

République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine1
Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires
(I.N.A.T.A.A)
Département de Technologies alimentaires

N ° d'ordre :

N ° de série :

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Magister en Sciences Alimentaires
Option : Biotechnologie et Génie des Industries Alimentaires

THÈME

Effet de l'incorporation de deux extraits (extrait polyphénolique et jus frais) de la caroube verte sur la coagulation du lait (cas du yaourt).

Présenté par : M^{me} BECHRI née TARMOUL Houria

Soutenu le:

Devant le jury:

Présidente: M^{me} BEKHOUCHE F. Prof. (I.N.A.T.A.A, UFMC1)

Promotrice: M^{me} BARKAT M. Prof. (I.N.A.T.A.A, UFMC1)

Examinatrices: M^{me} KHARROUB K. Prof. (I.N.A.T.A.A, UFMC1)
M^{me} HAMZA N. M.C.A. (I.N.A.T.A.A, UFMC1)

Année universitaire 2016-2017

REMERCIEMENTS

Avant tout je remercie dieu, le tout puissant pour m'avoir donnée la foi, m'avoir guidée jusqu'à la réalisation et l'aboutissement de ce projet.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma sincère gratitude à M^{me} BARKAT M., qui a dirigé et encadré ce mémoire et qui a su me guider et me soutenir durant la période de la réalisation de ce travail. Merci pour votre disponibilité, vos conseils, tant dans le domaine de la recherche qu'au niveau de l'enseignement, au temps que vous avez bien voulu consacrer à la réalisation de ce travail, votre sympathie et votre bonne humeur. Ce fut un véritable plaisir de travailler à vos côtés.

Je remercie vivement les membres du Jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail : au professeur BAKHOUCHE F., qui m'a fait l'honneur de présider le jury, au professeur KHARROUB K. et maître de conférence classe A HAMZA N. qui ont accepté d'être examinatrices de ce mémoire.

J'ai à cœur de remercier également Mr CHIKHOUNE A., je le remercie chaleureusement pour ses précieux conseils et son aide dynamique.

Tous mes sincères remerciements à tous mes enseignants de l'année théorique de magister.

Je tiens tout particulièrement à remercier M^r BATOUCHE Y. pour m'avoir ouvert en grand les portes de la Laitière RAMDY, pour m'avoir accueilli au laboratoire, permis d'effectuer les différents tests et analyses et pour avoir mis à ma disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer ici toute ma reconnaissance à l'ensemble du personnel du laboratoire et de production et en particulier M^r LOTFI qui a dirigé mon travail au sein de l'entreprise. Je les remercie chaleureusement pour leurs précieux conseils et leur aide dynamique.

J'ai aussi des remerciements tout particuliers à exprimer à GHENNAI Oulaya, technicienne du laboratoire de recherche BIOQUAL de l'institut I.N.A.T.A.A. pour son soutien, sa disponibilité sans faille et son sens des relations humaines.

Un grand merci aussi pour votre sympathie et votre accueil.

Le soutien et l'encouragement de ma famille et ma belle famille, particulièrement mon mari, ont été très importants pour la l'aboutissement de ce travail. Je les ai remercie affectueusement.

DEDICACES

À mon cher mari Bilal qui m'a tant soutenu

À mes chers parents

À mes frères et mes sœurs et leurs familles

À ma belle famille

À mes amies toute la promotion de Magister Biotechnologie 2014

Table des matières

Table des matières

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Liste des annexes	

Introduction générale	01
-----------------------------	----

Partie 01 : Synthèse bibliographique

Chapitre 01 : Le yaourt

1.1. Généralités et historique	03
1.2. Définition	04
1.3. Technologie de fabrication du yaourt	05
1.4. Effet d'incorporation des polyphénols dans la technologie du lait fermenté	07

Chapitre 02 : Polyphénols

2.1. Définition des polyphénols	08
2.2. Classification des polyphénols	08
2.3. Biosynthèse des polyphénols	12
2.4. Rôle des polyphénols dans les plantes	12
2.5. Importances nutritionnelle et thérapeutique des polyphénols	12
2.6. Interactions polyphénol-protéine	13
2.6.1. Différentes étapes de la réaction protéine-polyphénol.....	14
2.6.2. Interactions polyphénols-protéines laitières	15

Chapitre 03 : Caroube (*Ceratonia siliqua* L.)

3.1. Généralités sur le caroubier	17
3.1.1. Origine et aire de répartition du caroubier	17
3.1.2. Description et classification botanique du caroubier	18
3.2. Description et composition du fruit du caroubier	20
3.3. Utilisations et intérêt de la caroube.....	21
3.3.1. Utilisation traditionnelle	21
3.3.2. Utilisation thérapeutique	22

3.4.	Polyphénols de la caroube	23
3.4.1.	Polyphénols de la caroube mûre (sèche).....	23
3.4.2.	Polyphénols de la caroube verte	24

Partie 02: Matériel et méthodes

1.	Matériel végétal	27
2.	Méthodes appliquées.....	27
2.1.	Procédure d'extraction	29
2.1.1.	Extraction des composés polyphénoliques	29
2.1.2.	Extraction du jus à partir des gousses vertes de la caroube	31
2.2.	Dosage des composés phénoliques	31
2.2.1.	Dosage des polyphénols totaux	31
2.2.2.	Dosage des flavonoïdes.....	32
2.2.3.	Dosage des tanins	33
2.2.4.	Détermination de l'activité antioxydante.....	36
2.3.	Essais d'élaboration de coagulums à base des extraits de la caroube verte.....	39
2.3.1.	Mise en œuvre du diagramme de fabrication du yaourt étuvé RAMDY.....	39
2.3.2.	Incorporation des deux extraits (polyphénolique et jus frais) de la caroube verte	40
2.4.	Analyses physicochimiques du lait, du jus et des produits élaborés.....	40
2.4.1.	Mesure du pH	41
2.4.2.	Mesure de l'acidité	41
2.4.3.	Mesure de l'extrait sec total	42
2.4.4.	Détermination de la teneur en matière grasse du lait.....	43
2.4.5.	Détermination de la teneur en matière sèche soluble par le Brix	45
2.5.	Analyses microbiologiques	45
2.5.1.	Recherche des coliformes totaux et fécaux	45
2.5.2.	Recherche des <i>Staphylococcus aureus</i>	46
2.5.3.	Recherche des levures et moisissures	46
2.5.4.	Recherche des salmonelles.....	46
2.6.	Analyse sensorielle	47
2.7.	Analyse statistique	47

2.1.Partie 03: Résultats et discussion

1. Rendement en jus extrait de la caroube.....	49
2. Teneurs en composés phénoliques du jus et de l'extrait acétonique de la caroube verte	49
2.1. Teneurs en polyphénols totaux	49
2.1.1. Teneurs en polyphénols totaux dans l'extrait acétonique	49
2.1.2. Teneurs en polyphénols totaux dans le jus.....	50
2.2. Teneurs en flavonoïdes	51
2.2.1. Teneurs en flavonoïdes dans l'extrait acétonique	51
2.2.2. Teneurs en flavonoïdes dans le jus	51
2.3. Teneurs en tanins condensés et hydrolysables.....	51
2.3.1. Teneurs en tanins condensés et hydrolysables dans l'extrait acétonique.....	51
2.3.2. Teneurs en tanins condensés et hydrolysables dans le jus	52
2.4. Activité antiradicalaire et pouvoir réducteur du fer ferrique de l'extrait acétonique et du jus de la caroube.....	52
2.4.1. Activité antiradicalaire (DPPH)	52
2.4.2. Pouvoir réducteur en fer ferrique en fer ferreux	53
3. pH, Extrait sec total et Brix du jus extrait des gousses vertes de la caroube	54
4. pH, Acidité, Taux d'extrait sec total, Taux de matière grasse du lait reconstitué	54
5. Elaboration d'un coagulum.....	55
5.1.Résultats préliminaires et choix de l'extrait de la caroube à incorporer.....	55
5.2.Incorporation du jus extrait des gousses vertes pour l'élaboration des coagulums	56
5.3.Effet conjugué ferments-jus de caroube.....	58
6. Caractérisation physicochimique des produits élaborés	59
6.1. pH.....	59
6.2. Extrait sec total.....	60
6.3. Acidité.....	61
6.4. Matière grasse	62
7. Analyses microbiologiques des produits élaborés	62
8. Etude de la variabilité des produits élaborés.....	63
8.1. Structuration des variables	63
8.2.Structuration des coagulums	64

