolytiques complexes par leur nature et leur localisation. **(Lenoire et al., 1994)**

En revanche, *L. delbruecki* subsp. *Bulgaricus* est beaucoup plus protéolytique. Ainsi ; il lui est possible d'hydrolyser les caséines en petits peptides et acides aminés assurant sa croissance et celle de *S. thermophilus* lorsqu'il s'agit de culture mixtes.

La formation de peptides hydrophobes responsables de défauts organoleptiques et notamment d'amertume dans le produit fini.

L'activité protéolytique globale des bactéries lactiques est considérée comme faible comparé à celle d'autres genres bactériens. **(Luquet et Corrieu, 2005)**

➤ I.7.3. Activité lipolytique :

Grâce à leurs lipases, les matières grasses et acides gras libres du lait sont décomposées, entraînant l'apparition d'odeur rance dans le produit laitier. **(Vignola, 2002)**

➤ I.7.4. Activité aromatique :

La fermentation lactique ne conduit pas seulement à la production d'acide lactique mais il y'a aussi formation de quantités plus ou moins de produits secondaires d'acétaldéhyde d'acétone et de diacétyl, qui sont en fait des composés aromatiques qui confèrent l'arôme aux yaourts. **(Lenoire et al., 1993)**

I.8. Aperçue économique sur les yaourts probiotiques :

La prise en compte du lien entre l'alimentation et la santé dans l'esprit du consommateur a augmenté considérablement, notamment en Europe. De plus en plus de gens adhèrent à l'idée qu'il est possible de réduire le risque de maladies et de demeurer en bonne santé en adoptant un style de vie sain donc une bonne alimentation. Le soutien actuel accordé à la promotion de certains produits alimentaires à effet santé et les progrès considérables de la connaissance de la microflore intestinale ont donné, au cours de ces dernières années, une véritable impulsion au secteur des aliments contenant des probiotiques. **(Pernoud.S, et al., 2005)**

✚ Les producteurs de ferments et de yaourts se sont associés afin d'introduire dans les laits fermentés des bactéries d'origine intestinale : les bifidobactéries et les lactobacilles, présentant un fort potentiel comme probiotique. Des yaourts qui en contiennent ont été mis sur le marché depuis longtemps en Europe et au Japon. A

l'heure actuelle, certaines estimations évaluent que 60% des yaourts vendus aux Etats unis, donc contenant des bactéries lactiques, pourraient être présumés à effet probiotique. (Pernoud.S, et al, 2005)

I.9.Bifidobactéries :

Les bifidobactéries ont été découvertes, au début du siècle, par Tissier. Les bifidobactéries ont été isolées à partir de selles d'enfants nourris au lait maternel. Tissier avait alors décrit ces organismes comme des bactéries anaérobies, Gram positif en forme de bâtonnet. Ces bactéries avaient alors reçu le nom de *Bacillus bfidus communis*. (Ballongue, 1993).

I.9.1. Morphologie

Les bifidobactéries sont des bactéries non-motiles et non-sporulantes. Lorsqu'elles sont isolées de solutions fraîches, elles sont souvent retrouvées sous forme de Y. Ces bactéries sont Gram-positif.

Les bifidobactéries sont des bactéries anaérobies strictes et ont un optimum de croissance entre 36- 38°C. Certaines espèces peuvent croître à des températures de 46.5 °C et pour la majorité des espèces, il n'y a pas de croissance à des températures de 20°C et moins. Les bifidobactéries ont un pH optimum de croissance entre 6 et 7 et à un pH de moins de 5.5, il n'y a pas de croissance observée (Rasic et Kurmann, 1983).

I.9.2.Métabolisme

La majorité des bifidobactéries utilisent le lactose, le glucose, le galactose, le sucrose et le fructose comme sources de carbone. L'ammoniac est la seule source d'azote utilisée par la majorité des espèces de bifidobactéries. Contrairement aux autres bactéries lactiques qui dégradent le glucose via le système glycolytique ou encore par la voie des hexoses monophosphates, les bifidobactéries dégradent le glucose par la voie du fructose-6-phosphate. La dégradation du glucose par cette voie est rendue possible grâce à l'enzyme fructose-6-phosphate phosphocétolase, qui est particulière aux bifidobactéries et qui scinde le fructose-6-phosphate en acétylphosphate et en érythrose-4-phosphate (Rasic et Kurmann, 1983).

La voie métabolique du fructose-6-phosphate phosphocétolase produit de l'acide lactique et de l'acide acétique comme métabolites primaires en proportion de 2 :3 (De

Vries et al., 1967). Toutefois, certaines souches de bifidobactéries vont produire plus d'acide acétique et moins d'acide lactique. Le surplus d'acide acétique formé provient d'une autre voie métabolique des bifidobactéries qui convertit le pyruvate en acide formique et en acétate plutôt qu'en acide lactique. Par la suite, une partie de l'acide acétique est transformé en éthanol (**Lauer et Kandler, 1976**).

I.9.4 Effets probiotiques de la présence des bifidobactéries

Plusieurs rôles sont attribués à la présence des bifidobactéries. Un des rôles les plus importants des bifidobactéries, est l'adhésion de celles-ci aux cellules épithéliales de l'intestin ce qui permet de créer une niche écologique et ainsi d'empêcher l'invasion de bactéries pathogènes. Certaines études ont été faites sur l'effet de l'administration de comprimés de bifidobactéries à des gens ayant la diarrhée et il a été remarqué que l'ingestion de ces comprimés aidait à diminuer les symptômes. L'équipe de (**Tojo et al., 1987**) avait remarqué que les personnes atteintes d'entérites causées par *Compylobacter* guérissaient plus vite lorsque des comprimés contenant *Bifidobacterium breve* leur étaient administrés.

(**Romond et Romond ,1989**) ont aussi constaté l'effet positif de l'administration d'un lait fermenté avec *B. longum* sur la disparition d'un rotavirus. Il a aussi été remarqué que les bifidobactéries ont un rôle nutritionnel car elles produisent des vitamines du groupe B, des acides aminés tels que la valine, l'alanine, l'acide aspartique et la thréonine.

Les bifidobactéries produisent seulement de l'acide lactique L+ qui est complètement métabolisé par L'humain. (**Rasic et Kurmann, 1983**). Il est aussi reconnu que les bifidobactéries ont un effet probiotique qui est imputable à leur métabolisme. Ainsi, il a été reconnu que la présence de bifidobactéries chez l'humain diminuait l'intolérance au lactose. De plus, la teneur en lactose des produits laitiers fermentés par des bifidobactéries est moins importante que les produits fermentés sans bifidobactéries ce qui rend ces produits attrayants pour les gens souffrants d'intolérance au lactose. Ainsi, il a été remarqué par (**Roy et al., 1997**) que la teneur en lactose d'un yaourt fait avec *B.infantis* était 40% moins importante que pour le yaourt sans bifidobactéries, après une journée d'entreposage. La présence des bifidobactéries permet aussi de réduire le niveau de cholestérol sérique. Les bifidobactéries aident à la déconjugation des acides biliaires,

la réduction des nitrosamines et l'inhibition de la réduction des nitrates (**Nagengast et al.,1988**) .

Chapitre II :

Le miel

II. Les produits apicoles

II.1. Description et composition

II.1.1. Le miel

Le miel est la substance naturelle sucrée produite par l'abeille *Apis mellifera* à partir soit du nectar de plantes, soit de sécrétions provenant de parties vivantes de plantes ou soit d'excrétions d'insectes butineurs laissées sur les parties vivantes de plantes. C'est ainsi que les abeilles butinent, transforment en les combinant avec des substances spécifiques qu'elles sécrètent elles-mêmes, déposent, déshydratent, emmagasinent et laissent affiner et murir dans les rayons de la ruche (**Codex Alimentarius, 2001**).

Mise à part du miel produit par l'espèce *Apis mellifera*. Les miels fabriqués par d'autres espèces proches de l'abeille domestique telles que *Apis cerana* et *Apis dorsata*, ou encore par les abeilles mélipones et les bourdons, seront obligatoirement identifiés autrement, leur composition en sucres étant très différente (**Joshi et al., 2000**)

II.1.2. La propolis

C'est une substance résineuse recueillie par les abeilles sur les bourgeons de certains arbres. La propolis possède environ 150 constituants parmi lesquels des vitamines A et B, des acides aminés et d'oligoéléments. La butineuse récolte la propolis sur les bourgeons particulièrement des peupliers, des frênes et des marronniers. Elle la transporte sur ses pattes arrières. Les boules sont petites de couleur variable allant du jaune clair au vert brun. (**Le Conte, 2006**).

II.1.3. La cire

La cire est une matière molle, jaunâtre et fusible produite par les glandes cirières des ouvrières que l'abeille utilise pour construire des cellules hexagonales. Ces dernières contiennent selon les besoins de la ruche, le couvain, le miel ou le pollen. Elle l'utilise également en fine couche pour operculer les alvéoles contenant le couvain et le miel. Il faut rappeler que la cire est un corps chimiquement très stable, résistant à l'hydrolyse et l'oxydation et est totalement insoluble dans l'eau. (**Le Conte, 2006**).

II.1.4.Le Venin

Le venin d'abeille est une sécrétion produite par les glandes à venin stockée dans une poche spécifique et injectée au travers du dard lors de la pique. Seuls les individus femelles de la ruche en produisent qu'elles l'utilisent pour défendre la ruche contre les envahisseurs, les pilliers et les prédateurs (**Le Conte, 2006**). Grace à sa composition complexe (eau, phospholipase, A2, hyaluronidase, phosphate, melittine, histamines...). Le venin est produit très intéressant pour l'homme puisqu'il active la circulation sanguine, régule la tension artérielle et augmente la fluidité du sang (**Le Conte, 2006**).

II.1.5.La gelée royale

Est le produit de sécrétion des glandes hypo- pharyngiennes qui se trouve dans la tête des abeilles ouvrières. Elle est produite du 2^{ème} au 15^{ème} jour après l'occlusion de l'abeille, lorsqu'elle est nourricière. La gelée royale est un concentré naturel d'acide aminés essentiels, de cocktail de vitamines (A, B, C, D, E), de sels minéraux, et d'oligo-éléments notamment le calcium, le fer, le cuivre, le phosphate et le potassium. Cette substance blanchâtre à consistance gélatineuse, acide et légèrement sucrée constitue la nourriture exclusive de toutes les larves âgées de 0 à 3 jours et de la reine pendant toute de son existence (**Le Conte, 2006**).

II.1.6.Le pollen

Le pollen constitue l'élément fécondant male de la fleur. Ce minuscule grain contenu dans les anthères, de couleur et de composition variable en fonction de l'origine florale. Parmi les micro éléments (3%) on trouve de nombreuses vitamines notamment A, B1, B2, B3, B5, B6, B6, B9, B12, C, D, E, H de l'acide folique, de la rutine, ainsi que des enzymes, des stérols, des flavonoïdes, des substances bactériostatiques et des facteurs de croissances, des pigments et des arômes (**Le Conte, 2006**).

II.2.Origine du miel :

Le miel est issu du nectar que les extraient des fleurs et amènent à la ruche dans leur jabot. Parfois, les abeilles récupèrent le miellat qui est fabriqué par certains insectes comme les pucerons à partir du nectar. Après passage du nectar ou miellat d'abeille en abeille, le miel apparait peu à peu grâce à l'ajout au nectar de sucs digestifs, de salive et

d'acide formique. Il faut encore attendre l'évaporation de l'eau et la transformation des sucres pour que le miel soit stocké dans les alvéoles de la ruche (**Anchling, 2005**).

II.2-1-Nectar :

Le nectar est sécrété par les glandes nectarifères des nectaires de la plante en quelques heures à quelques jours. En fonction de leur localisation, on distingue les nectaires extra-floraux, et les nectaires floraux, (**Pat Pacini, E et al., 2003**). Selon (**Adler ,2000**) et (**La Barrera et Nobel ,2004**). Les différences de composition des nectars des différentes espèces végétales peuvent être expliquées de deux manières :

- ✓ Soit les constituants du nectar reflèteraient la composition chimique de la sève élaborée et celle-ci varierait entre les espèces.
- ✓ Soit le processus de sécrétion des nectaires contrôlerait la composition chimique et varierait selon les espèces végétales.

En effet, la teneur du nectar en eau varie en fonction des plantes étudiées, ainsi le nectar contient entre 90 et 99% de sucres dans sa matière sèche (**Luttge, 1977**) et (**Vear et al., 1990**).

Les principaux sucres du nectar sont le glucose (a et b), le fructose et le saccharose. Leur proportion respective varie selon l'origine florale, plus précisément selon le processus de sécrétion des nectaires (**Ziegler, 1068**).

II.2.2.Miellat :

Plus complexe que le nectar, le miellat s'obtient par l'intermédiaire des pucerons. Ce dernier pique le végétal, se nourrit de sa sève et rejette l'excédent sous forme de gouttelettes sucrées qui se fixent sur les feuilles (**Clement, 2003**).

Le miellat par son gout agréable est très riche en sels minéraux et renferme une grande quantité des sucres supérieurs et peu de glucose et de fructose (**Mauzirio, 1968 et Doner, 1977**). Il est plus riche en azote (0,2 à 1,8%), en acide organique et en minéraux qui permet d'identifier les miels de miellat.

II.3.Types de miel

D'après (**Donadieu ,1984**), il existe des fortes nombreuses variétés de miel classées selon différentes façons dont on distingue :

➤ Selon l'origine sécrétoire :

- Les miels de nectar.
- Les miels de miellat

➤ Selon l'origine mono ou poly-florale :

- Les miels uni -floraux, eux-mêmes classés suivant l'origine botanique (miels d'acacia, de bruyère, de lavande, de romarin, de trèfle....)
- Les miels multi-floraux ou miel toutes fleurs, souvent classes suivant les lieux de récoltes (miels de plaines, de montagne, de foret....)

➤ Selon l'origine géographique :

- Le miel des plaines littorales (Mitidja).
- Le miel des plaines intérieures (Mascara).
- Le miel des vallées des grands oueds (Soummam).
- Le miel des régions montagneuses à population dense (Kabylie, Aurès).

II.4.Composition chimique du miel :

II.4.1.Composants majeurs :

II.4.1.1.Eau :

Selon (**Huchet et al.,1996**), l'eau est présente en quantité non négligeable puisque sa teneur moyenne est de 17,2%, mais comme le miel est un produit biologique, cette valeur peut varier. En fait, les abeilles operculent les alvéoles lorsque la teneur en eau avoisine 18%.

II.4.1.2. Glucides :

D'après (Louveaux ,1968) les glucides représentent de 95 à plus de 99% de la matière sèche des miels Parmi ces sucres, figurent le fructose et le glucose, que l'on trouve en quantité voisine dans les miels. Cependant, le rapport de la quantité de fructose sur la quantité de glucose est très important et varie de 0,76 à 1,76 environ, ainsi le saccharose dont la quantité peut aller jusqu'à 7% et le maltose dont la quantité varie de 2 à 7% (Khnefer et Fettal, 2001).

II.4.1.3. Composants mineurs :

Ce sont les acides, les protéines et aminoacides, les vitamines, les enzymes, les minéraux. Ces différents éléments ont été regroupés dans le **tableau N°03**

Tableau (03): les composants mineurs du miel.

Acides 0,3%	Protéines Amino- acides 0,4%	Vitamines	Minéraux 0,2%	Divers	Enzyme
Acide gluconique	-Matières albuminoïdes	-Thiamine	-Calcium	-Esthers volatiles	- Invertase
Ac.acétique		-Riboflavine	-Chlore	Acétylcholine	Amylase
Ac.citrique	-Matières azotées	-Pyridoxine	-Cuivre -Fer	-Pigments	Catalase
Ac.lactique	-Traces de :	-Acide pantothénique	-Magnésium	-Colloïdes	Phosphatase
Ac.malique	-Trypsine	AC.	-Manganèse	-Facteur antibiotique	Glucose
Ac.oxalique	-Leucine	ascorbique	-Phosphore		-oxyase
Ac.butyrique	-Hystidine	-Biotine	-Potassium		
Ac.pyroglutamique	-Alamine	-Ac- folique	-Silicium		
	-Glycine		-Sodium		
			-Soufre		

Ac-succinique	-Méthionine				
Ac-formique	-Ac. Aspartique				
HUCHET et al (1996)	KHENFER et FETTAL (2001)	LOUVEAUX (1968)	DONADIEU (1978)	KHENFER et FETTAL (2001)	LOUVEAUX (1985)

II.6. Propriétés nutritives

Le miel étant composé de sucres simples, il est facilement assimilé par l'organisme : il passe dans le sang très rapidement et la glycémie décroît ensuite lentement. Il est souvent utilisé par les sportifs pour sa valeur énergétique (310kCal/100g). Le miel est cependant moins calorique que le sucre (environ 405kCal / 100g), ce qui en fait un aliment apprécié des diététiciens (**Gout, 2009**). Il a été prouvé que le miel favorise aussi l'assimilation du calcium et la rétention de magnésium (**Chauvin, 1968**).

C'est un aliment très favorable à la croissance des jeunes enfants, et peut être introduit dans les régimes alimentaires même chez les diabétiques sous contrôle médicale. Il est également recommandé pour les personnes âgées (**Khnefer et Fettal, 2001**).

II.7. Propriétés thérapeutiques

D'après (**Magalon et Vanwijck, 2003**) et (**Bradbear, 2005**), le miel est antianémique, antiseptique, diurétique, énergétique, fébrifuge et sédatif de la toux. Il est très énergétique grâce aux glucides qu'il contient. Il permet de soulager les maux de gorge, les angines, le taux et les bronchites. En usage externe, il facilite la cicatrisation des brûlures et des blessures.

Le miel est excellent pour les cardiaques à condition de le consommer régulièrement. Il facilite la digestion et permet de réguler le transit intestinal. Il est donc efficace contre la constipation et la diarrhée. Il est efficace contre les insomnies. Le miel est un très bon remède pour soulager toutes les infections touchant l'estomac ou le foie

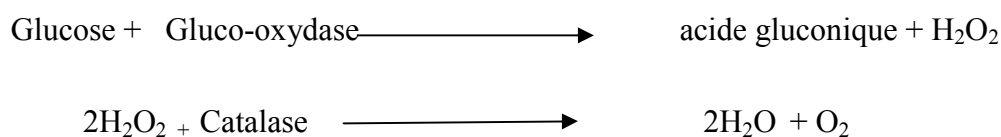
.C'est du au fait que les glucides du miel se mélangeant a nos enzymes se transforment en eau oxygénée (**Guarch , 2008 et Chanaud , 2010**) .

En effet, le miel est doué d'un pouvoir bactériostatique important, de par sa haute teneur en sucre (plus de 95% de la matière sèche) . sa faible teneur en eau libre (0 .5 a 0 .62%) et en humidité (14 a 20%), son acidité et la présence de substance a activité antibactérienne (peroxyde d'hydrogène libre et inhibine) (**Lavie, 1968 et Tomczak , 2010**).

II.8.Propriétés antimicrobiennes

II.8.1.Effet de peroxyde d'hydrogène (inhibine)

La principale « inhibine » que contient le miel est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) encore appelé eau oxygénée. Il est produit par réaction enzymatique (**Descottes., 2009**). C'est la gluco-oxydase sécrétée par les glandes hypopharyngiennes de l'abeille lors de la transformation du nectar en miel qui permet la réaction suivante :



La production d'eau oxygénée et d'acide gluconique résulte de l'oxydation de l'eau et du glucose. L'eau oxygénée produite a donc une origine végétale grâce au glucose provenant du nectar des plantes, mais sa formation implique une enzyme d'origine animale, la gluco-oxydase, qui est sécrétée par l'abeille. L'acide gluconique formé accroit l'acidité du miel et le rend peu favorable au développement des colonies bactériennes (**Descottes., 2009**).

Matériel et méthodes

La présente étude a été réalisée dans le laboratoire de microbiologie et physicochimie de la laiterie de Trèfle de Ben Boulaid (wilaya de Blida). Durant une période de 3 mois du mois d'Avril au mois de Juin 2013.

III.1.Objectif de l'étude

Nous rappelons que l'objectif principal est d'apprécier l'effet de miel sur la cinétique de croissance des bactéries lactiques. Sachant que nous testons l'introduction de miel dans les préparations de lait fermenté par des bifidobactéries en vue d'améliorer les aptitudes fermentaires de ces microorganismes et de produire un aliment probiotique et à la fois alicament.

III.2. Matériel

III.2.1 Matériel non biologique

L'ensemble d'appareillage, petit matériel (verrerie ; accessoires) et réactifs utilisés dans cette étude est donné dans l'annexe 01.

III.2.2. Origine du Matériel biologique

III.2.2.1. Le miel

Le miel utilisé dans cette étude est un miel local polyfloral d'Eucalyptus, de couleur jaune foncé (figure 06), récolté dans la forêt de Chréa (wilaya de Blida).



Figure 06 : Photographie originale du miel récolté dans la forêt de Chréa (w. Blida).

III.2.2.2 Microorganismes étudiés :

Les différentes souches de bactéries employées dans cette étude provenaient de la laiterie de Trèfle et obtenues sous forme lyophilisée. Les trois bactéries lactiques étudiées sont : *Bifidobacterium lungum* ; *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*.

III.2.2.3. Les milieux de culture

Le dénombrement de souche des bifides a été effectué sur milieu Columbia, milieu MRS pour dénombrement des *Lactobacillus bulgaricus*, et M17 pour les *Streptococcus thermophilus*.

III.3. Préparations lait-ferments-miel

Elle consiste à additionner en raison de 5 et 10% du miel par rapport à la masse de la poudre du lait et à suivre l'évolution de la cinétique de croissance des bactéries lactiques, leurs cinétique d'acidification et control du pH au cours de la fermentation et de stockage à +4 °C du produit. Sachant que l'additionnement du miel dans la masse blanche se fait dans des conditions stériles. Nous avons effectué quatre préparations :

- 1) La première préparation : Ajout de 5% du miel et l'additionnement des trois ferments lactiques dans le lait écrémé.
- 2) La deuxième préparation : Ajout de 10% et l'additionnement des trois ferments lactiques dans le lait écrémé.
- 3) La troisième préparation : Ajout de 10% du miel et inoculation de la souche de *Bifidobacterium longum* seule dans le lait écrémé.
- 4) La quatrième préparation : Nous avons préparé dans les mêmes conditions un témoin.

Après avoir ajouté le miel nous avons procédé à l'incubation du mélange à 44 °C à différentes doses et à des différents temps (T_0 , T_1 , T_2 , T_3 et T_4). Après chaque une heure d'incubation, des analyses microbiologiques (dénombrement des *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* et *Bifidobacterium lungum*) et chimiques (acidité, pH) ont été effectuées afin de suivre l'effet du miel sur la cinétique de croissance de ces trois ferments.

III.3.1. Démarche expérimentale

La démarche expérimentale adoptée pour la réalisation de ce présent travail renferme les 12 étapes suivantes :

- 1) Lavage et rinçage des bidons métalliques avec leurs couvercles à l'aide de l'eau et d'un détergent doux ;
- 2) Stérilisation des bidons hermétiquement fermés dans le four pasteur (stérilisation à la chaleur) pendant une heure à 180 °C .

- 3) Prélèvement de la poudre de lait écrémé à partir d'un sachet de 25 kg stocké dans un hangar de stockage de la poudre de lait (prélèvement près de la flamme à 20 cm au maximum, avec un ustensile de prélèvement stérile au four pasteur) ;
- 4) Récupération de la quantité nécessaire d'eau à partir du robinet du tank de l'eau de procès, à une température d'environ 45 °C dans un bidon métallique à fermeture hermétique stérile au préalable, après flambage du robinet, pour la reconstitution du lait du yaourt ;
- 5) Création d'une atmosphère stérile autour de la zone de préparation du yaourt par l'allumage de 3 becs bunzen sur la paillasse de la préparation ;
- 6) Reconstitution de lait : Le lait contient un mélange de deux poudres poudre de lait 26% de matière grasse et poudre du lait a (0% de matière grasse) ;
- 7) Mélanger la poudre de lait écrémé avec l'eau, selon les pourcentages dictés par la formule trouvée lors de l'étape des essais de formulation ;
- 8) Le lait reconstitué sera pasteurisé à 90 °C pendant 10 min ;
- 9) L'ajout du miel : Elle consiste à additionner en raison de 5 et 10% du miel par rapport à la masse de la poudre ;
- 10) Refroidir à 45 °C, puis très rapidement ensemencher aseptiquement le lait par les ferments et laisser le mélange pour fermentation dans un étuve à 45 °C jusqu'à ce qu'il arrive à l'acidité égale à 100 °D obtenue après 4 h de fermentation ;
- 11) Récréer une atmosphère stérile par l'allumage de plusieurs becs bunzen pour le remplissage des pots à 100 g, puis on fait une fermeture des pots de yaourt après le flambage du pot rempli ;
- 12) Stockage à +4 °C pour la conservation jusqu'à la DLC de ce yaourt qui a été déterminée à la fin du stockage (21 jours).

III.3.2 Différents contrôles effectués sur le yaourt étuvé

Première étape : Le contrôle de la matière première, qui a porté sur la caractérisation et le contrôle de l'eau de procès et la poudre de lait écrémé.

Deuxième étape : Le contrôle et la caractérisation des produits finis le jour de sa mise au point et au cours du stockage à +4 °C pendant 21 jours, il concerne :

- a- les critères microbiologiques,
- b- Les critères organoleptiques.

Troisième étape : Déterminer l'effet du miel sur la cinétique de croissance et d'acidification des bactéries lactiques au cours de la fermentation et stockage .

- a- Analyses microbiologiques (Dénombrements de la flore lactiques)
- b- Analyses physico-chimiques

III.4. Méthodes

III.4.1. Détermination de la cinétique de croissance

Un échantillon de 1 mL est utilisé pour préparer une dilution adéquate, permettant la détermination de la quantité de biomasse bactérienne (log UFC/ml). Les vitesses spécifiques maximales de croissance (μ_{max}/t) de chaque culture bactérienne pure ou mixte, additionnée ou non du miel; sont calculées selon l'équation donnée par (**Desjardins et al.,1991**).

$$\mu \max = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1);$$

III.4.2. Détermination de la cinétique d'acidification

Un échantillon est recueilli avant le démarrage (0 h), puis à chaque 1 h d'intervalle pendant la fermentation pour la mesure du pH et l'acidité. Les vitesses maximales d'acidification (pH max /t) de chaque culture bactérienne, additionnée ou non du miel; sont calculées selon l'équation donnée par (**Desjardins et al., 1991**).

$$\Delta \text{pH max}t = (\text{pH}_1 - \text{pH}_2) / (t_2 - t_1);$$

III.4.3. Suivi de la post-acidification du lait fermenté entreposé à +4 °C

La post-acidification des laits fermentés entreposés à +4 °C est suivie par la mesure du pH et l'acidité pendant 21 jours de conservation.

III.4.4. Détermination de la survie des souches dans le lait fermenté entreposé à +4 °C

Le nombre de cellules viables, déterminé 2 fois, est calculé à partir de colonies appropriées obtenues. Après incubation sur milieu adéquat et exprimé en log UFC/ml. Le premier dénombrement est effectué 24 h en fin de fermentation (analyse J1). Le taux de survie est calculé selon l'équation donnée par (**Ustunol et Gandhi ,2001**).

$$\text{Viabilité}\% = (\text{UFC à (n) semaine de stockage/de UFC initial}) \times 100$$

III.5. Protocole expérimental

Les différentes analyses effectuées au cours de cette étude sont présentées sous forme de diagramme (figure 7).