Conclusion générale	66
Références bibliographiques	68
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau 01. Classification botanique de la caroube.....	19
Tableau 02. Composition de la pulpe de la caroube	21
Tableau 03. Paramètres mesurés sur les matières premières et les produits élaborés	41
Tableau 04. Teneurs en composés polyphénoliques de l'extrait acétonique et du jus de la caroube	49
Tableau 05. pH, Taux d'extrait sec total et Brix du jus des gousses vertes de la caroube	54
Tableau 06. pH, Acidité, Taux d'extrait sec total, Taux de matière grasse du lait reconstitué	55
Tableau 07. Résultats des analyses microbiologies des produits élaborés	62

Liste des figures

Figure 01.	Interactions <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus bulgaricus</i> en culture mixte dans le lait fermenté	04
Figure 02.	Différentes classes des non flavonoïdes	09
Figure 03.	Squelette de base des flavonoïdes	10
Figure 04.	Différentes classes des flavonoïdes	11
Figure 05.	Particularité des résidus proline en imprimant une courbure aux chaînes polypeptidiques	14
Figure 06.	Air de distribution du caroubier dans le monde	18
Figure 07.	Arbre du caroubier	19
Figure 08.	Présentation de la gousse de la caroube, pulpe et graine	20
Figure 09.	Chromatogramme HPLC des polyphénols de la caroube verte	26
Figure 10.	Structure des flavonoïdes et leurs dérivés identifiés dans la caroube verte	26
Figure 11.	Diagramme général de la méthodologie du travail suivie.....	28
Figure 12.	Préparation des gousses de la caroube verte pour l'extraction des composés polyphénoliques.....	29
Figure 13.	Extraction des polyphénols à partir de la poudre de caroube	30
Figure 14.	Récapitulation des étapes de dosage des polyphénols totaux.....	32
Figure 15.	Récapitulation des étapes du dosage des flavonoïdes	33
Figure 16.	Présentation chimique du test de vanilline pour les tanins condensés	33
Figure 17.	Récapitulation des étapes dosages des tanins <i>condensés</i>	34
Figure 18.	Récapitulation des étapes de dosage des tanins hydrolysables	35
Figure 19.	Réduction du radical DPPH•	36
Figure 20.	Récapitulation des étapes d'évaluation de l'activité antiradicalaire	37
Figure 21.	Récapitulation des étapes d'évaluation du pouvoir réducteur du fer	38
Figure 22.	Diagramme de fabrication du yaourt étuvé RAMDY.....	39
Figure 23.	Etapes de mesure de l'acidité.....	42
Figure 24.	Etapes de mesure de l'extrait sec total.....	43
Figure 25.	Etapes de détermination de la teneur en matière grasse du lait.	44

Figure 26.	Activité antiradicalaire des composés polyphénoliques de l'extrait acétonique et du jus de la caroube.....	53
Figure 27.	Photographie des résultats de précipitation du lait par l'ajout du jus de caroube à différents pourcentages..	57
Figure 28.	Photographie du Coagulum en pot (À base de 10% du jus de gousses vertes de caroube).....	57
Figure 29.	Valeurs moyennes du pH des produits élaborés.	59
Figure 30.	Valeurs moyennes de l'extrait sec total des produits élaborés.	60
Figure 31.	Valeurs moyennes de l'acidité titrable des produits élaborés.	61
Figure 32.	Répartition des variables dans le plan 1/ 2 (cercle des variables).	64
Figure 33.	Répartition de nuages de points dans le plan 1/ 2 (cercle des individus).	65

Liste des annexes

Annexe 01. Biosynthèse des composés phénoliques.

Figure 01. Voie de l'acide shikimique.

Figure 02. Métabolisme des phénylpropanoïdes conduisant aux principaux groupes de composés phénoliques.

Annexe 02. Structure des composés phénoliques de la caroube

Figure 01. Structure des composés isolés et identifiés de la fibre de caroube.

Annexe 03. Caroube verte utilisée

Figure 01. Photographie des gousses vertes de la caroube (*Ceratonia siliqua L.*).

Figure 02. Photographie de la poudre lyophilisée.

Figure 03. Photographie du jus de la caroube verte.

Annexe 04. Courbes d'étalonnage

Figure 01. Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.

Figure 03. Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

Figure 03. Courbe d'étalonnage des tanins condensés.

Figure 04. Courbe d'étalonnage des tanins hydrolysables.

Figure 05. Courbe d'étalonnage du pouvoir réducteur du fer.

Annexe 05. Préparation des solutions des dosages

Tableau 04. Préparation des solutions des dosages.

Annexe 06. Photographie d'extrait phénolique lyophilisé

Figure 01. Photographie d'extrait phénolique lyophilisé (EP).

Annexe 07. Composition des milieux de culture utilisés

Tableau 01. Composition de la gélose Lactosée Biliée au Cristal Violet et au Rouge neutre (VRBL).

Tableau 02. Composition du milieu Baird Parker.

Tableau 04. Composition d'OGYE.

Tableau 04. Composition du bouillon SFB.

Tableau 05. Composition de la solution Ringer.

Tableau 05. Composition du milieu SS.

Annexe 08. Questionnaire de l'analyse sensorielle

Liste des abréviations

°D	Degré dornic
ACP	Analyse en composantes principales
ANOVA	Analysis of the variance
BSA	Bovin serum albumin
D/C	Double Concentré
DPPH	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
E.P.T	Eau Peptonée Tamponnée
EAA	Equivalent Acide Ascorbique
EAG	Equivalent Acide Gallique
EAT	Equivalent Acide Tannique
EC	Equivalent Catéchine
EP	Extrait Polyphénolique
EQ	Equivalent Quercétine
EST	Extrait Sec Total
FAO	Food and Agriculture Organization
INATAA	Institut de Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaire
MG	Matière Grasse
NF	Normes françaises
OGYE	Oxytetracycline-Glucose Yeast Extract agar
PT	Polyphénols totaux
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$)
TEA	Triéthanolamine ou Trolamine ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_3$)
VRBL	Violet cristal Rouge neutre Bile Lactose

Introduction générale

La dynamique actuelle du marché des denrées alimentaires oblige les industriels à formuler constamment de nouveaux produits. Ainsi, l'intérêt récent des consommateurs pour les aliments fonctionnels et la nécessité de remplacer les antioxydants synthétiques par des antioxydants naturels conduisent à l'utilisation de nouveaux ingrédients tels que les polyphénols.

Les composés phénoliques sont actuellement l'objet d'une littérature abondante (Dupas, 2009). Les chercheurs et les industriels en agro-alimentaires donnent une importance croissante pour ces molécules en raison de leur propriété antioxydante, leur grande abondance dans notre alimentation, et leur rôle crucial dans la prévention et le traitement de certaines maladies (cancer, maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives) (Sperker *et al.*, 2000). Ils sont également utilisés comme additifs pour les industries agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Chira *et al.*, 2008).

Parmi les nouveaux aliments fonctionnels, qui sont susceptibles de fournir des bénéfices santé importants, la combinaison des constituants antioxydants issus de fruits avec les protéines laitières présente le meilleur exemple qui a été rapporté (Wegrzyn *et al.*, 2008). Ainsi, il a été établi que les polyphénols du thé interagissent avec les protéines du lait en exerçant un effet sur la capacité antioxydante totale (Arts *et al.*, 2002); les tanins condensés du thé sont exclusivement impliqués dans ce type d'interactions avec les protéines laitières (Frazier *et al.*, 2010). Ces interactions dites de complexations peuvent cependant avoir des effets bénéfiques sur l'activité antioxydante des polyphénols, en relation avec leur durée de vie prolongée dans les systèmes complexes (Stojadinovic *et al.*, 2013). D'autres types d'interactions des polyphénols avec des protéines de différentes matrices alimentaires sont également mis en évidence, notamment entre les flavonoïdes et les protéines contenues dans les boissons tel que les jus (Bohin *et al.*, 2012). D'une manière générale, les polyphénols influencent les propriétés structurales, fonctionnelles, nutritionnelles et de digestibilité des protéines (Ozdal *et al.*, 2013). Des extraits végétaux bruts de raisin, de thé, de framboise ont été additionnés dans un fromage, afin d'améliorer la qualité et la fonctionnalité du produit (Han *et al.*, 2011). L'extrait de gousses vertes de la caroube est également utilisé pour la fabrication d'un produit laitier libanais portant le nom de "*Mekika*" (Abi Azar, 2007).

Actuellement, la caroube est considérée comme une plante d'investigation de nouveaux antioxydants naturels (polyphénols) contenus dans les feuilles, fleurs, fruits, bois, écorces et racines. Son activité antioxydante est attribuée à la présence de composés

phénoliques (Custódio, 2011). La graine de la caroube est la fraction la plus exploitée. Elle est utilisée, à grande échelle, dans les industries agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique et textile. Cependant, la pulpe de la caroube reste peu valorisée malgré sa richesse en nutriments et en particulier les polyphénols. Récemment, l'attention a été attirée sur l'effet de la pulpe de la caroube en raison de sa teneur polyphénolique et ses fibres alimentaires, qui sont à l'origine des différents bienfaits pour la santé humaine (Gabriela, 2011).

Pour cette dernière raison et vu les applications indénombrables des polyphénols dans les différents secteurs de la recherche, il devient de plus en plus intéressant d'élargir la gamme d'aliments riches ou enrichis en polyphénols, particulièrement dans le cas des produits laitiers, qui ont pris une part importante du marché mondial. Les produits laitiers frais et fermentés, comme le yaourt, sont des aliments de grande consommation dans de nombreux pays, notamment en Algérie.

L'enrichissement des yaourts par les polyphénols est très peu documenté. De ce fait, une stratégie d'incorporation d'extraits végétaux bruts dans ce type de produits laitiers peut s'avérer bénéfique pour l'amélioration de la qualité du produit, vu l'impact positif des interactions entre les molécules polyphénoliques et les protéines lactiques.

Dans ce contexte, le travail présenté dans ce mémoire vise comme objectif la caractérisation polyphénolique des extraits de la caroube verte (extrait polyphénolique et extrait brut des gousses fraîches ou jus) et l'étude de la possibilité d'incorporation de ces deux extraits dans une formulation d'un yaourt et leurs effets sur la précipitation des protéines lactiques.

Pour atteindre les principaux objectifs visés, nous avons jugé utile de structurer le manuscrit, en plus de l'introduction et la conclusion générale, en en trois grands chapitres.

Le premier chapitre consiste en une synthèse bibliographique en donnant une présentation générale des polyphénols, la caroube et sa composition phénolique, ainsi que la matrice d'étude (yaourt) et la nature des interactions polyphénol/protéine.

Le deuxième chapitre est axé sur le matériel et les méthodes mis en œuvre dans le cadre du travail expérimental et la démarche expérimentale suivie.

Le troisième chapitre expose les résultats obtenus avec leurs discussions.

Synthèse bibliographique

1.1. Généralité et historique

Le yaourt, dans sa zone d'origine qui est la péninsule balkanique, était préparé avec du lait de chèvre et à l'aide de cultures naturelles. Les recherches de Grigoroff (1905) et de Kuntze (1908), conduites au début du 20^{ème} siècle, ainsi que les recherches successives de Orla- Jensen (1919), nous ont indiqué que les ferments lactiques de telles cultures étaient représentés par *Lactobacillus jugurti* et *Lactobacillus bulgaricus*. Cependant Metchnikoff (1845-1916) indiqua que le produit original était principalement obtenu avec des lactobacilles du type *bulgaricus*. Depuis que le yaourt de production artisanale est devenu produit industriel, avec en conséquence, une large diffusion dans tous les pays d'Europe, il a perdu diverses caractéristiques originelles pour devenir le résultat d'une combinaison microbienne différente et d'un processus industriel.

La culture naturelle est généralement substituée par une association de bacilles et de streptocoques thermophiles et de nombreuses recherches ont été réservées à l'explication du rôle que précisément *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* exercent dans la production et sur la qualité du yaourt actuel (Bottazzi *et al.*, 1973) (Figure 01).

Actuellement, il existe selon les goûts des consommateurs et les pays, soit un yaourt ferme, soit un yaourt brassé, additionné ou non de sucre, d'arômes ou de fruits (Lecerf, 2016).

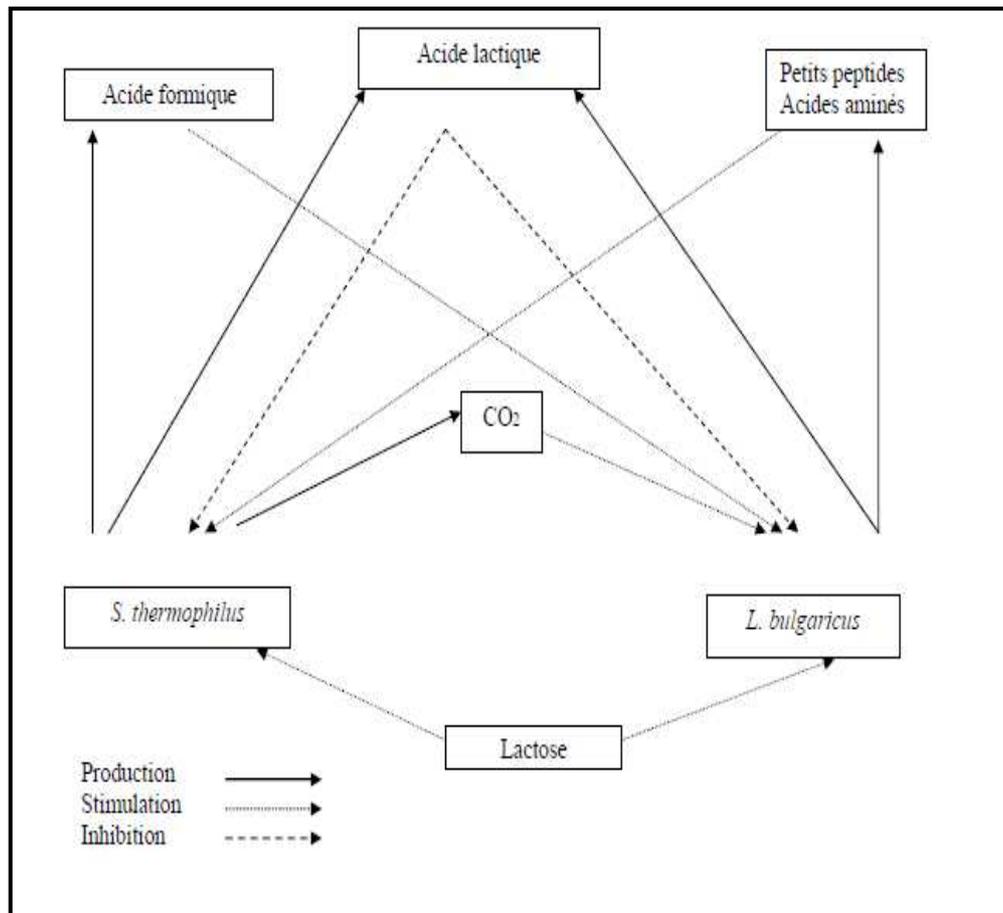


Figure 01. Interactions *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* en culture mixte dans le lait fermenté (Mahaut *et al.*, 2000).

1.2. Définition

Le yaourt est un produit laitier obtenu par la fermentation du lait, lequel peut avoir été fabriqué à partir de lait avec ou sans modification de composition, par l'action de deux bactéries exclusives de *Lactobacillus bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus* sur le lait (pasteurisé ou concentré ou partiellement écrémé enrichi en extrait sec), et résultant de la réduction du pH avec ou sans coagulation (précipitation isoélectrique). Ces levains (micro-organismes) doivent être viables, actifs et abondants dans le produit à la date de durabilité minimale (CODEX, 2003), à raison d'au moins 10^7 par gramme rapportées à la partie lactée. De plus, la quantité d'acide lactique libre contenue dans 100 g de yaourt ne doit pas être inférieure à 0,8 g (Mahaut *et al.*, 2000).