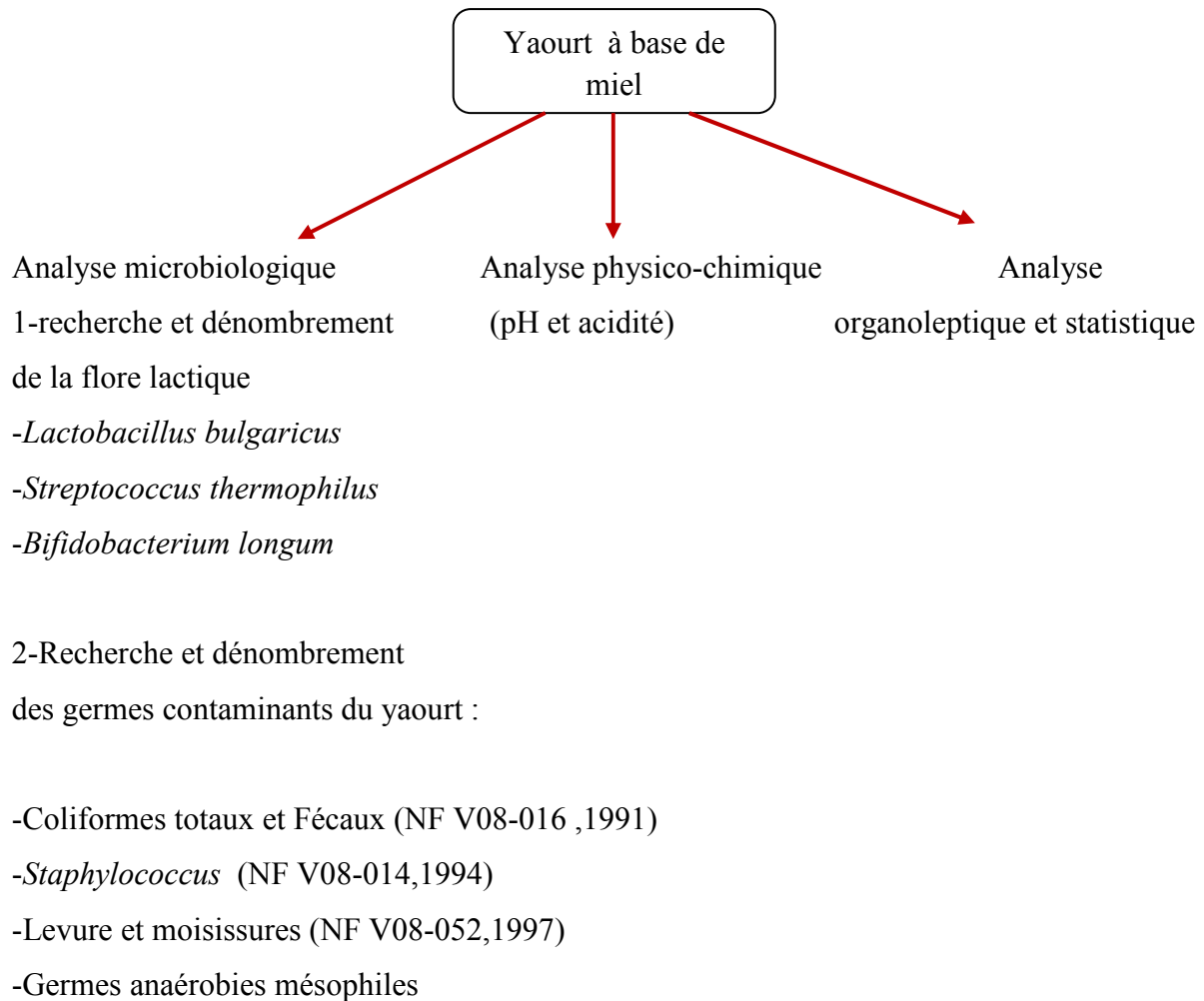


Figure 7 : Diagramme de différentes analyses effectuées sur le yaourt fabriqué à base du miel

III.6. Méthodes d'analyses

III.6.1. Analyse statistiques

Les essais réalisés sont bi factoriel, ceci nous permet de connaître l'effet du facteur sur le caractère étudié. Les facteurs introduits volontairement en vue d'en examiner l'effet sont le nombre UFC/ml en fonction du temps et de la dose : ceci est quantitatif.

Le dispositif expérimental qui nous a permis d'étudier le facteur suit une loi de randomisation totale.

L'élaboration du plan expérimental est résumée comme suit :

1. 1^{er} facteur étudié ; le nombre d'UFC/ml en fonction du temps, T0, T1, T2, T3, T4.
2. 2^{ème} facteur ; le nombre d'UFC/ml en fonction de la dose, D0, D1, D2
3. Nombre de répétition ; deux répétition à partir d'un pot prélevé au hasard.

III.6.1.1. Interprétation des résultats

Les résultats d'essais sont analysés à l'aide d'un logiciel statistique qui est le STATISTICA version 6. Le test Spearman qui nous permet de déterminer la différence entre les moyennes des différents traitements est l'analyse de la variance en faisant sortir la probabilité du traitement.

L'interprétation consiste en premier lieu à examiner l'effet des facteurs étudiés par le test de signification.

Le seuil de signification retenu est 5%.

- ◆ Si la probabilité calculée est supérieur à 0,05, on admet l'existence d'un effet global est non significatif.
- ◆ Si la probabilité calculée est inférieur à 0,05, l'effet est significatif.
- ◆ Si la probabilité est de 0,00X, l'effet est hautement significatif.
- ◆ Si la probabilité est de 0,000X, l'effet est très hautement significatif.

Après le test de signification, si la probabilité est inférieur à 0,05, l'analyse sera complétée par l'étude de la plus petite différence significative.

III.6.2. Analyses microbiologiques

III.6.2.1. Principe

Les étapes de l'analyse microbiologique ont été effectuées successivement comme suit :

- 1) Le dénombrement de la flore spécifique comporte la préparation de la suspension mère au 1/10.
- 2) La préparation des dilutions décimales.
- 3) L'ensemencement sur milieux spécifiques de dénombrement et incubation à 37 °C.
- 4) La confirmation par examen microscopique des colonies développées.
- 5) L'expression des résultats.

III.6.2.2. Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales

a -Préparation de la suspension mère :

- Mélanger soigneusement le contenu du flacon de l'échantillon à analyser à l'aide d'une spatule stérile, puis peser 10 g de l'échantillon dans un flacon approprié amené à 50 ml avec l'eau physiologique.
- Homogénéiser pendant 1 min.
- Compléter à 100 ml avec le même diluant, on obtient ainsi la dilution 1/10.

b -Préparation des dilutions décimales

- Répartir le diluant préparé précédemment avec une pipette stérile de 10 ml à raison de 9 ml par tube, dans le premier tube, ajouter 1 ml de la suspension mère. Agiter pendant 10 secondes.
- Transférer 1 ml de ce premier tube dans le deuxième tube, en ayant soin de changer de pipette entre chaque dilution. Faire la même chose avec les autres tubes jusqu'à 10^{-8} .

III.6.2.3. Dénombrement

a -Dénombrement des *Lactobacillus bulgaricus* sur milieu MRS :

- ✓ Prendre 2 boîtes de Pétri de 90 à 100 ml de diamètre par dilution.
- ✓ Transférer dans chacune de ces boîtes, à l'aide d'une pipette stérile, 1 ml de la dilution appropriée.
- ✓ Couler dans chaque boîte 14 ml de milieu MRS fondu et laisser solidifier sur une surface froide.
- ✓ Placer les boîtes ensemencées dans une jarre pour culture anaérobie et ajouter la poudre de l'anaérogène.
- ✓ L'ensemencement se fait en double couche dans des boîtes de Pétri contenant la gélose MRS à pH= 5,4 et l'incubation est réalisée à 37 °C pendant 24-48 h.

- Dans ces conditions, *Lactobacillus bulgaricus* forme des colonies lenticulaires souvent polylobées de 1 à 3 mm de diamètre.

b -Dénombrement de *Streptococcus thermophilus* sur milieu M17 :

- ✓ Prendre 2 boîtes de Pétri par dilution.
- ✓ Transférer dans chacune de ces boîtes, à l'aide d'une pipette stérile, 1 ml de la dilution approprié.
- ✓ Couler dans chaque boîte 14 ml de milieu M17 fondu et laisser solidifier sur une surface froide
- ✓ Incuber 2 jours à 42 °C
- Dans ces conditions *Streptococcus thermophilus* forme des colonies lenticulaires qui sont déjà visible après 18 à 24 h d'incubation et qui atteignent en 48 h, de 1 à 2 mm de diamètre.

c -Dénombrement de *Bifidobacterium longum* sur milieu Columbia :

- ✓ Prendre 2 boîtes de Pétri par dilution.
- ✓ Transférer dans chacune de ces boîtes, à l'aide d'une pipette stérile, 1 ml de la dilution approprié.
- ✓ Couler dans chaque boîte 14 ml de milieu Colombia fondu et laisser solidifier sur une surface froide.
- ✓ Incuber 3 jours à 37 °C.
- Dans ces conditions *Bifidobacterium longum* formes des colonies blanches de forme allongée, lenticulaire qui sont déjà visible après 24 h d'incubation.
- Prélèvement dans les boîtes retenues pour l'expression des résultats : Un nombre de colonies correspondant à la racine carré de nombre totale de nombre, les étaler sur une lame porte objet ,colorer par la méthode de Gram pour vérifier qu'il s'agit soit de bacilles à Gram⁺ non sporulés dans le cas du dénombrement des lactobacilles, soit de cocci à Gram⁺, en chainettes ou en diplocoques dans le cas des streptocoque.

III.6.2.4. Choix de colonies pour l'expression des résultats

Un nombre de colonies correspond à la racine carré de nombre totale dénombré est retenu. Une petite fraction prélevée de chaque colonie est étamée sur une lame porte objet, colorer par la méthode de Gram pour vérifié qu'il s'agit soit de bacilles à Gram⁺ non sporulés dans le cas du dénombrement des lactobacilles, soit de cocci à Gram⁺ en chainettes ou en diplocoques dans le cas des streptocoques.

III.6.2.5. La confirmation par examen microscopique des colonies développées

Prendre au hasard des colonies caractéristiques et distinctes de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* et *Bifidobacterium longum* qui feront l'objet d'une identification morphologique qui se déroule comme suit :

- Etats frais : Déposer une goutte d'eau sur une lame contenant une colonie, une lame est ensuite appliquée sur la goutte, l'observation est réalisée au grossissement (X40)
Cet examen met en évidence la forme et le mode de regroupement.
- Coloration de Gram : pour confirmer que les bactéries lactiques ont une coloration G+, on a réalisé ce teste comme suit :
 - Réalisé un frottis qui consiste en un étalement de la colonie sur une lame
 - Effectuer un séchage par plusieurs passages de courte durée au dessus du bec bensen
 - Recouvrir la lame avec le violet de Gentiane pendant 1 minute
 - Rincer à l'eau
 - Découler avec l'alcool pendant 30 secondes puis rincer une deuxième fois a l'eau
 - Découler avec la Fushine pendant 1 minute
 - Rincer a l'eau puis sécher la lame
 - Observer au microscope a l'objectif (x100).Une goutte déposée entre le frottis et l'objectif donne une image plus nette.

III.6.2.6.Expression des résultats

La meilleure estimation moyenne N_x du nombre de colonie en se référant à la dilution la plus faible qui a été comptée (10^{-x}), qui est calculée à l'aide de la formule ;

$$N_x = \frac{N_x + N(x+1) + N(x+2)}{nx + 10^{-1} n(x+1) + 10^{-2}n(x+2)}$$

N_x , $N(x+1)$ et $N(x+2)$ étant respectivement le nombre de colonies comptées dans les deux boîtes de Pétri aux dilutions : 10^{-x} , $10^{-(x+1)}$ et $10^{-(x+2)}$, n_x , $n(x+1)$ et $n(x+2)$ étant respectivement le nombre de millilitreensemencés des dilutions 10^{-x} , $10^{-(x+1)}$ et $10^{-(x+2)}$.

La meilleure estimation du nombre N de bactéries présentes dans l'échantillon initiale est $N : N_x \times 10^X$ par millilitre de yaourt.

III.6.3. Recherches des contaminants :

III.6.3.1. Matières premières et produit fini

- **Recherche des germes aérobies mésophiles totaux (Bourgeois, 1980)**

- A partir des dilutions décimales allant de (10^{-3}) à (10^{-1}) , porter aseptiquement 1 ml dans chacune des boites de pétri vides préparées, puis ajouter environ 15 ml de gélose PCA préalablement fondue.
- Faire ensuite des mouvements circulaires en forme de « 8 », pour permettre le mélange de l'inoculum à la gélose utilisée, laisser les boites solidifier.
- Les boites sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures.
- Après incubation, dénombrer les colonies lenticulaires en masse (blanchâtres).

- **Recherche des coliformes (Guiraud, 1998) :**

- Prélever un échantillon de 10 g de yaourt qu'on déposera dans un flacon ou récipient approprié, contenant 90 ml
- Prendre deux boites stériles pour chaque dilution choisie. Transférer à l'aide d'une pipette stérile 1ml de chaque dilution au centre de chaque boite.
- Verser environ 15 ml du milieu VRBL dans chaque boite de pétri .Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu de culture et laisser le mélange solidifier.
- Après solidification complète, couler à la surface du milieuensemencé environ 4 ml du milieu VRBL. Laisser solidifier, retourner ensuite les boites ainsi préparées et les incuber dans l'étuve réglée à 37°C pendant 24h à 48h.
- Après incubation, on procède au comptage de colonies. Les colonies se présentent sous forme de colonies rouges foncées ayant un diamètre d'au moins 0,5 mm. Le mode de calcul diffère selon que le nombre de colonies obtenu pour les deux boites de la première dilution soit supérieur ou inférieur à 15 colonies ou encore nulle.
- Dans le premier cas, on procède de la même manière que celle effectuée pour le dénombrement des bactéries lactiques.
- Dans le deuxième cas, on calcul le nombre estimé de coliformes présents en tant que moyenne arithmétique des colonies comptées sur les deux boites à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\Sigma c}{V \times n \times d}$$

Dans le cas où le nombre est nul, on exprime le résultat par ; moins de 1 /d microorganisme par gramme de produit.

- **Recherche des coliformes fécaux :**

- Le dénombrement des coliformes fécaux diffère de celui des coliformes totaux uniquement par la température d'incubation.
- Les boîtes sont ainsi incubées à une température de 44°C pendant 24 à 48 h.