1.3. Technologie de fabrication du yaourt

❖ Pasteurisation

Le lait reconstitué, éventuellement sucré, subit un traitement thermique. Le barème de traitement thermique le plus couramment utilisé est de 90-95 °C pendant 3 à 5 minutes (Mahaut *et al.*, 2000). Ce traitement vise à détruire les microorganismes pathogènes susceptibles de croître dans le lait ainsi que l'inactivation des enzymes telles que la lipase (Sava *et al.*, 2005). Ce traitement crée des conditions favorables au développement des bactéries lactiques (Boudier, 1990). Cependant, un apport intense de chaleur peut engendrer des inconvénients tels que l'altération de la valeur nutritive du yaourt (perte de vitamines thermosensibles) (Pacikora, 2004).

❖ Homogénéisation

L'homogénéisation est un traitement physique permettant de réduire la taille des globules de gras (Lamontagne, 2002). La séparation de la phase lipidique de la phase aqueuse, causée par le phénomène de gravité durant l'entreposage du yaourt, est ainsi diminuée, voire éliminée (Tamine et Robinson, 1999; Sodini *et al.*, 2004). Lors de l'étape d'homogénéisation, il y a incorporation des caséines dans la membrane des globules de gras. La résultante est une augmentation du caractère hydrophile de ces dernières. La capacité de rétention d'eau ainsi que la fermeté du coagulum sont également améliorées (Tamine et Robinson, 1999; Mahaut *et al.*, 2000).

❖ Inoculation et la Coagulation (fermentation lactique)

Le lait, enrichi et traité thermiquement, est refroidi à la température de fermentation 40-45°C. Cette température correspond à l'optimum de développement symbiotique des bactéries lactiques (Lonnes, 1994). Leur inoculation se fait à un taux assez élevé, variant de 1 à 7 %, pour un ensemencement indirect à partir d'un levain avec un ratio de *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus bulgaricus* de 1,2 à 2 pour les yaourts naturels, et pouvant atteindre 10 pour les yaourts aux fruits (Boudier, 1990 ; Mahaut *et al.*, 2000). L'ensemencement direct à partir des bactéries lactiques concentrées congelées se fait à des taux de l'ordre de 0,03 %.

Ces deux germes vivent en symbiose étroite (Figure 01). Le lactobacille, de par son activité protéolytique, enrichit le milieu en certains acides aminés activateurs des streptocoques. De même, *Streptococcus thermophilus* stimule également *Lactobacillus*

bulgaricus en produisant un métabolite qui peut être remplacé par de l'acide formique (Mouillet *et al.*, 1977).

Les deux espèces *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* vivent en symbiose et en synergie. Lors de leur croissance, elles dégradent le lactose en acide lactique entraînant une baisse de pH et la gélification du milieu avec des modifications structurales irréversibles. Les micelles de caséines, chargées négativement au pH du lait, se neutralisent progressivement. À pH 4,6, point isoélectrique de ces protéines, la répulsion électrostatique minimale provoque l'agglomération des micelles de caséines (Tamine et Robinson, 1999).

En outre, ces bactéries produisent des composés carbonylés volatils (l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acetoïne et l'acétate d'éthyle) (Imhof *et al.*, 1994 ; Ott *et al.*, 1997) et des exopolysaccharides qui participent respectivement, à l'élaboration de l'arôme et de la texture du yaourt.

Ce sont les streptocoques qui amorcent la fermentation en procurant aux lactobacilles les composantes requises à leur activité fermentaire telles que l'acide formique et le gaz carbonique. Quant aux lactobacilles, ceux-ci hydrolysent partiellement les caséines libérant ainsi de courts peptides et acides aminés qui favorisent la croissance des streptocoques. Les ferments lactiques sont sensibles aux résidus de lavage, à la présence d'antibiotiques ainsi qu'aux bactériophages (Tamine et Robinson, 1999; Mahaut *et al.*, 2000; Lamontagne, 2002).

Lorsque le pH atteint une valeur comprise entre 4,3 et 4,7 et l'acidité titratable est de plus de 70 °Dornic, un refroidissement en deux temps (rapide jusqu'à 25 °C, puis plus lent jusqu'à 5°C) est appliqué afin de stopper la fermentation. En effet, l'activité des bactéries lactiques est limitée pour des températures inférieures à 10°C. Le refroidissement est réalisé au moyen d'échangeurs à plaques ou tubulaires (Mahaut *et al.*, 2000). Le respect du pH final est primordial puisque cette caractéristique influence les propriétés sensorielles telles que l'acidité, la flaveur et la texture du produit fini (Sodini *et al.*, 2004).

❖ **Conditionnement et stockage**

Les yaourts conditionnés dans des pots en plastiques, sont stockés en chambres froides à 4°C en passant au préalable dans des tunnels de refroidissement. A ce stade, ils sont prêts à être consommés. La durée limite de leur consommation est de 28 jours.

Pendant le stockage, les bactéries lactiques maintiennent une activité réduite. Cette évolution, appelée post-acidification, se traduit par une légère baisse du pH, surtout pendant les deux premiers jours du stockage (Pacikora, 2004).

1.4. Effet d'incorporation des polyphénols dans la technologie du lait fermenté

Des études ont été rapportées dans le cadre d'ajout des extraits phénoliques dans les produits laitiers particulièrement dans les yaourts, parmi elles, l'ajout de la catéchine dans une gamme de 200 mg/kg du produit contenant les bifidobactéries dans le but d'augmenter la survie de ces microorganismes aux cours du stockage (Pszczola, 1996). En outre Howard *et al.* (2000) se sont orientés vers la production d'un extrait de vin qui peut être ajouté au lait et yaourt comme un additif alimentaire nutritionnel. Ils ont utilisé des extrais de polyphénols solubles riche en flavonols tels que la quercétine en concentrant le vin.

Karaaslan *et al.* (2011) ont étudié l'effet de l'addition de l'extrait du raisin riche en polyphénols, et ils ont constaté que ce dernier possède un potentiel d'être utilisé comme complément alimentaire dans le yaourt qui peut jouer un rôle dans la réduction du risque de développement des maladies chroniques comme le cancer et les troubles cardiovasculaires.

Dans une autre étude, le jus vert de poivron a été utilisé comme une source d'antioxydants et il a été incorporé au lait fermenté et l'impact de ces ingrédients sur les bactéries lactiques a été étudié (Halal et Nayra, 2011). Le jus de poivron (3 %) a été ajouté au lait fermenté par *Lactobacillus rhamnosus* (2%), et l'étude de viabilité de cette souche probiotique pendant le stockage a été effectuée. Les résultats de cette étude, qui a recommandé l'ajout du jus de poivron, ont montré que ce dernier n'a aucun effet sur la souche probiotique sélectionnée.

Récemment, une étude sur l'effet de l'addition des extrais phénoliques aqueux d'olives et du raisin au yaourt a été rapportée par Aliakbarian (2014) dans le but de produire un aliment fonctionnel. Les résultats obtenus ont montré que les polyphénols restent stables au cours de la fermentation et au cours de différentes étapes du process de fabrication.

Les polyphénols sont de puissants antioxydants naturels (Tsao et yung, 2010). L'activité antioxydante des composés phénoliques est principalement due à leur propriétés d'oxydoréduction (donneurs d'hydrogène et accepteurs d'oxygène), pouvoir antiradicalaire ainsi leurs propriétés chélatrices des métaux (Dhaouadi *et al.*, 2014).

2.1. Définition des polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques, spécifiques du règne végétal, caractérisés comme leur nom l'indique par la présence de plusieurs groupements phénols associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes (Chira *et al.*, 2008). Ces composés d'intérêt biologique sont principalement présents dans les végétaux, depuis les racines jusqu'aux fruits (fruits, légumes, céréales...) et dans les produits qui en dérivent (vin, thé, bière, jus de fruits...) (Dupas, 2009).

Le terme polyphénol a été introduit en 1980, en remplacement du terme ancien de tanins végétal, et a été défini par comme suit : «*Composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3 000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines*». Il s'ajoute à cette définition le fait qu'ils possèdent un pouvoir antioxydant élevé (Chira *et al.*, 2008).