- **Recherche de *Staphylococcus aureus* ;**

- En ce qui concerne la prise d'essai ainsi que la préparation des dilutions, on procède de la même manière que celle effectuée pour le dénombrement des coliformes.
- Ouvrir aseptiquement le flacon contenant le milieu de Giolitti Cantoni pour y ajouter 15 ml d'une solution de Téliurite de potassium. Mélanger soigneusement le milieu est alors prêt à l'emploi.
- A partir des dilutions décimales retenues, porter aseptiquement 1ml par dilution dans un tube à vis stérile. Ajouter par la suite environ 15ml du milieu d'enrichissement et incubé à 37°C pendant 24 à 48 h.
- Les tubes ayant virés aux noires, seront présumés positifs. Pour s'assurer qu'il s'agit d'un développement de *Staphylococcus aureus*, ces tubes font l'objet d'une confirmation par isolement sur gélose Chapman, coulée en boîtes de pétri et bien séchées.
- Les boîtes seront incubées à 37°C pendant 24 à 48h.
- Le mode de calcul sera identique aux autres dénombrements. Il est à noter que les colonies caractéristiques se présentent sous forme de colonies noires ou grises, brillantes et convexes (1 mm à 1,5 mm de diamètre après 24h d'incubation et 1,5 mm à 2,5 mm de diamètre après 48h d'incubation).

- **Recherche des salmonelles (NF V08-013,1993) :**

La recherche des salmonelles nécessite l'application du protocole suivant

- Peser aseptiquement 25g de l'échantillon pour essai dans un flacon et 225 ml d'un milieu pré-enrichissement (eau peptonée tamponnée) et agiter pour disperser. Incuber les flacons préparés à 37°C durant 18 à 20h.

- Transférer à l'aide d'une pipette, 10 ml du milieu de pré-enrichissement incubé dans un flacon contenant 100 ml du milieu d'enrichissement sélectif Sélénite-Cysteine, incuber le milieu durant 18 à 24 heures à 42°C.
- Ensemencer avec une anse, à partir de la culture du milieu d'enrichissement, la surface d'une boîte de gélose au vert brillant et au rouge de phénol et d'une boîte de gélose Hecktoen, de façon à permettre le développement de colonies bien isolées. Incuber les boîtes à 37°C pendant 24h.
- Les colonies typiques de Salmonella peuvent être caractérisées comme suit :
 - Sur gélose au vert brillant/rouge de phénol, les colonies typiques de Salmonella sont roses bordées de rouge
 - Sur gélose Hecktoen, les colonies typiques de Salmonella sont grises bleues à centre noire.

• **Recherche des levures et moisissures (Guiraud, 1998)**

- Prélever un échantillon de 10g de yaourt qu'on déposera dans un flacon ou récipient approprié, contenant 90ml d'une solution peptone
- Prendre deux boîtes de pétri stériles. Transférer, dans chacune de ces boîtes, à l'aide d'une pipette stérile, 1 ml de la suspension mère.
- Couler dans chaque boîte environ 15 ml de la gélose Sabouaud ou OGA, mélanger soigneusement l'inoculum et laisser solidifier, en posant les boîtes sur une surface fraîche horizontale. Incuber les boîtes à 25 °C pendant 5 jours.

NB : Il est noté qu'à chaque détermination microbiologique effectuée, il faut veiller à préparer une boîte témoin avec environ 15ml du milieu utilisé et cela en vue de contrôler sa stérilité.

III.7. Analyses physicochimiques : (NF.v 05-101 Janvier 1974)

III.7.1. pH :

Le pH a été mesuré sur tous les échantillons à l'aide d'un pH mètre (Radiomètre, model PHM 85), la mesure a été prise après une attente de deux minutes afin de permettre la stabilisation de l'électrode.

III.7.2. Détermination de l'acidité titrable :

- a) **Principe :** Titrage de l'acidité par l'hydroxyde de sodium en présence de phénol phtaléine.
- b) **Mode opératoire :**
- Dans un Becher de 100 ml introduire 10 ml du produit bien mélangé
 - Ajouter quatre gouttes de la solution de phénol phtaléine.
 - Titrer par la solution d'hydroxyde de sodium de 0,9 N jusqu'à début de virage au rose.
- c) **Expression des résultats :**

L'acidité exprimée en acide lactique est donné par la relation suivante

$$\text{Acidité Dornic} = V \times 10$$

V : le volume en millilitre de solution d'hydroxyde de sodium 0,9N sachant que 0,1 gr d'acide lactique dans 1000 ml = 1 °D.

Tableau (4): Tableau résume l'analyse microbiologique effectuées sur la matière première et produit fini.

Produit	Germes recherchés	Milieu de culture utilisé	Incubation
<ul style="list-style-type: none"> • Poudre de lait • Produit fini 	Germes aérobies mésophiles totaux	PCA	30°C / 72h
	Coliformes totaux	VRBL	37°C/24h à 48h
	Coliformes fécaux	VRBL-Eau peptoné Kovacs	44°C/24h à 48h
	Staphylococcus aureus	Giolitti Cantonii, Chapman	37°C/24h à 48h
	Clostridium Sulfitoréducteur	VF	37°C/24h à 48h
	Salmonelles	SFB (enrichissement) Hektoèn	37°C/24h à 48h
	Levures et moisissures	Sabouraud	20°C/5j
<ul style="list-style-type: none"> • Eau de process 	Germes aérobies mésophiles totaux	PCA	30°C / 72h
	Coliformes totaux	BCPL	37°C/24h à 48h
	Coliformes fécaux	BCPL+ Schubert	44°C/24h à 48h
	Staphylococcus aureus	Giolitti Cantonii, Chapman	37°C/24h à 48h
	Streptocoques fécaux	Rothe+ Evalitsky milieu	37°C/24h

III.8. Méthodes d'analyses organoleptiques :

La composante hédonique de la qualité est très importante mais subjective et variables dans le temps, dans l'espace et selon les individus.

Elle est parfois considérée à la survie de l'individu, mais seulement envisageable en situation d'insuffisance alimentaire.

A l'échelle industrielle, la qualité hédonique est bonne quand elle satisfait les consommateurs à un moment donné, comme il est difficile de satisfaire tous le monde en même temps surtout lorsque le produit est vendu dans différentes régions (**Multon, 1992**).

Les tests de dégustations ont pour but d'apprécier la qualité du yaourt probiotique au miel tout en sachant que la notion de qualité est à priori subjective, puisque le principal instrument d'évaluation est le consommateur, car il est toujours influencé par le caractère organoleptique dont la texture, la couleur, l'odeur et l'aromatisation qui sont les points les plus importants sur lesquels se base le consommateur dans son jugement et qui le guident dans son choix, pour cela, un formulaire a été proposé pour l'examen organoleptique ou la distribution des notes est effectuée selon une échelle de 1 à 4 pour donner une appréciation du produit .

Les résultats sont exprimés sous forme des tableaux qui comparent la qualité du yaourt en cours de stockage.

Résultats et discussion

IV.1. Résultats des analyses microbiologiques et physico-chimiques

IV.1.1. Analyses microbiologiques

Tous les flacons utilisés dans nos expériences étaient des flacons en verre (Sendra *et al.*, 2008). Les flacons de verre sont toujours préférables aux pots en plastiques pour le stockage des laits fermentés et comme probiotiques car la viabilité est d'environ 30 à 70% plus élevée lorsqu'il est conservé dans les bouteilles en verre que dans des pots en plastique (Sendra *et al.*, 2008).

IV.1.2. Identification morphologique des bactéries lactiques

Les observations macro et microscopiques effectuées sur les colonies bactériennes ensemencé sur M17, MRS et Columbia permettent de confirmer qu'elles appartiennent aux espèces *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* et *Bifidobactérium longum*, cela permet de compter les bactéries recherchées, comme le montre le tableau suivant :

Tableau (5) : Les testes de confirmation des ferments lactiques

Souches	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Bifidobactérium longum</i>
Gram	+	+	+
Aspect des colonies	Blanche, ronde, plates ou lenticulaires	Crémeuses, lisses à contours irréguliers	Colonies blanches bien distinctes de forme allongées
Aspect des cellules	Coccies	Petites bacilles	Petites bacilles Coccoides
Mode de regroupement	Isolées en diplocoque ou en chainettes	Isolées en paires ou en petites chaines	Isolées

IV.2. Evolution de la cinétique de croissance des bactéries lactiques au cours de la fermentation

IV.2.1 *Streptococcus thermophilus*

Le **tableau 6** ci-dessous et la figure 7 montrent l'évolution de la cinétique de croissance de *Streptococcus thermophilus* dans le yaourt seul et yaourt additionnée du miel.

Tableau 6 : Evolution de la cinétique de croissance de *Streptococcus thermophilus* dans le yaourt seul et yaourt additionnée du miel.

Temps	Nombres des colonies de <i>Streptococcus thermophilus</i> $\times 10^6$ (UFC/ml)		
	Masse blanche sans miel	Masse blanche+ % de miel	
		5%	10%
T1	5,27 \pm 0,03	5,31 \pm 0,01	5,24 \pm 0,05
T2	5,38 \pm 0,02	5,38 \pm 0,01	5,34 \pm 0,02
T3	6,43 \pm 0,01	6,44 \pm 0,01	6,41 \pm 0,01

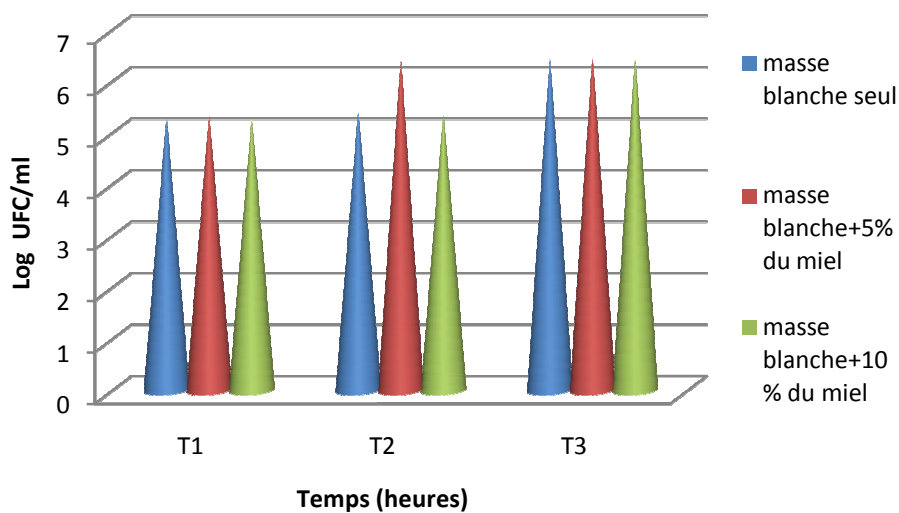


Figure 6 : Evolution de la cinétique de croissance de *Streptococcus thermophilus* dans la masse blanche seul et additionnée du miel

IV.2.2 *Lactobacillus bulgaricus*

Le tableau 7 et la figure 7 ci-dessous montrent l'évolution de la cinétique de croissance de *Lactobacillus bulgaricus* dans le yaourt seul et yaourt additionnée du miel.

Tableau 7 : Evolution de la cinétique de croissance de *Lactobacillus bulgaricus* dans le yaourt seul et yaourt additionnée du miel.

Temps	Nombres des colonies de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> x 10 ⁶ (UFC/ml)		
	Masse blanche sans miel	Masse blanche+ % de miel	
		5%	10%
T1	5,09 ± 0,02	5,07 ± 0,02	5,09 ± 0,03
T2	5,20 ± 0,03	5,18 ± 0,02	5,31 ± 0,01
T3	6,24 ± 0,03	6,21 ± 0,02	6,37 ± 0,01

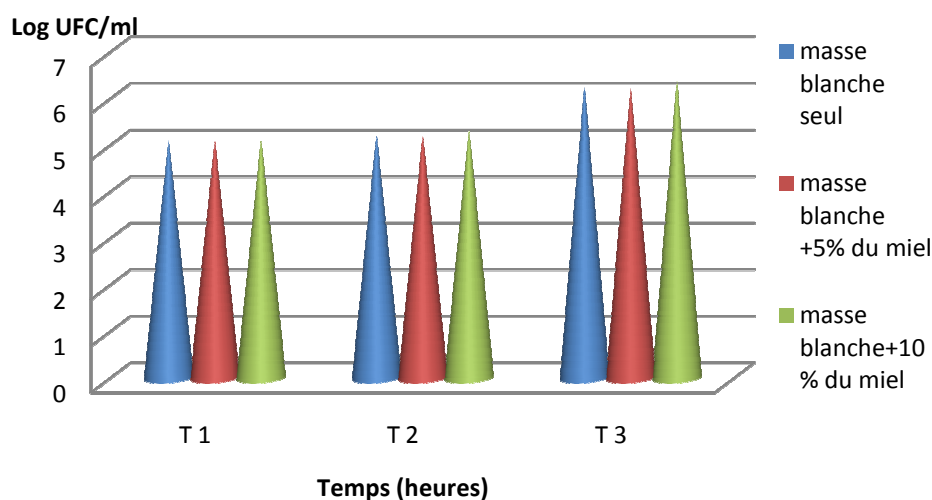


Figure 7 : Evolution de la cinétique de croissance de *Lactobacillus bulgaricus* dans la masse blanche seul et additionnée du miel.

IV.3. Discussion des résultats de la cinétique de croissance

En général la cinétique de croissance des espèces (*Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus*) augmente dans les trois premières heures au cours de la fermentation. On observe également que la cinétique de croissance des *Sc. thermophilus* débute rapidement et dépasse celle de *Lb. bulgaricus* ce qui peut être expliqué par la sensibilité de ce dernier à l'acidité du milieu.

L'évolution de la cinétique de croissance est plus importante lorsque toutes les espèces étudiées (*Lb. bulgaricus*, *Sc. thermophilus* et *Bf. longum*) sont cultivées sur le lait écrémé additionnée du miel que lorsqu'elles sont en présence du lait écrémé seul.