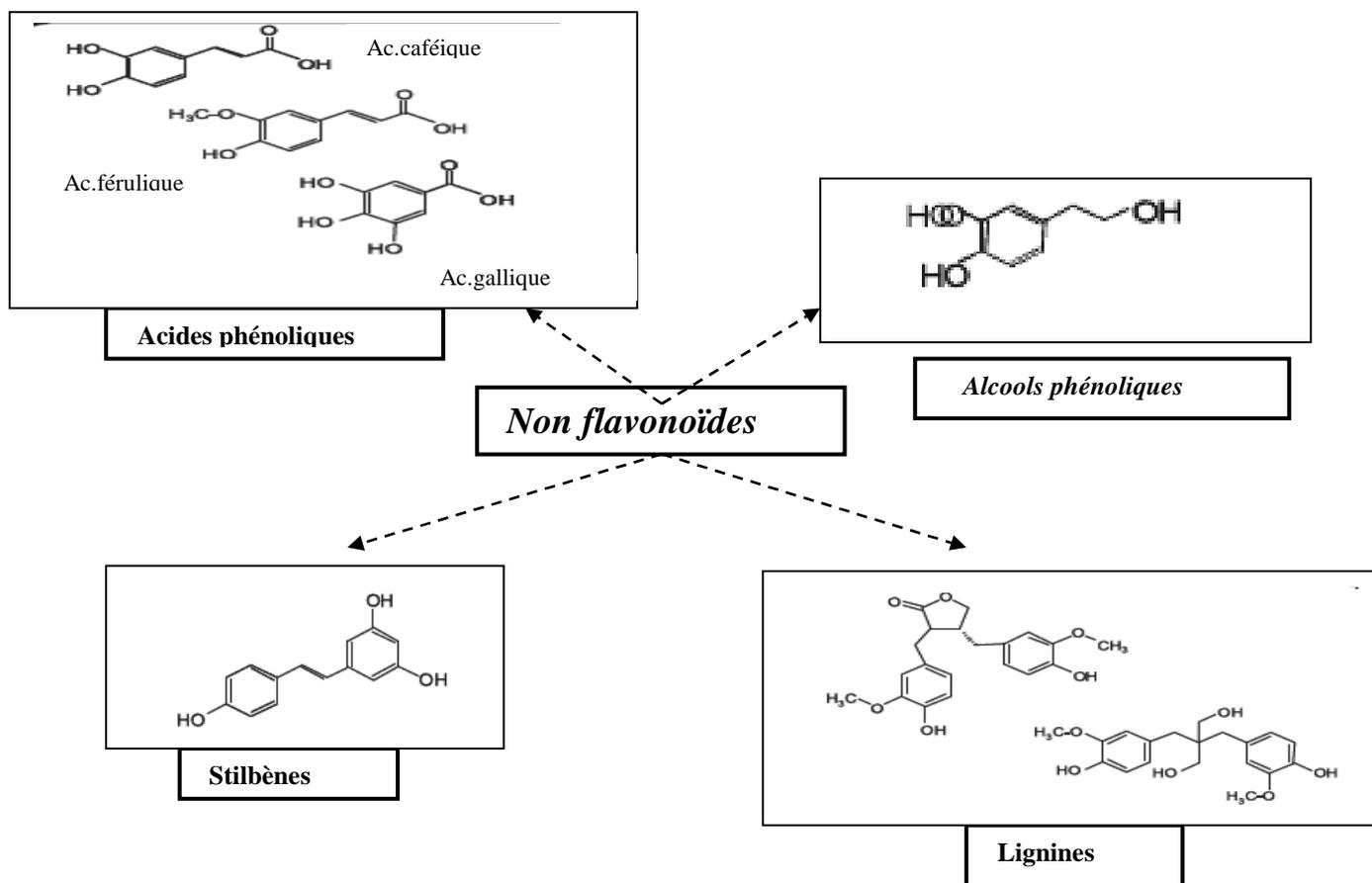
Les polyphénols naturels regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un motif phénolique (cycle aromatique) sur lequel viennent se greffer un ou plusieurs groupements hydroxyles. Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénols, à des composés hautement polymérisés, de plus de 3 000 Dalton, comme les tanins (Chira *et al.*, 2008). Une des particularités des polyphénols réside dans leur incroyable diversité, puisque l'on dénombre plus de 8000 composés phénoliques, dont 5000 pour la sous classe des flavonoïdes (Bravo, 1998).

2.2. Classification des polyphénols

Il n'y a pas de classification universelle des polyphénols et plusieurs auteurs ont proposé leurs propres classifications. Par exemple, Crozier *et al.* (2009) ont classé les polyphénols en deux grandes classes, les flavonoïdes et les non flavonoïdes.

Cette classification repose sur le nombre et l'arrangement des atomes de carbone, en fonction de la nature de leur squelette carboné et en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique (Motilva *et al.*, 2013).

Les non-flavonoïdes incluent des acides phénoliques simples, alcools phénoliques, stilbènes, chalcones et lignanes (Figure 02)



Figures 02. Différentes classes des non flavonoïdes (Motilva *et al.*, 2013).

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C6-C3-C6 (Figure 03). Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes. Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé et vin...) (Crozier, 2003).

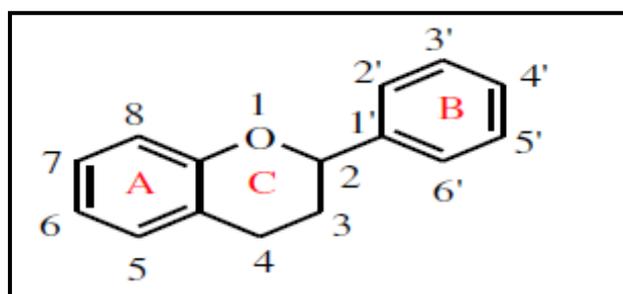


Figure 03. Squelette de base des flavonoïdes (Crozier, 2003).

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont représentées dans la figure 04.

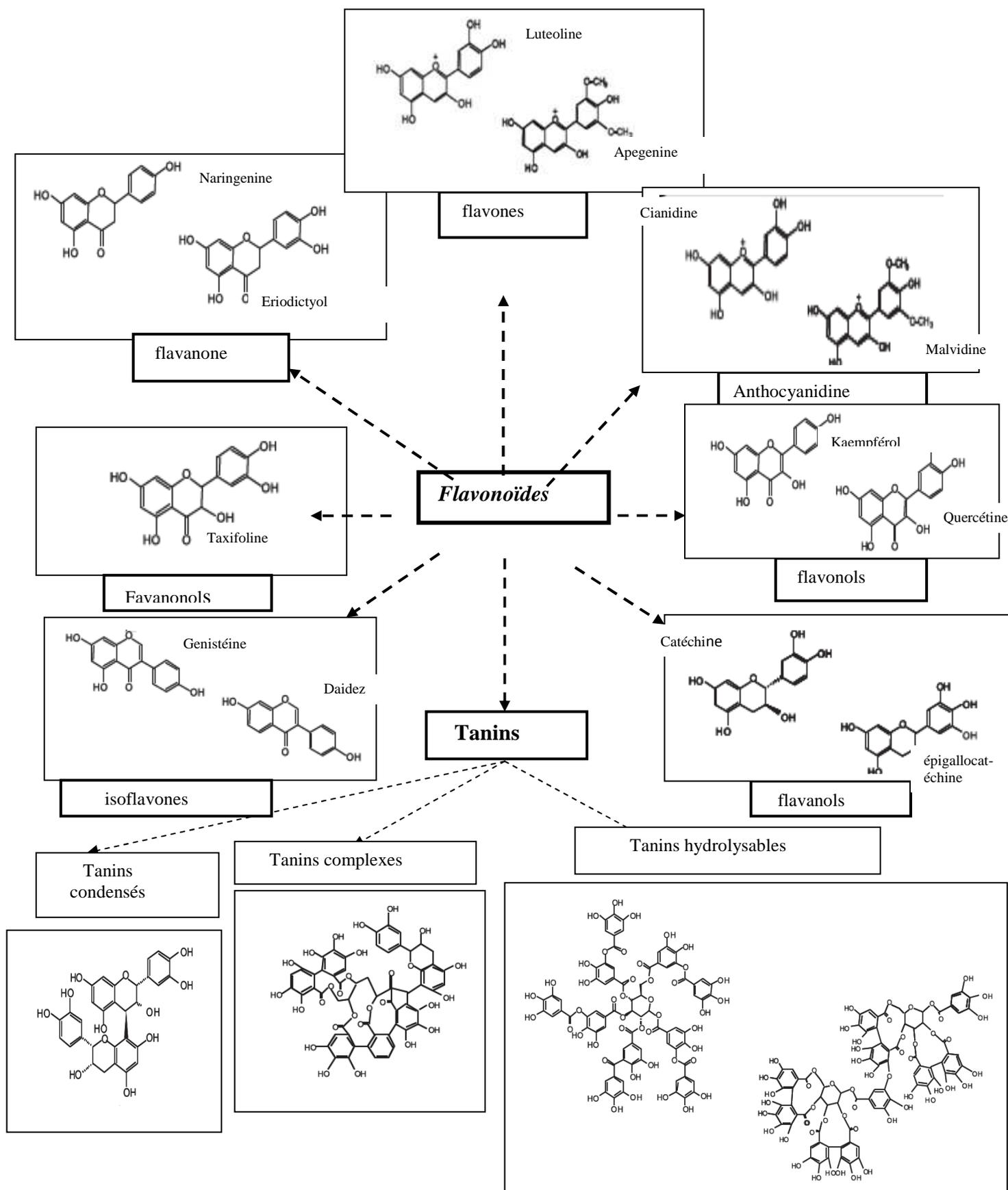


Figure 04. Différentes classes des flavonoïdes (Motilva et al., 2013).

2.3. Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'élaboration de cycles aromatiques, la voie shikimate (également responsable de la synthèse des acides aminés Phénylalanine et Tyrosine) (Figure 01, Annexe 01) et la voie polyacétate, qui consiste en la condensation de molécules d'acétylcoenzyme A (Figure 02, Annexe 01). Cette biosynthèse permet la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe et d'un tissu particulière (Boubker, 2014).

2.4 Rôle des polyphénols dans les plantes

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, impliqués dans de nombreuses facettes de leurs systèmes biologiques : pigmentation, mécanismes de croissance et de reproduction et protection contre les prédateurs (Dupas, 2009).

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans la qualité organoleptique des fruits et légumes, utilisés frais ou après transformation industrielle (Nkhili, 2009).

2.5. Importances nutritionnelle et thérapeutique des polyphénols

L'intérêt thérapeutique potentiel des polyphénols date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (Prix Nobel 1937), chercheur à l'Université Szeged (Hongrie), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou du jus de citron, riche en vitamine C et flavonoïdes. Cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre de mot perméabilité). Malgré ces premiers résultats encourageants, les recherches ne permirent par ensuite d'attribuer un rôle essentiel aux divers polyphénols d'origine végétale. A partir des années quatre-vingts, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour les polyphénols dont les propriétés antioxydantes sont remarquables (Nkhili, 2009).

De nos jours, les propriétés des polyphénols sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti allergiques et anti-cancer. Ils ont également des actions positives sur le diabète (Nkhili, 2009).

2.6. Interactions polyphénol-protéine

L'élucidation des mécanismes de la formation des interactions protéines - polyphénols n'est pas un sujet d'étude récent. En effet, l'utilisation ancestrale et empirique de ce phénomène dans le tannage du cuir qui est due à la réaction des tanins avec le collagène de la peau, amenait Sir Humphry Davy, dès 1803, à définir le terme "tanin" pour désigner la "matière astringente des végétaux" utilisée dans ce procédé.

L'évolution des méthodes de mesure a permis depuis de mieux comprendre et caractériser ces interactions (Haslam *et al.*, 1992).

Les protéines peuvent former des interactions (complexes) réversibles ou irréversibles (solubles ou insolubles) avec les polyphénols. Un exemple simple de conséquence de cette complexation est l'astringence qui est due à des interactions entre les polyphénols et les protéines salivaires (Naczki *et al.*, 2006).

L'astringence est une sensation râpeuse sur la langue associée à une sécheresse buccale et à un sentiment de contraction du palais qui résulte de la précipitation des agrégats polyphénols protéines (Jobstl *et al.*, 2004).

Ce mode d'action a donné son nom à ce phénomène : l'astringence, du latin *ad* (vers) et *stringere* (lier). Ces interactions ont été largement étudiées et la littérature abondante existante sur ce phénomène fournit de nombreuses clés de compréhension concernant les phénomènes d'interactions susceptibles de se produire entre ces protéines et les polyphénols. En effet, les observations réalisées sur les protéines salivaires semblent généralisables aux interactions des polyphénols avec les autres protéines (Dupas, 2009). Les protéines salivaires impliquées dans l'astringence seraient essentiellement des protéines riches en proline (Dupas, 2009).

Les composés phénoliques qui provoquent l'astringence sont essentiellement les tanins condensés tels que les procyanidines présentes dans les fruits et légumes (Haslam et Lilley, 1988). Dans une moindre mesure, on trouve également les tanins hydrolysables de certaines noix et plantes médicinales, les protéines de la fraction basique, les plus riches en proline, ont une affinité plus forte que les autres pour les tanins hydrolysables (Bacon et Rhodes, 2000).

La proline serait ainsi le constituant majeur d'un site de liaison aux polyphénols constitué de un à dix acides aminés selon la taille du polyphénol à lier (Charlton *et al.*, 2002).

Le résidu proline possède un hétérocycle rigide incluant le groupement amine impliqué dans la liaison peptidique. Cette particularité structurale imprime aux chaînes polypeptidiques contenant ce résidu une courbure dans l'espace (Figure 5).

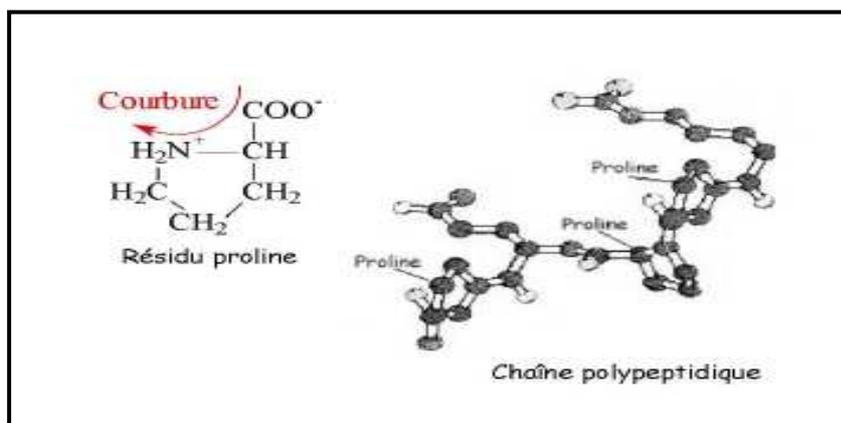


Figure 05. Particularité des résidus proline en imprimant une courbure aux chaînes polypeptidiques (Dupas, 2009).

La nature des interactions tanin-protéine a été le sujet de plusieurs études. Théoriquement, plusieurs types de liaison peuvent être impliqués dans la formation du complexe tano-protéique : liaisons covalentes ou ioniques, interactions hydrophobes ou liaisons hydrogène (Abi Azar, 2007).

Les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes sont les principaux types de liaisons impliquées dans la formation des complexes tano-protéiques (Haslam, 1998).

2.6.1. Différentes étapes de la réaction protéine-polyphénol

Verge *et al.* (2002) et Jobstl *et al.* (2004) ont proposé un modèle moléculaire en trois étapes pour la complexation entre protéines salivaires riches en proline et l'épigallocatechine-gallate, modèle qui pourrait expliquer les interactions polyphénols-protéines.

Dans une première étape et à une faible concentration en épigallocatechine-gallate, le polyphénol s'associe à la surface de la molécule protéique, et généralement plusieurs molécules de polyphénols se lient simultanément à une même molécule protéique. La molécule protéique change alors de la conformation relâchée ou pelote statistique (*loose randomly coiled conformation*) à une structure plus compacte.