Le suivi de la cinétique de croissance des bactéries en présence ou en absence du miel dans le lait seul a montré un comportement différent de la flore bactérienne :

- La croissance de *St. thermophilus* dans la masse blanche seule augmente de $1,9 \times 10^6$ UFC/ml à $2,72 \times 10^6$ UFC/ml avec une vitesse de croissance de $0,58 \text{ Log UFC/ml.h}^{-1}$, alors qu'en présence du miel, la croissance bactérienne est :
- Avec 5 et 10% de miel, les quantités de biomasse atteintes en fin de la fermentation 6,44 et 6,41 log UFC/ml (Figure 7), avec une vitesse de croissance spécifique enregistrée de 0,56 et $0,58 \text{ h}^{-1}$.
- La cinétique de croissance de *L. bulgaricus* dans la masse blanche seule montre une augmentation de $1,25 \times 10^5$ à $17,9 \times 10^5$ UFC/ml, soit une moyenne d'accroissement de 5,51.
- Avec les différentes concentrations du miel, les quantités de biomasse marquées par les *L. bulgaricus* après 3 h de fermentation sont $1,64 \times 10^6$ et $2,36 \times 10^6$ UFC/ml et avec des vitesses de croissances comprises entre 0,57 et $0,64 \text{ h}^{-1}$.

IV.2.3 *Bifidobacterium longum*

Le tableau 8 et la figure 8 ci-dessous montrent l'évolution de la cinétique de croissance de *Bifidobacterium longum* dans le yaourt seul et yaourt additionnée du miel.

Tableau 8 : Evolution de la cinétique de croissance de *Bifidobacterium longum* dans le yaourt seul et yaourt additionnée du miel.

Temps	Nombres des colonies de <i>Bifidobacterium longum</i> 10 ⁶ (UFC/ml)			
	Masse blanche sans miel	Masse blanche+ % de miel		Masse blanche+ miel + Bifido en culture pure
		5%	10%	
T1	5,21 ± 0,05	5,09 ± 0,03	5,30 ± 0,01	5,28 ± 0,05
T2	5,25 ± 0,01	6,17 ± 0,01	6,36 ± 0,02	5,56 ± 0,02
T3	6,37 ± 0,04	6,4 ± 0,01	6,48 ± 0,01	6,35 ± 0,07

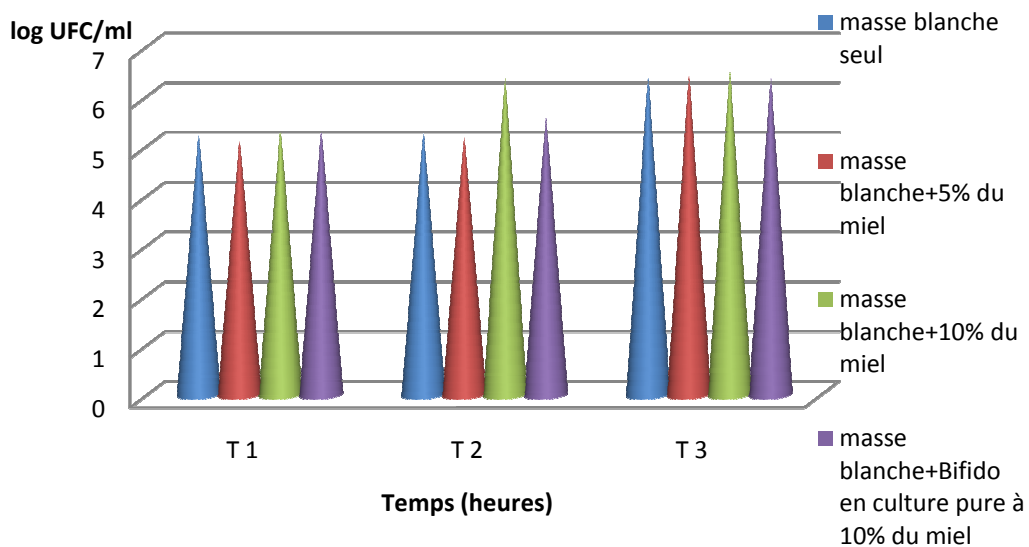


Figure 8 : Evolution de la cinétique de croissance de *Bifidobacterium longum* dans la masse blanche seul et additionnée du miel.

- La cinétique de croissance de *Bf. longum* qui est présent dans la masse blanche seule augmente en 3 h entre $1,65 \times 10^5$ à $23,7 \times 10^5$ UFC/ml, alors qu'en présence du miel de 5 à 10% de miel dans la masse blanche, on observe une augmentation de la cinétique de croissance après 3 h de fermentation ($2,56 \times 10^6$ et $3,05 \times 10^6$ UFC/ ml) respectivement, et avec une amélioration de la vitesse de croissance de 0,10 unités. En revanche, l'addition de *Bifidobactérium longum* dans le lait écrémé en culture pure à 10% du miel montre une augmentation remarquable de la biomasse bactérienne de *Bifidobactérium* entre $1,92 \times 10^5$ à 23×10^6 UFC/ml pendant 3 h de fermentation.

D'après les observations de la cinétique de croissance des bactéries nous pouvons dire :

- ❖ *Streptococcus thermophilus* réagit positivement avec la présence du miel à 5%, tel que le nombre d'UFC/ml en présence du miel à 5% à celui observé dans la masse blanche sans miel et par rapport à 10% du miel ce qui démontre que l'apport du 5% du miel accélère la croissance de cette bactérie, donc la variation est significative ($p < 0,05$) de l'effet de la dose du miel sur la croissance des *Streptococcus thermophilus*.
- ❖ *Lactobacillus bulgaricus* a été stimulée positivement en présence du miel (6,37 log UFC/ml) par rapport au témoin (6,24 log UFC/ml). Dans cette action, le miel utilisé à concentration de 10% améliore la capacité des souches de *Lactobacillus bulgaricus* à se multiplier et n'est pas inhibiteur. Nos résultats sont en accord avec ceux de (Chik et al., 2001) et (Ustunol et Gandhi, 2001). L'analyse de variance confirme une croissance significative ($P < 0.05$) concernant l'influence du miel sur la cinétique de croissance de *Lactobacillus bulgaricus*.
- ❖ La croissance du *Bifidobactérium longum*, est également influencée par la présence du miel, ainsi on observe qu'après 3 h d'incubation, nous avons enregistré des niveaux de biomasse remarquable (6.4 et 6.48 log UFC/ ml /respectivement selon les doses du miel apporté, la masse bactérienne de *Bifidobactérium* est significative ($P < 0.05$).
- ❖ L'effet stimulateur du miel a été attribué à son contenu en fraction Fructo-oligosaccharides (FOS) qui se trouve encore renforcé par les taux élevés de glucose et de fructose comme rapporté par (Kajiwara et al., 2002).
- ❖ Le miel stimule la croissance des Bifidobactéries par la présence des FOS, GOS et l'inuline.

Des yaourts sont faits à partir de la synergie entre les deux ferments *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* en présence du miel dont l'ensemble des

observations acquises sont : La croissance des deux bactéries *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* n'a pas été empêchée pour la présence du miel en effet, leur taux de croissance maximaux spécifiques ont été statistiquement influencés ($P < 0.05$), ces résultats sont en accord a ceux de (Riazzi et Ziar ,2008).

IV.4. Evolution de la cinétique de croissance au cours de la conservation

IV.4.1 *Streptococcus thermophilus*

Le tableau 9 ci-dessous montre l'évolution de la cinétique de croissance de *Streptococcus thermophilus* dans le yaourt seul et yaourt additionnée du miel conservé à 4 °C.

Tableau 9 : Evolution de la cinétique de croissance de *Streptococcus thermophilus* dans le yaourt seul et yaourt additionnée du miel conservé à 4 °C.

Temps	Nombres des colonies de <i>Streptococcus thermophilus</i> 10 ⁷ (UFC/ml)		
	Masse blanche sans miel (témoin)	Masse blanche +a % de miel	
		5%	10%
1 ^{er} jour	7,57 ± 0,04	8,37 ±0,04	8,48 ± 0,02
1 ^{ère} semaine	7,55 ± 0,02	7,54 ±0,02	7,48 ± 0,01
2 ^{ème} semaine	7,41 ±0,04	7,31 ± 0,01	7,25 ±0,02
3 ^{ème} semaine	7,39 ± 0,01	7,28 ± 0,02	7,24 ± 0,01

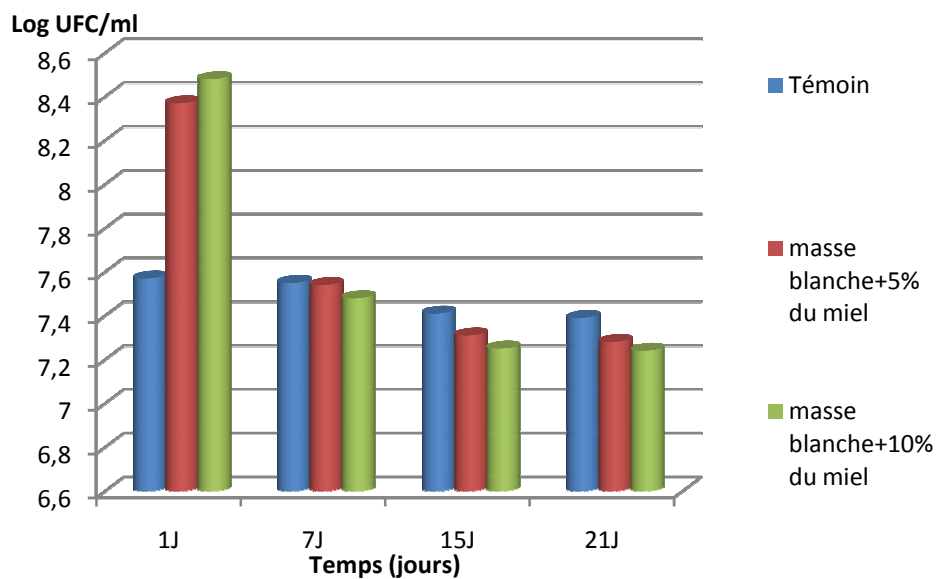


Figure 9 : Evolution de la cinétique de croissance de *Streptococcus thermophilus* dans la masse blanche seule et additionnée du miel conservé à 4 °C.

IV.4.2 *Lactobacillus bulgaricus*

Le tableau 10 ci-dessous montre l'évolution de la cinétique de croissance de *Lactobacillus bulgaricus* dans le yaourt seul et yaourt additionnée du miel conservé à 4°C.

Tableau 10 : Evolution de la cinétique de croissance de *Lactobacillus bulgaricus* dans le yaourt seul et yaourt additionnée du miel conservé à 4 °C.

Temps	Nombres des colonies de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> 10 ⁶ (UFC/ml)		
	Masse blanche sans miel (témoin)	Masse blanche +a % de miel	
		5%	10%
1 ^{er} jour	6,93 ±0,07	6,85 ± 0,01	6,89 ± 0,01
1 ^{ère} semaine	6,88 ±0,02	6,77± 0,12	6,8 ±0,01
2 ^{ème} semaine	6,75± 0,01	6,75± 0,02	6,8± 0,01
3 ^{ème} semaine	6,2 ±0,19	6,10 ±0,01	5,96 ±0,11

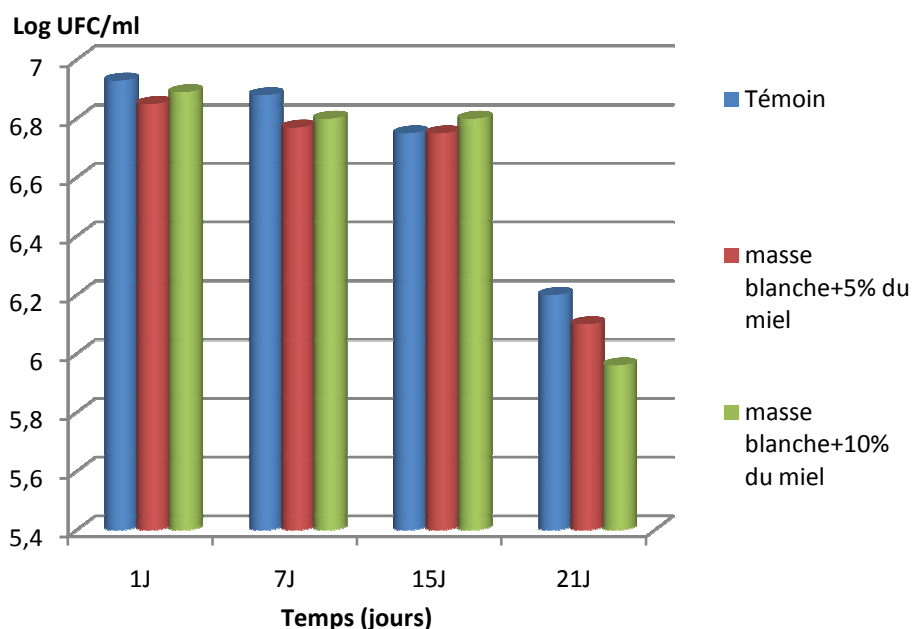


Figure 10 : Evolution de la cinétique de croissance de *Lactobacillus bulgaricus* dans la masse blanche seule et additionnée du miel conservé à 4 °C.

IV.4.3 *Bifidobactérium longum*

Le tableau 11 ci-dessous montre l'évolution de la cinétique de croissance de *Bifidobactérium longum* dans le yaourt seul et yaourt additionnée du miel conservé à 4 °C.

Tableau 11 : Evolution de la cinétique de croissance de *Bifidobactérium longum* dans le yaourt seul et yaourt additionnée du miel conservé à 4 °C.

Temps	Nombres des colonies de <i>Bifidobactérium longum</i> x10 ⁷ (UFC/ml)			
	Masse blanche sans miel (témoin)	Masse blanche a % de miel		Masse blanche+miel et Bifido seul
		5%	10%	10%
1 ^{er} jour	7,62 ± 0,04	7,69 ±0,01	7,76 ±0,01	7,67 ±0,01
1 ^{ère} semaine	7,59 ±0,04	7,67 ±0,02	7,59 ±0,01	8,21 ±0,02
2 ^{ème} semaine	7,3 ±0,02	7,39 ±0,02	7,52 ±0,02	8,26± 0,01
3 ^{ème} semaine	6,04 ± 0,05	7,26 ± 0,08	7,46± 0,01	9,41 ±0,02

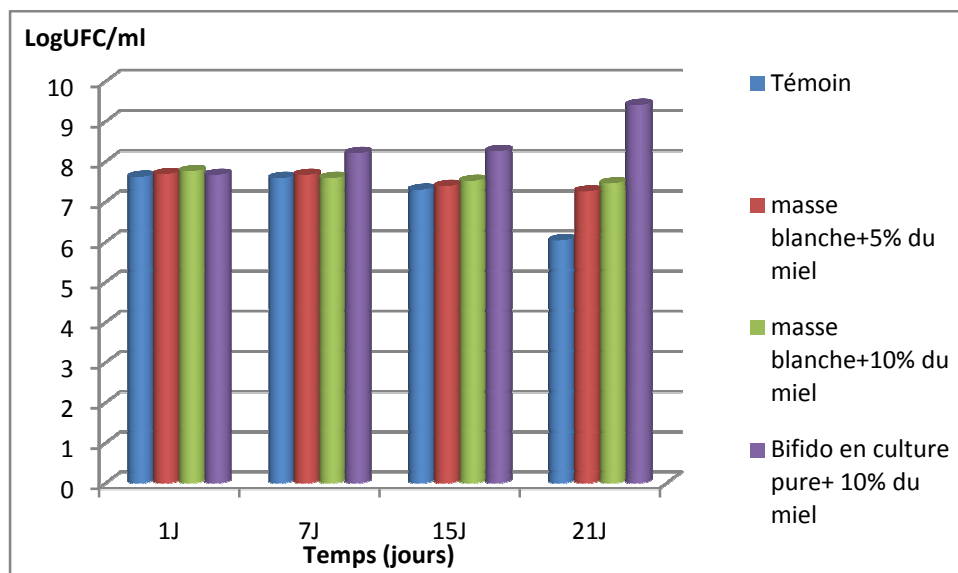


Figure 11 : Evolution de la cinétique de croissance de *Bifidobactérium longum* dans la masse blanche seule et additionnée du miel conservé à 4 °C.

IV.5. Viabilité des ferments lactiques dans le lait fermenté en présence de miel et conservé 21 jours à 4 °C

La conservation frigorifique à +4 °C est utilisée dans le but de garder un nombre minimum de cellules viables et qui est fixé à 10^6 UFC/ml par la législation (AFSSA, 2005). Le pH final du yaourt peut affecter la viabilité des souches bifides (Shah, 1995), et selon (Vinderola et al., 2000), un pH inférieur ou égal à 4.5, compromet la viabilité des microorganismes probiotiques dans les yaourts conservés à +5 °C.

Toutes les souches testées *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* et *Bifidobacterium longum* ont montré une meilleure viabilité après trois semaines d'entreposage à 4 °C dont nous avons remarqué :

- 1) La viabilité des cellules de *Lactobacillus bulgaricus* était environ 89% dans la culture témoin et 88% à 5% de miel et de 6 log/UFC/ml à 10% de miel avec le pourcentage de survie des cellules sont de 89% à 88% dans les laits fermentés sans miel et additionnés de miel ($P < 0.05$) et moins pour l'apport de 10% de miel.
- 2) Chez les *Streptococcus thermophilus* le miel diminue les pertes en biomasse lors de la conservation du lait fermenté à 4 °C ($P < 0.05$), d'une manière générale la perte de viabilité des souches *Streptococcus thermophilus* étaient élevée avec 5% et 10% de miel durant la première semaine avec un taux de viabilité (90% et 80%), respectivement.
- 3) Cette viabilité ne suivie qu'une semaine et diminue durant les 2 semaines après pour atteint 7.24 log/UFC/ml avec 10% de miel 7.28 avec 5% de miel.
- 4) L'amélioration de la viabilité des souches *Streptococcus thermophilus* en présence de 5% et 10% de miel en terme de pourcentage par rapport au milieu témoin était moindre ($p < 0,05$).
- 5) En revanche, le miel diminue les pertes en biomasse lors de la conservation du lait fermenté à 4 °C ($P < 0.05$), la perte de viabilité des souches Bifidobactéries était moindre en présence de 5% et 10% de miel par rapport au témoin, on observe des taux de biomasse remarquable sont de 7.26 log/UFC/ml et 7.46 log/UFC/ml respectivement,
- 6) avec une amélioration de la viabilité de l'ordre (14% à 17%) ($P < 0.05$) (Brumo et al, 2002) ont montré que la viabilité la plus élevée

- 7) des Bifidobactéries était de l'ordre de 75.3% quand les souches de *Bf. Longum* ont été testées avec le maïs à haute teneur en amylose.

Ces résultats corroborent avec des rapports récents (Alkalin, 2004) sur la propriété des (FOS) à stimuler la viabilité des bifidobactéries dans le lait écrémé reconstitué durant 4 semaines de conservation.

Le lait cultivé en *Bf. Longum* (culture pure) et en présence de 10% du miel confirme nos résultats d'où nous avons observé des quantités de biomasse de plus de 9 logUFC/ml. La viabilité des *Bf. Longum* en culture pure enrichi en 10% miel était significative ($p < 0,05$) par rapport au témoin. (Shin et al., 2000) ont observé dans le cas de deux souches de Bifidobactéries une meilleure viabilité à 4 °C et ceci quant le lait et additionné de 5% de FOS.

En général, la perte de viabilité des souches *Streptococcus thermophilus* qui était élevée avec 5 et 10% de miel durant la première semaine avec un taux de viabilité (90% et 80%), respectivement. Cette viabilité ne suivie qu'une semaine et va être diminuée durant les 2 semaines après et atteint 7.24 log/UFC/ml avec 10% de miel 7.28 avec 5% de miel. Nos résultats sont en accord avec la majorité des études de survie des probiotiques en présence des FOS.

IV.6. Résultats du contrôle microbiologique

IV.6.1. La détermination des germes contaminants :

Les résultats du contrôle microbiologique des germes contaminants des matières premières et produit fini sont montrés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Détermination des germes contaminants du yaourt au cours de sa production

Produit	Germes recherchés	échantillon	Normes selon (JORA, 1998)	
• Poudre du lait	Germes aérobies mésophiles totaux	Abs	$2 \cdot 10^5$ UFC /g	
	Coliformes totaux	Abs	1 UFC /g	
	Coliformes fécaux	Abs	Abs /g	
	Staphylococcus aureus	Abs	Abs /g	
	• Produit fini	Clostridium Sulfitoréducteur	Abs	Abs /g
		Salmonelles	Abs	Abs /25g
		Levures et moisissures	3 UFC/g	< 10 UFC/g
• Eau de process	Germes aérobies mésophiles totaux	Abs	< 10^2 UFC/ ml	
	Coliformes totaux	Abs	Abs / 100ml	
	Coliformes fécaux	Abs	Abs / 100ml	
	Staphylococcus aureus	Abs	< 10 UFC/ ml	
	Streptocoques fécaux	Abs	Abs / 100ml	

Les résultats microbiologiques des matières premières utilisés à la préparation sont conformes aux normes, ce qui indique une absence totale des germes d'indice de contamination fécale (*Coliformes totaux et fécaux*), des germes pathogènes (*anaérobies Sulfitoréducteur*) et saprophytes (FMA)

Les résultats des analyses microbiologiques de la poudre de lait au niveau de l'unité Trèfle montrent que les échantillons examinés, répondent aux normes fixes par la législation nationale du journal officiel de la république Algérienne

Selon (François et *al.*, 1986), la poudre de lait doit avoir un goût agréable, une bonne salubrité, une bonne qualité hygiénique et une bonne conservation de la valeur nutritionnelle.

Ces résultats sont dus au fait que cette eau avant son arrivée au niveau du robinet a subi des traitements tels que la pré-chloration, la filtration sur charbon actif, l'adoucissement, la désinfection aussi que le contrôle quotidien de l'eau pour détecter toute défaillance et le rectifier.

Selon Larpent, 1991, l'eau de reconstitution présente une grande proportion dans la composition du lait donc elle doit être de bonne qualité bactériologique, dépourvue de pesticides, et débarrassée de selles de chaux et de magnésium afin d'éviter l'entartrage des appareils et des conduites, avec une pureté chimique satisfaisante, dépourvue d'ions métalliques

La technique de dénombrement des coliformes d'une manière générale, des thermotolérants (coliformes fécaux) ou *E. coli* en particulier a pour but de déterminer une contamination fécale pour le produit testé. **(Joffin C et *al.*, 1999)**

IV.7. Résultats des analyses physicochimiques

IV.7.1. Evolution du pH du yaourt seul et additionnée du miel

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 13 et la figure 13.

Tableau 13 : Evolution du pH obtenu pour les 4 échantillons au cours de la fermentation de la masse blanche seule et additionnée du miel au cours de la fermentation.

Temps	Ph			
	Masse blanche sans miel	Masse blanche a % de miel		Masse blanche avec Bifido en culture pure
		5 %	10 %	
T ₀	6,49	6,38	6,34	6,33
T ₁	6,23	6,23	6,12	6,29
T ₂	5,60	5,01	5,70	6,21
T ₃	5,15	4,90	5,20	6,18
T ₄	4,77	4,70	4,84	6,14

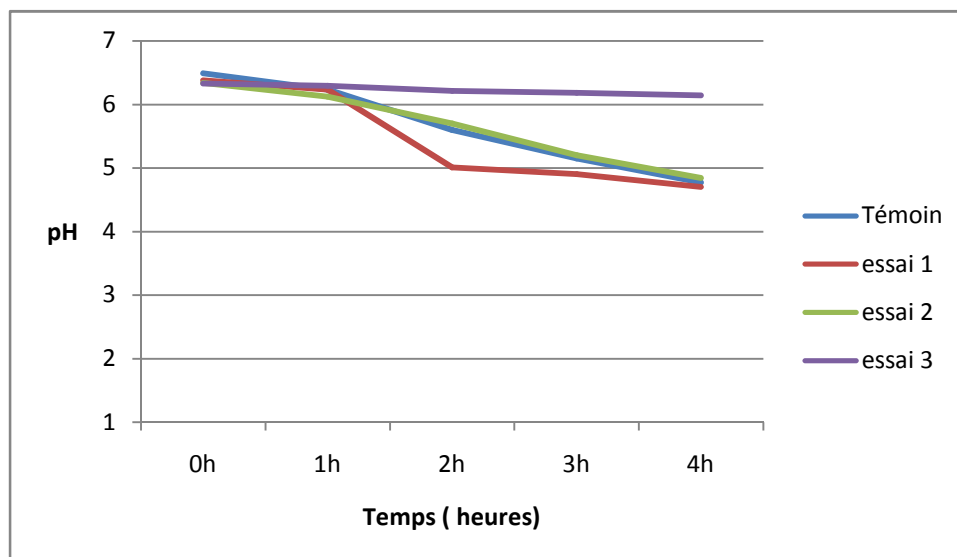


Figure 13 : Evaluation de pH au cours de la fermentation dans masse blanche seule et additionnée du miel

IV.7.2. Evolution de l'acidité titrable de la masse blanche seule et additionnée du miel

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 14 et la figure 14.

Tableau 14 : Evolution de l'acidité Dornic obtenu pour les quatre essais au cours de la fermentation dans la masse blanche seule et additionnée du miel

Temps	Acidité			
	Masse blanche sans miel	Masse blanche a% de miel		Masse blanche à Bifido seul
		5 %	10 %	
T ₀	20	24	26	25
T ₁	25	30	35	28
T ₂	44	84	56	38
T ₃	68	90	64	38
T ₄	80	93	81	40

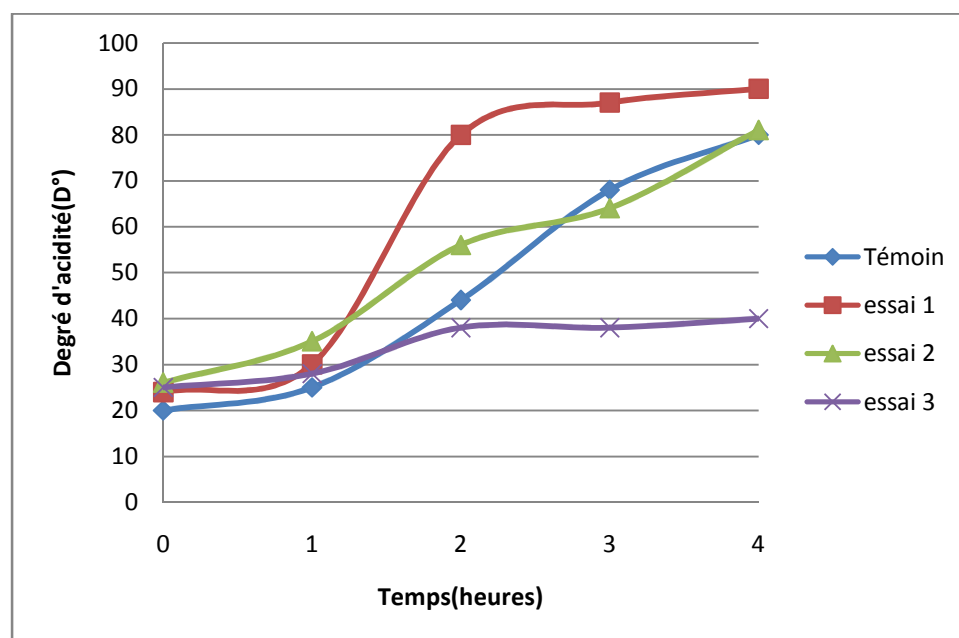


Figure 14 : Evolution d'acidité au cours de la fermentation dans la masse blanche seule et additionnée du miel au cours de la fermentation.

IV.7.3. Effet du miel sur la cinétique d'acidification

L'activité de synthèse d'acide organique traduite en terme d'abaissement des valeurs du pH, le miel de Eucalyptus (polyfloral) utilisé à 5% permet aux souches de *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* et *Bf. longum* de faire diminuer le pH du lait après 4h de fermentation à 4,7 par rapport au témoin et avec une vitesse d'acidification de 0,42 h⁻¹.

Dans le 1^{er} essai, le fait de doubler la concentration de miel dans le lait fermenté, le pH diminue, et nous avons enregistré des valeurs entre 6,34 à 4,84 après 4h de fermentation

En revanche , en culture pure, les bifides arrivent grâce au miel à donner un caillé de texture acceptable en un temps de fermentation remarquable, le miel utilisé à 10% avec la souche *Bf. longum* de faire diminuer le pH du milieu à 6,14 après fermentation.