Dans une deuxième étape, l'épigallocatechine se lie (*cross-link*) à plusieurs molécules protéiques rendant ainsi le complexe insoluble et formant une solution colloïdale.

Dans une troisième étape, une augmentation du nombre d'interactions (*cross-linking*) cause l'accroissement de la taille des agrégats, ce qui provoque leur précipitation. Ce phénomène se traduit par une diminution du volume hydrodynamique de la molécule protéique durant la

première minute qui suit le mélange entre les deux molécules, suivi par une augmentation des tailles des particules due à l'agrégation (Jobstl *et al.*, 2004).

2.6.2. Interactions polyphénols-protéines lactières

Les protéines lactières sont présentes sous deux phases différentes : d'une part, une phase micellaire instable vis-à-vis de l'acide, constituée de particules solides en suspension : les micelles de caséines (caséines α_{S1} , α_{S2} , β et κ) et d'autre part, d'une phase soluble stable composée de différents polymères protéiques hydrophiles, appelés protéines solubles ou protéines sériques (β lactoglobuline, α lactalbumine, *Bovin serum albumin* (BSA) et immunoglobuline) représentant 80 % et 20 % respectivement (Snappe *et al.*, 2012).

Dans une étude datant de 1963, Brown et Wright, utilisant la migration des protéines en électrophorèse, suggéraient que les protéines du lait étaient susceptibles d'interagir avec les polyphénols du thé. Les tanins du thé noir, notamment, interagiraient avec les caséines et les lactoglobulines, l' α -lactalbumine ne pouvant interagir avec les polyphénols du thé que si la caséine n'est pas présente dans le milieu (Brown et Wright, 1963).

❖ Interactions polyphénols protéines de lactosérum

Plusieurs études ont été faites dans le cadre d'étudier les interactions entre les polyphénols et les protéines sériques. L'interaction entre les polyphénols du thé tel que, la catéchine, l'épicathéchine, l'épicathéchine gallate et l'épigallocatechine gallate et la protéine sérique β lactoglobuline a été rapportée par Kanakis *et al.* (2011). L'étude a montré que la conformation de la protéine a été modifiée suite à sa complexation avec les polyphénols étudiés. Au niveau moléculaire, plusieurs acides aminés ont été impliqués dans la complexation grâce à des liaisons hydrophobes. L'étude a pu caractériser le nombre des polyphénols liés par molécule de protéine. Les polyphénols possédant un grand nombre des groupements -OH interagissent mieux avec les protéines (Kanakis *et al.*, 2011).

Ainsi le comportement de β lactoglobuline vis à vis de l'acide gallique et la catéchine a été mis en évidence (Abi Azar, 2007).

❖ Interactions polyphénols caséines

Les caséines peuvent former des liaisons avec les polyphénols. A titre d'exemple, l'interaction entre les polyphénols du thé, l'épigallocatechine gallate (EGCG) et la caséine a

été établie par Jobstl *et al.* (2006). Cette protéine contient 209 résidus d'acides aminés, dont 35 prolines (Ribadeau *et al.*, 1973). Les détails des interactions ont été bien décrits, la protéine s'enroule autour du polyphénol en formant des liaisons hydrophobes entre les anneaux phénoliques de l'EGCG et les prolines (Dickinson et Mann, 2006). Les interactions entre les polyphénols de thé et la caséine ont été également examinées à l'aide de la spectroscopie fluorescente (Hasni *et al.*, 2011)

Ces dernières années, il a été suggéré l'usage de caséines pour former un complexe avec le resveratrol, afin d'augmenter la solubilité de ce dernier dans l'eau, le complexe pourrait être appliqué dans la fabrication des boissons (Chen, 2010).

Un autre polyphénol bioactif, curcumin, a été étudié au sein d'interactions avec les caséines isolées. Ces interactions ont été étudiées à l'aide de la spectroscopie fluorescente et les résultats ont montrés que le bas poids moléculaire du curcumin a permis son pénétration au cœur de la micelle de caséine (Sahu *et al.*, 2008).

3.1. Généralités sur le caroubier

3.1.1. Origine et aire de répartition du caroubier

Le mot caroubier vient de l'arabe "*El kharroub*". Il est connu sous le nom scientifique de *Ceratonia siliqua* L. *Ceratonia*, du grec *keratia*, désigne une petite corne et le nom d'espèce *siliqua*, désigne en latin une silique ou gousse. Il est aussi appelé Carouge, Pain de Saint Jean-Baptiste, figuier d'Egypte, fève de Pythagore (Batlle et Tous, 1997).

Le lieu d'origine du caroubier demeure incertain. Schweinfurth (1894) a insinué qu'il est originaire du Sud de l'Arabie (Yémen). Cependant, Zohary (1973) a considéré le caroubier comme originaire de la flore d'Indo Malaisie, groupé avec *Olea*, *Laurus*, *Myrtus*. D'autres auteurs, comme Vavilov (1951) et De Candolle (1983), ont rapporté qu'il serait natif de la région Est méditerranéenne (Turquie et Syrie). Le caroubier était connu dans le proche Orient et les îles de la Méditerranée. En Egypte, les pharaons utilisaient la farine du fruit pour rigidifier les bandelettes des momies (XVIIe siècle avant J.C). Cette espèce ligneuse a été domestiquée depuis le néolithique (4000 ans avant J.C.), et sa culture extensive date au moins de 2000 ans avant J.C. (Batlle et Tous, 1997).

Le caroubier a été introduit très anciennement par les Grecs, puis par les Arabes et les Berbères de l'Afrique du Nord, en Grèce, en Italie, en Espagne et au Portugal (Rejeb, 1994). Il est également implanté dans plusieurs autres pays, ayant des régions à climat méditerranéen comme l'Australie, l'Afrique du Sud, les États-Unis (notamment l'Arizona et la Californie du Sud), les Philippines et l'Iran (Benmahioul *et al.*, 2011) (Figure 06).

Le caroubier est aujourd'hui répandu dans tout le bassin méditerranéen. On le trouve à l'état naturel principalement dans les pays suivants : Espagne, Portugal, Maroc, Grèce, Italie, Turquie, Algérie, Tunisie, Égypte, et Chypre.

En Algérie, comme dans plusieurs pays méditerranéens, le caroubier croît dans les conditions naturelles à l'état sauvage sous des bioclimats de type sub-humide, semi-aride et aride. Il est généralement en association avec l'olivier et le lentisque (Benmahioul *et al.*, 2011).

Selon la FAO (2012), l'Algérie est le 6^{ème} pays producteur de la caroube après l'Espagne, le Portugal, la Grèce, le Maroc et la Chypre.