D'après les résultats des figures (14 et 13), l'addition du miel dans le yaourt accélère la cinétique d'acidification, cette dernière est confirmée par l'évolution de croissance des bactéries.

Cette cinétique d'acidification a pour conséquence une accélération de la fermentation ainsi la durée de fermentation est plus courte en présence du miel, c'est-à-dire, le temps de maturation du yaourt est plus court en présence du miel. Sachant qu'à l'échelle industrielle la réduction de temps de maturation est très recherchée.

Nos résultats vont de pair avec ceux (d'Ustunol et Gandhi ,2001) et de (Chick *et al.*,2001). Tous ces résultats, s'accordent pour confirmer l'effet stimulateur du miel de l'activité acidifiante de ces bactéries. Selon (Roberfroid *et al.*,1998), les FOS accentuent plus l'acidification des milieux de culture que l'inuline.

IV.8. Evolution de l'acidité titrable au cours de stockage

Les résultats obtenus sont présentés dans les Tableaux 15 et 16 et Les figure 15 et 16.

Tableau 15 : Evolution de l'acidité titrable de la masse blanche seule et additionnée du miel au cours de stockage

Temps	Acidité			
	Masse blanche sans miel	Masse blanche + miel a %		Masse blanche +bifido seul
		5%	10%	
1 ^{er} jour	90	103	107	30
1 ^{ère} semaine	93	101	113	45
2 ^{ème} semaine	98	109	115	70
3 ^{ème} semaine	105	115	121	80

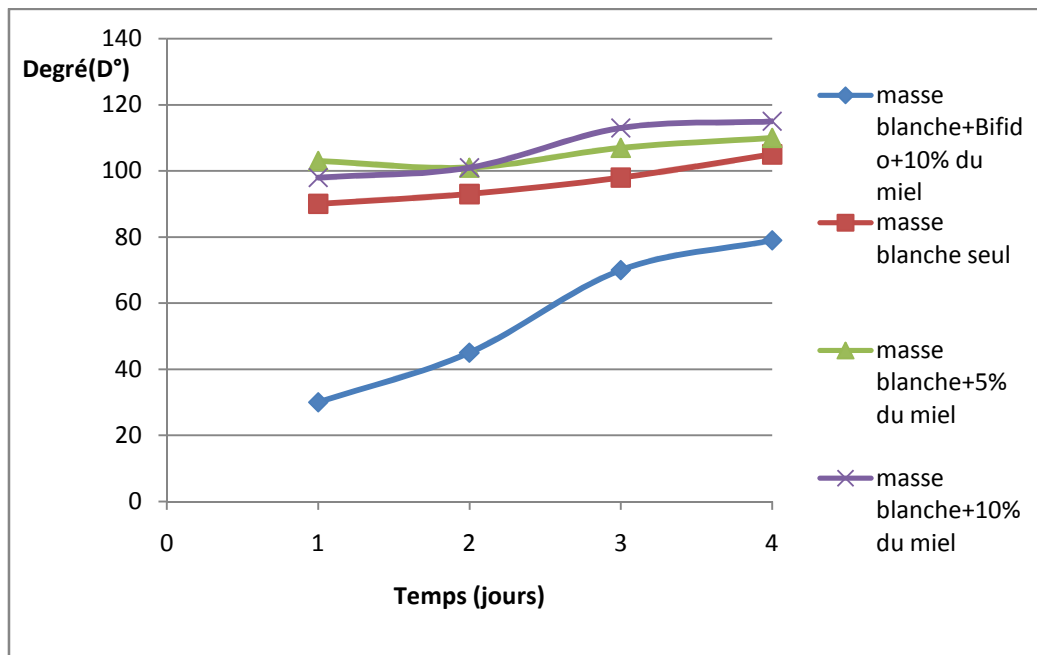


Figure 15 : Evaluation d'acidité titrable au cours de stockage dans la masse blanche et additionnée du miel

Tableau 16 : Evolution du pH dans la masse blanche seule et additionnée du miel au cours du stockage

Temps	Ph			
	Masse blanche seul	Masse blanche + miel a %		Masse blanche + bifido seul+10% miel
		5%	10%	
1 ^{er} jour	4,24	4,47	4,36	6,23
1 ^{ère} semaine	4,12	4,55	4,19	6,03
2 ^{ème} semaine	4,19	4,43	4,26	6,43
3 ^{ème} semaine	4,14	4,19	4,21	5,20

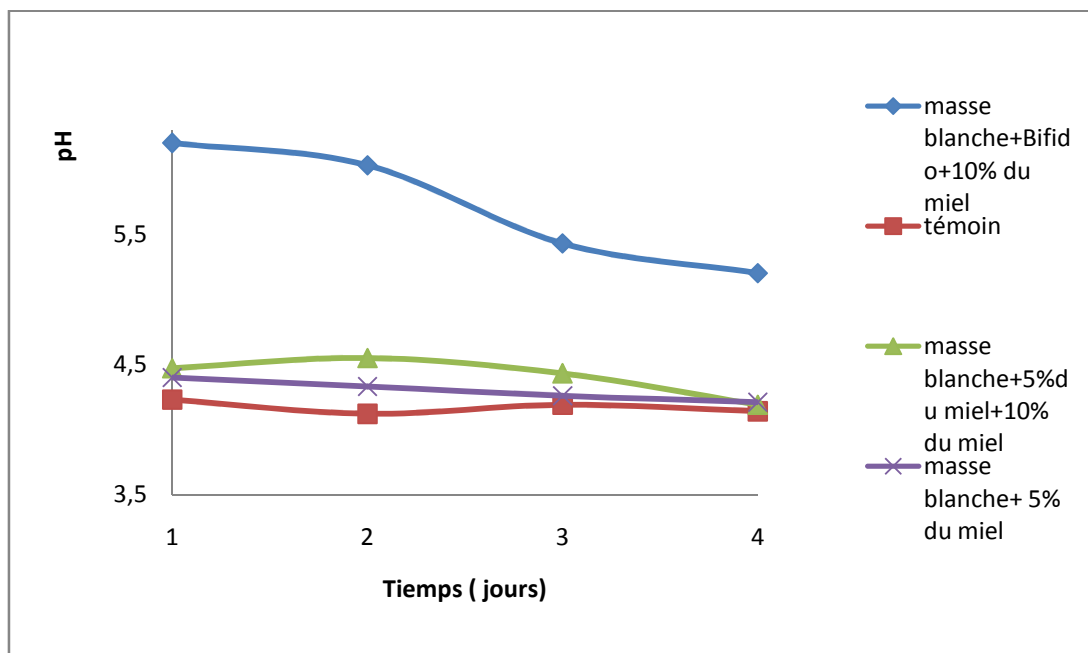


Figure 16 : Evolution du pH dans la masse blanche seule et additionnée du miel au cours du stockage

❖ Effet du miel sur l'activité post-acidifiante des bactéries lactiques

Après stockage, la variation de l'acidité s'est révélée au 21^{ème} jour, l'acidité du yaourt enrichi au miel augmente et atteint 105 D°, mais reste toujours conforme aux normes. Cette augmentation est due à la transformation du lactose en acide lactique qui rend le milieu plus acide, comme l'indique (Mahaut et al., 2000). Selon la FAO (2000), le maintien du yaourt à froid n'arrête pas complètement l'activité métabolique bactérienne bien que la production d'acide lactique soit lente.

A 5% de concentration de miel et contrairement au milieu témoin, semble maintenir son activité post acidifiante jusqu'au 21^{ème} jour d'entreposage où le pH qui diminue de 0.24 unité a tendance à augmenter légèrement. D'une manière générale, le miel qu'il soit polyfloral exerce un effet protecteur en conservant l'activité post-acidifiante des bifidobactéries testées.

Avec 10% de miel polyfloral, les souches de *Lb. bulgaricus*, *St. thermophilus* et *Bf. longum* restent toutes actives après 28 jours d'entreposage à 4 °C, en produisant de bonnes quantités d'acides organiques. Cette activité post-acidifiante a abouti à un abaissement de 0.15 unité pH, soit un effet double de celui observé avec 5% de miel. (Klaver et al., 1993) et Shah (1997), recommandent un pH supérieur ou égal à 4.6 pour maintenir la survie des bifidobactéries. Le miel aux concentrations de 5 ou 10% stimulent ($P < 0.05$) la capacité de croissance de toutes les souches étudiées et améliorent leur activité de synthèse d'acides organiques sur milieu lait. Le miel polyfloral à 5% de concentration exerce un effet protecteur en conservant l'activité post-acidifiante des souches testées. Avec 10%, seulement le miel exerce un effet stimulateur de l'activité acidifiante des souches durant 21 jours d'entreposage à 4 °C.

IV.9. L'évaluation organoleptique

Les résultats d'analyses de la qualité organoleptique de notre produit au cours du stockage sont représentés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Résultats d'évaluation organoleptique

caractère	Texture		Odeur		Aromatisation	
	Essai 1 (avec 5% de miel)	Essai 2 (avec 10% de miel)	Essai 1 (avec 5% de miel)	Essai 2 (avec 10% de miel)	Essai 1 (avec 5% de miel)	Essai 2 (avec 10% de miel)
Jours						
1 jour	Ferme douce(1)	Ferme douce(1)	Fraiche(1)	Fraiche(1)	Très bonne(1)	Très bonne (1)
7 jours	Ferme(1)	Cassante(2)	Fraiche(1)	Fraiche(2)	Bonne(2)	Bonne(2)
15 jours	cassante(3)	cassante(3)	Légèrement acide(2)	Légèrement acide(3)	Bonne(2)	Bonne(2)
21 jours	cassante(2)	cassante(2)	Légèrement acide(3)	Acide(4)	moyenne (2)	moyenne (3)

(1) : Très bon (2) : bon (3) : moyen (4) : médiocre

D'après les résultats obtenus nous constatons que :

- La texture est ferme au 1^{er} jour, ceci s'explique par le fait que la fermentation est arrivée à son stade final. On trouve que l'aspect est très bon, même l'aspect en bouche est souple. Durant la 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} semaine, le produit présente une bonne texture (cassante ou ferme) qui se modifie au cours 4^{ème} semaine de conservation.
- Concernant l'odeur, elle reste bonne durant les deux premières semaines du stockage, ceci est dû à l'arôme utilisé et à l'absence d'altération.

Selon (Leveau *et al.*, 1994), après la DLC, l'odeur commence à changer et devenant un peu forte (acide) à cause de l'évolution du taux d'acide lactique dans le yaourt. L'aromatisation est jugée très bonne durant la 1^{ère} semaine. Nous remarquons que l'aromatisation diminue progressivement jusqu'à la dernière semaine du stockage et selon (Loones, 1994), ceci est dû à l'activité aromatisante des ferments lactiques qui jouent un rôle important sur les propriétés organoleptiques du produit.

Le miel est un sirop contenant principalement le fructose (38.5%) et le glucose (31.3%) (Ustunol et Gandhi, 2001) et est marqué par sa richesse en enzymes, des vitamines et des oligoéléments en petites quantités et les minéraux tels que le magnésium, potassium et le calcium et un apport important des protéines.

Le miel est considéré comme un édulcorant normal provoquant beaucoup d'avantages (Bansal *et al.*, 2005). Les antioxydants tels que le peroxyde d'hydrogène et des composants de peroxyde de miel empêchent la croissance des *Listéria monocytogenes* et de *Staphylococcus aureus* aidant dans la conservation des aliments (Molan, 1992). Cependant, *Clostridium botulinum* peut être présent dans un peu en miel (Nevas *et al.*, 2005).

Du miel pourrait également être employé comme source normale potentielle des antioxydants pour réduire des effets négatifs d'oxydase de polyphénol brunissant en fruits et légumes (Chen *et al.*, 2000). On l'avère également abaisser des recensements des bactéries en produits frigorifiés de volaille et de pêches (Nagai *et al.*, 2006). De divers additifs sont employés dans l'industrie laitière afin d'améliorer les propriétés sensorielles positives de produits laitiers. Le miel, qui devient un ingrédient populaire en produits laitiers (Tamime et Robinson, 1985), a la capacité de réduire l'acidité des solutions qui peuvent augmenter l'acceptabilité chez le consommateur des produits acides tels que le yaourt (Varga, 2006).

Ainsi, une fois utilisé aux niveaux appropriés, le miel n'empêche pas la croissance des bactéries communes telles que *Streptocoque thermophiles*, *Lactobacillus bulgaricus*, subsp. *delbrueckii* et *Bifidobacterium longum* qui contribuent pour maintenir un appareil gastro-intestinal sain (Varga, 2006).

**Référence
bibliographique**

Références bibliographiques :

- ✚ **Adler L. S. (2000):** The ecological significance of toxic nectar. *Oikos*. 91:409 -420.
- ✚ **AFNOOR (1985) NF V 08-019:** technique de dénombrement des spores d'anaérobie sulfito-réducteurs
- ✚ **AFNOOR (1997) NF ISO 7954 ICV 08-052 :** Recherche et dénombrement des levures et des moisissures
- ✚ **AFNOOR (1996) NF V08-010 de Mars :** la technique des dilutions
- ✚ **Alais et al., (2003) :** Science du lait principe de technologie du lait 2^{ème} Ed Paris.
- ✚ **Anonyme, (1995) :** alimentation et nutrition, lait et produits laitiers dans la nutrition humaine, Ed FAO, pp 271 : 153-175.
- ✚ **Anonyme, (2001) :** Codex Alimentarius. Projet de norme révisée pour le miel, Codex stan 12-1981, Rev. 1(1987), Rev, 2(2001).µ
- ✚ **Anonyme , (2006) :**Science et avenir , juillet, 2006.
- ✚ **Anchling. F, (2005) :** Juin, sommet de développement des colonies, mais quid de la première récolte. *Revue d'abeille de France* n°915.P.7.
- ✚ **A.S. Akalin, S. Fenderya, et N. Akbulut, (2004):** Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligo-saccharide during refrigerated storage, *International Journal of Food Science and Technology*, 613–621 613
- ✚ **A. Samona, R.K. Robinson, et S. Marakis,** Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk, *Food Microbiology*, 13 (1996) 275–280.
- ✚ **Ballongue J,(1993) :** Bifidobacteria and probiotic action. Salrninen, Seppo and Wright, Atte von . *Lactic acid bacteria*. Marcel Dekker, inc ed. New York.; pp. 357-428.
- ✚ **Bansal V, Medhi B, Pandhi P,(2005).** Honey – A remedy rediscovered and its therapeutic utility. *Kathmadnu Univ. Med. J.* 3(11): 305-309.
- ✚ **Barrera E. et Nobel P. (2004):** Nectar; properties ; floral aspects, and speculations on origin. *Trends Plant Sci.* 9, 2, *Plant Science* 9.
- ✚ **Bourgeois. CM et Larpent JP., (1996) :** « Microbiologie alimentaire 2 ; les fermentations alimentaire » ; 2^{ème} édition ; Technique et documentation, Lavoisier(Parie).

- ✚ **Bourgeois CM., Mexele NP. Et Zucca J., (1996)** : « Microbiologie alimentaire : aspect microbiologique de la sécurité et la qualité des aliments ». Tome 1; édition Lavoisier Paris p 272 -292.
- ✚ **Bradbear N. (2005)** : Apiculture et moyens d'existences durables. Ed. FAO, Rome, pp. 96-221 .
- ✚ **Clement H. (2003)** : Crée son rucher. Ed. Rustica / FLER, Paris, pp 41-45.
- ✚ **Chanaud P. (2010)** : Les miels, variétés, bienfaits, recettes, Edition **Edisud**, Aix-en-Provence, 192 p.
- ✚ **Chauvin R. (1968)** : Action physiologique et thérapeutique des ^produits de la ruche. In : traité de biologie de l'abeille. Editions Masson et Cie, Paris, T.3., 379p.
- ✚ **Chen L, Mehta A, Berenbaum M, Zangerl AR, Engeseth NJ (2000)**. Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. J. Agri. Food Chem. 48: 4997-5000.
- ✚ **Christian.J et al., (2001)** : Auters ; jean Christian M'boya-transformation, Banyani,centrafirique, Ceale Broutim Philippe Duzez. GRT Saisie 10/11/2001
- ✚ **Codex Alimentarius, (2001)** :commission du Codex-Alimentarius, Edition FAO. OMS.
- ✚ **Debry.G et Cood, (2000)** : La nutrition et santé édition tec et doc, 2000.
- ✚ **Deroissard et Luquet, (1994)** : Bactéries lactique : aspects fondamentaux et technologiques, ed,lorica. Tom 1,1994.
- ✚ **Descottes. B. (2009)** : Le miel comme agent cicatrisant, thèse de doctorat en médecine, Université ToulouseIII-Paul SABATIER. Limoges62004.p 24-6-8-52.
- ✚ **De vries, W., Gerbrandy, Sj. J., et Stouthamer, A. H (1967)** :Carbohydate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. Biochim. Biophys Acta.; 136:4 15-425.
- ✚ **Doner I.W. (1977)** :The sugar of honey. Serv. Ed. Dep.Agri, 28,pp.443-456.
- ✚ **Donadieu, (1984)** : le miel thérapeutique naturel, l'expérience de 25ans, Phytothérapie, vol. 7, n°2, pp .112-116.
- ✚ **FAO, (2004)** : le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine.
- ✚ **FAO/OMS (2000)** : « codex alimentarius » volume 11,lait et produit laitier. Rome ; commission du codex alimentarius.
- ✚ **F.A. Bruno, W.E.V. Lankaputhra, et N.P. Shah**, Growth, viability and activity of *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing prebiotics, Journal of Food Science, 67(2002) 2740–2744.

- ✚ **F.A.M. Klaver, F. Kingma, et A.H. Weerkamp**, Growth and survival of bifidobacteria in milk, *Netherland Milk Dairy Journal*, 47 (1993) 151–164.
- ✚
- ✚ **Gout J. (2009)** : Le miel. Cuisine, santé et beauté. Ed. Cabédita, Yens sur Morges, 72 p.
- ✚ **Guarch C. (2008)** : Le miel, Cuisine, santé et beauté. Ed. Cabédita, Yens sur Morges, 72 p.
- ✚ **Guiraud (J.-P.). 1998** : Microbiologie alimentaire. Paris. Dunod, ; p. 615.
- ✚ **Guyot. A, (1992)** : Les yaourts DLC food. Tec.
- ✚ **H. Chick, H.S. Shin, et Z. Ustunol**, Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria in skim milk containing honey, *Journal of Food Science*, 66 (2001) 478-481.
- ✚ **H.S. Shin et Z. Ustunol**, Carbohydrate composition of honey from different floral sources and their influence on growth of selected intestinal bacteria: *An in vitro* comparison, *Food Research International*, 38(2005) 721 –728.
- ✚ **H.S. Shin, J.H. Lee, J.J. Pestka et Z. Ustunol**, Growth, activity and viability of commercial *Bifidobacterium* spp in skim milk containing oligosaccharides and inulin, *Journal of Food Science*, 65 (2000) 884-887.
- ✚ **Huchet T et al., (1996)** : Retour à la première galerie Apicole virtuelle au monde, méthode d'analyse chimique. pp 1-24.
- ✚ **Joffin.C et al.,(1999)** : microbiologie alimentaire, 3^{ème} Edition. France ; CRDP. D'aquitaine ; 214 pages.
- ✚ **Joshi.R, et al., (2000)** : Physico-chemical characteristics of *Apis dorsata* A. cerana and *A. mellifera* honey from Chiwtan district- Central Nepal, *Rev. Apidologie*, 31,p. 367.
- ✚ **J.O.R.A , (1998)** : Arrete interministériel N°35 daté du 27 Mai 1998. Critères microbiologiques des laits et des produits laitiers.
- ✚ **Khnefer et Fettal., (2001)** : Les produits de la ruche. PAO ; maquette et tirage, ECHO PLUS, Alger.
- ✚ **Lavie P. (1968)** : Les substances antibiotiques dans la colonie d'abeilles. CHAUVIN R. traité de biologie de l'abeille. Ed. Masson et Cie, Paris, T. 3, pp 1-115.
- ✚ **Lauter, E. et Kandler, O.(1976)** : Mechanismus der variation des Verhältnisses Acetat/ Lactat bei Vergarung von Glucose durch Bifidobacterien. *Arch. Mikrobiol.*; 110:271-277.

- ✚ **Le Conte , (2006)** : L'apiculture. Ed. Lavoisier, 7^{ème} édition. Pp 382-406.
- ✚ **Lenoire et Bourx:G. et schmidtg. L. et Tourneur.C, 1993** Fonction et choix des bactéries lactiques (bactéries lactiques volume.2, chapitre S, 1994 :614.
- ✚ **Leveau .J, P et BOUIX, M ; 1994** : Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel.
- ✚ **Loones , (1994)** : laits fermentés par les bactéries lactiques. Bactéries lactiques, Tome 2 Edition LORICA France.
- ✚ **Louveaux.J, (1968)** : Composition, propriétés et technologie du miel in « traité de biologie de l'abeille », tome 3, les produits de la ruche. Ed. Masson et Cie, paris, pp277-358
- ✚ **Louveaux J, (1985)** : Les abeilles et leur élevage. Ed. Hachette, Paris, pp 1,46-209.
- ✚ **Luquet.F.M et Corrieu, (2005)** : Bactéries lactiques et probiotiques.Collection science et techniques agroalimentaire,Ed Lavoisier Tec et Doc ; Pris, 307p.
- ✚ **Luttge. U,(1977)** : Nectar composition and membrane transport of sugars and amino acides : a review on the present state of nectar research. Apidologie: 305-319.
- ✚ **M.B. ROBERFROID**, Health benefits of non digestible oligosaccharides, Advances in Experimental Medecine Biolology, 427 (1997) 211-219.
- ✚ **M.B. Roberfroid, J.A. Van Loo, et G.R. Gibson**, The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products, Journal of Nutrition, 128 (1998) 11-19.
- ✚ **Magalon G. et Vanwijck R. (2003)** : Guide des plaies. Ed.J.L. Eurotext, Paris, 102 p .
- ✚ **Mahaut et al., (2000)** : Les produits industriels laitiers, techniques et documentation, Lavoisier.Paris.
- ✚ **Molan PC, (1992)**. The antibacterial activity of honey- 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. Bee world. 73: 59-76.
- ✚ **Mauzirio A. (1980)** : La formation du miel. In traites de biologie de l'abeille. Les produits de la ruche . Ed. Masson et Cie, Paris, T. 3, pp. 263-276.
- ✚ **Michel .M, (2000)**: Produit industriels laitiers,.
- ✚ **M.L. Desjardins, D. Roy, et J. Goulet**, Galactosidase and proteolytic activities of bifidobacteria in milk: A preliminary study, *Milchwissenschaft* (1991), 46(1), 11–13.
- ✚ **Multon.J.L.(1992)**: **Additifs et auxiliaries de fabrication** dans les IAA, Parie, Edition Tec et doc. Lavoisier, 2^{ème} édition, ALPRIA, 799 pages.

- ✚ **Nagengast, F. M., Hectors, M. P. C., Buys, W. A. M., et VAN Tongeren, J. H. M.** Inhibition of secondary bile acid formation in large intestine by lactulose in healthy subjects of two different age group. *Eur. J. Clin. Inves.* 1988; 1851-61.
- ✚ **Nevas M, Lindstrom M, Hautamaki K, Puoskari S, Korkeala H (2005).** Prevalence and diversity of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in honey produced in the Nordic countries. *Int. J. Food Microbiol.* 105(2): 145-151.
- ✚ **Novel , (1993) :** Les bactéries lactiques microbiologiques industrielles. Les micro-organismes d'intérêt industriel.
- ✚ **N.P Shah,** Bifidobacteria: Characteristics and potential for application in fermented milk products, *Milchwissen*, 52 (1997) 16-21
- ✚ **Pat Pacini,E., Nepi, M., Vesprini, J.L. (2003) :**Nectar biodiversity : a short review. *Plant Syst. Evol.*238; 7-21.
- ✚ **P.E. Lusby, A.L. Coombes, et J.M.Wilkinson,** Bactericidal Activity of Different Honeys against Pathogenic Bacteria, *Archives in Medical Research*, 36 (2005) 464–467.
- ✚ **Permoud . S et al., (2005) :** Bactéries lactiques et pro-biotiques. Lavoisier, 2005.
- ✚ **Rasic, J. Lj. et Kurmann, J. A,(1983)..** Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritional- phy siological, medical and technological aspects and bibliography. Birkhauser Verlag ed. Basel, Boston, Stuttgart:
- ✚ **Riazi et Ziar, (2008) :** Croissance et viabilité des Bifidobactéries dans le lait écrémé additionné de miel d'abeille.
- ✚ **R.I. dave, et N.P. Shah,** Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures, *International Dairy Journal*, 7 (1997) 537–545.
- ✚ **Roissard .H et Luquet.F.M, (1993) :** Bactéries lactiques (LORICA). Le bulletin : standards for dry milk de ADAMI.
- ✚ **Romond, A. F. et Romond, M. B. 1989 :**Intérêt de l'apport d'un lait fermenté à *Bifidobacterium longum* dans les diarrhées à rotavirus du nourrisson *Bifidobacterim* et santé; 1989 Juin 8-1989 Juin 9; Faculté de médecine, Paris, France. Ludres, France: Association pour la recherche sur les bifidobactéries et les bactéries anaérobies;: 145-152.

- ✚ **Roy, D., Mainville, I., et Mondou, F.** Bifidobacteria and their role in yoghurt-related products. Proceedings of the Symposium on Probiotics in man and animal; 1996 Jun20-1996 Jun 22; Haranack House, Berlin, Germany. Germany: Microecology and Therapy, Maison Serborn Literrae; 1997: 167- 180
- ✚ **Schwritzer P. (2001)** : Sur les sentiers des miels de France. Rev. La couleur des miels. Abeille de France, pp. 873.
- ✚ **Sendra. E, Fayos. P, Lario.Y, Fernandez-Lopez.J,Sayas-Barbera.E,Perez-Alvarez.J, (2008)**, Incorporation of fibers in fermented milk containing probiotic bacteria,Food microbiology p 13-21.
- ✚ **S. Kajiwara, G. Hasand et Z. Ustunol**, Effect of honey on growth and acid production by intestinal *Bifidobacterium* spp: An *in vitro* comparison to commercial oligosaccharides and inulin, Journal of Food Protection, 65 (2002) 214-218.
- ✚ **Tamime et Robinson, (2001)**: Background to manufacturing practice in yoghurt. Science and technology . Pargamon pres , Paris, 7-90.
- ✚ **Tojo, M., Oikawa, T., Morikawa, Y., Ymashita, S., Iwata, S., Satoh, J., Hanada, J., et Tanaka, R.** The effects of *Bifidobacterium breve* administration on *Campylobacter enteritis* Acta Paediatr.Jpn. 1987; 29:160-167.
- ✚ **Tomczak C. (2010)** : Utilisation du miel dans le traitement des plaies. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon.
- ✚ **T. nagai R. Inoue, N. Kanamori, N. Suzuki, T. Nagashima**, Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat, Food Chemistry, 97 (2006) 256-262.
- ✚ **Varga. L, (2006)**. Effect of acacia (*Robinia pseudo-acacia* L.) honey on the characteristic microflora of yogurt during refrigerated storage. Short communication. Int. J. Food Microbiol.108: 272-275.
- ✚ **Vear F. et al., (1990)**: genetical studies of nectar and pollen production in sunflower. Agronomie 10, T. 3, pp. 219-231
- ✚ **Vinderola C.G., W. Prosello, D. Ghiberto, et J.A. Reinheimer**, Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinian fresco cheese, Journal of Dairy Science, 83 (2000) 1905–1911.
- ✚ **Vingola.C, (2002)** : Science et technologie du lait .Paris.p16.

- ✚ **V. Lagange, D. Hoppa, C. Mupoperi**, US food industry is “sweet” on honey. American Bee Journal (1991), 131 (7): 447-458.
- ✚ **Ziegler H. (1968)**: La sécrétion du nectar. In ; Chauvin R. Traité de biologie de l'abeille. Ed. Masson et Cie, Paris, T. 3, pp.218-248.
- ✚ **Z. ustunol, et H. Gandhi, (2001)** Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp in honey-sweetened skim milk, Journal of Food Protection, , 64(11): 1775-1779.