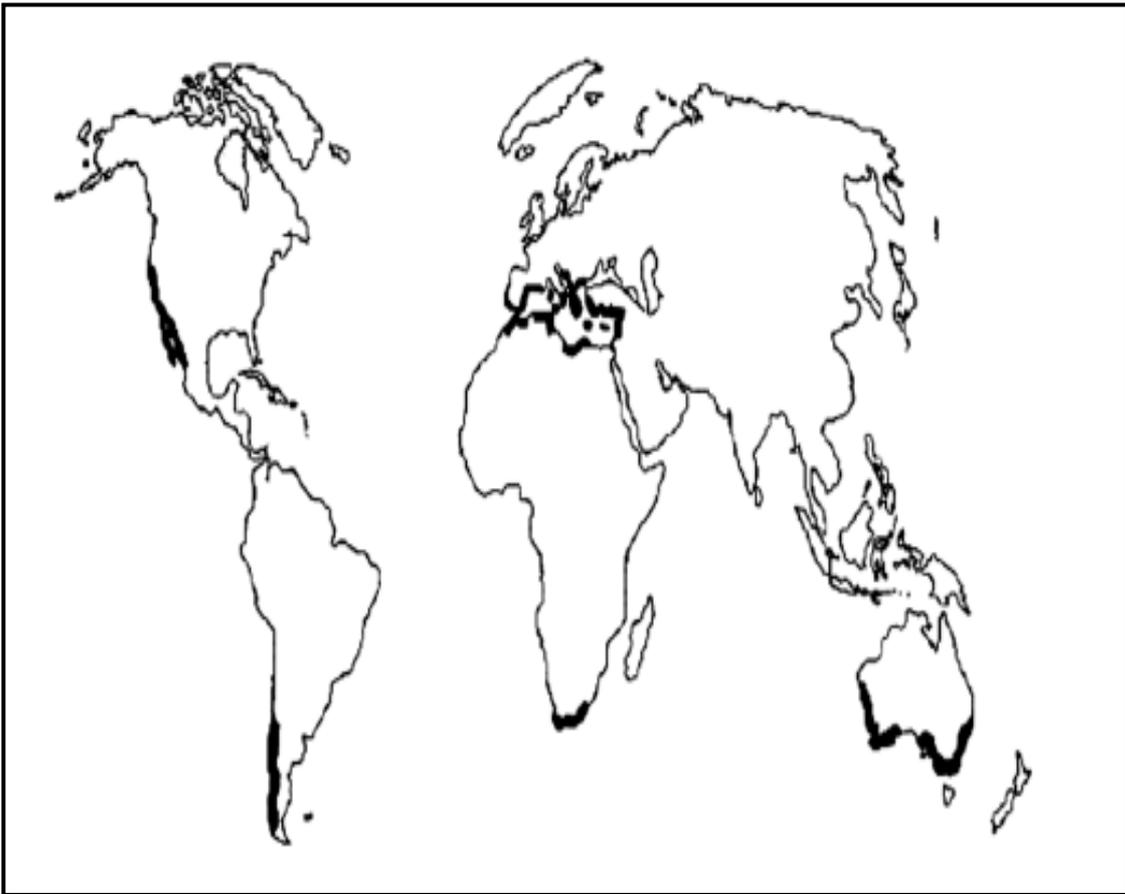


Figure 06. Air de distribution du caroubier dans le monde (Batlle et Tous, 1997).

3.1.2. Description et classification botanique du caroubier

Le caroubier est un arbre de croissance lente, d'une longévité importante dépassant souvent les 200 ans (Haddarah, 2013). Sa classification botanique est présentée dans le tableau 01.



Figure 07. Arbre du caroubier.

Tableau 01. Classification botanique de la caroube (Quezel et Santa, 1963)

Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Fabales</i> (Rosales)
Famille	<i>Fabaceae</i>
Sous famille	<i>Caesalpinioïdae</i>
Genre	<i>Ceratonia</i>
Espèce	<i>Ceratonia siliqua</i> L.

Les caroubes sont réunies en grappes simples. Ce sont des gousses indéhiscentes, de grande taille : 10 à 30 cm de longueur, 1,5 à 3 cm de largeur et de 1 à 2 cm d'épaisseur. Chaque caroube pèse environ 15 à 30 grammes. La gousse est séparée à l'intérieur par des cloisons pulpeuses et renferme 12 à 16 graines brunes dont la longueur et la largeur sont respectivement de 8 à 10 mm et de 7 à 8 mm (Batlle et Tous, 1997).

La couleur de la caroube est d'abord verte, puis elle devient brune foncée à maturité. Pour arriver à cette maturité, la caroube nécessite généralement 9 à 10 mois, correspondant à trois stades de développement :

- le premier stade est caractérisé par une lente croissance en automne et en hiver ;
- le second correspond à un développement actif et une croissance rapide des gousses au printemps ;
- au dernier stade, la gousse mûrit et se durcit en juin-juillet (Benmahioul *et al.*, 2011).

3.2. Description et composition du fruit du caroubier

La pulpe et les graines sont les deux principaux constituants de la gousse mûre du caroubier (Figure 08) et représentent respectivement 90% et 10% de son poids total (Gabriela Bernardo-Gila, 2011).



Figure 08. Présentation de la gousse de la caroube, pulpe et graine

(Mulet *et al.*, 2015).

Selon plusieurs auteurs, la composition de la pulpe (Tableau 02) dépend en général, du cultivar, de l'origine et parfois de la période de récolte (Kaderi *et al.*, 2014).

Tableau 02. Composition de la pulpe de la caroube

Composant	Teneur	Référence
Sucres (saccharose, glucose et fructose) (%)	48-56	Avallone <i>et al.</i> (1997)
Lipides (%)	0,4-0,6	
Protéines (%)	2-6	
Fibres (%)	27-50	Saura-Calixto (1988)
Polyphénols totaux (%)	0,19 à 19	(Avallone <i>et al.</i> , 1997; Kumazawa <i>et al.</i> 2002 ; Makris et Kefalas, 2004; El-Sherif <i>et al.</i> , 2011 et Benchikh <i>et al.</i> , 2016).
Minéraux (en mg/100g de pulpe) :		Puhan et Wielinga (1996)
• K	1100	
• Ca	307	
• Mg	42	
• Na	13	
• Cu	0.23	
• Fe	104	
• Mn	0.4	
• Zn	0.59	

3.3. Utilisations et intérêt de la caroube

3.3.1. Utilisation traditionnelle

Toutes les composantes de l'arbre sont utiles et ont de la valeur :

La fleur est utilisée par les apiculteurs pour la production du miel de caroube, alors que les feuilles sont utiles pour l'alimentation des animaux. L'écorce et les racines sont utilisées en tannerie grâce à leur teneur en tanins (Kaderi *et al.*, 2014).

Le fruit du caroubier ou la caroube, se compose d'une pulpe enveloppant des graines régulières. En effet la pulpe sucrée de la caroube est employée depuis longtemps comme nourriture de bétail à côté d'autres aliments comme la farine d'orge (Ait Chitt *et al.*, 2007). Il est utilisé aussi comme aliment et nourriture pour l'homme, surtout dans le temps de pénurie de la nourriture (pendant les guerres) et dans certains cas comme des bonbons pour les enfants, en raison de la haute teneur en sucres de la pulpe (Gabriela Bernardo-Gila, 2011).

La farine, obtenue en séchant, torréfiant et moulant les gousses après les avoir débarrassées de leurs graines, est employée surtout en agro-alimentaire; dans la préparation de jus sucrés, du chocolat, de biscuits et comme remplaçant de cacao. En Egypte, on extrait des fruits un sirop qui est employé pour confire les fruits ; les Arabes fabriquent avec la pulpe une boisson alcoolisée et les Kabyles fabriquent à partir du fruit un plat appelé "*Tomina*" (Kaderi, 2014).

La gomme de caroube est extraite de l'albumen des graines de *Ceratonia siliqua* du fait de sa richesse en galactomannanes (unités de β -D-mannose et de α -D-galactose), issue de l'endosperme. Elle constitue le 1/3 du poids total de la graine (Avallone, 1997).

Cette gomme est utilisée dans l'agro-alimentaire comme épaississant connu sous le code normalisé E410 et dans la confiserie, le secteur cosmétique, pharmaceutique comme agent épaississant, gonflant, liant et stabilisant dans les préparations des émulsions (Haddarah, 2013).

Une autre utilisation des caroubes est la fabrication d'un produit laitier artisanal connu sous le nom de "*Mekika*". Ce produit est préparé par coagulation du lait avec l'extrait de gousses vertes de caroube (jus). Il est spécifique de la région Eklim El Kharoub au Liban dans où on le trouve en parallèle avec la culture du caroubier. La "*Mekika*" se consomme comme dessert, parfois comme diner après ajout de sucre ou de miel (Abi Azar, 2007).

3.3.2. Utilisation thérapeutique

La caroube étant riche en polyphénols, elle a suscité l'intérêt de plusieurs chercheurs notamment celui de Doha *et al.*, (2008) qui ont trouvé que les polyphénols de la caroube réduisaient le taux de glucose dans le sang et qu'ils avaient un index glycémique de 83,4%, selon les travaux de Ben Hsouna *et al.*, (1986) les polyphénols de caroube possèdent une activité antioxydante ainsi qu'antibactérienne et antifongique, de plus ils agissent contre le stress oxydatif au niveau des cellules du colon, ce qui leur confère la propriété anticancérogène ; cela a été démontré dans les travaux de Klenow *et al.*(2009).

Plusieurs études ont montré que l'utilisation des feuilles associées avec le polyéthylène glycol (PEG) améliore la digestibilité et la qualité nutritive des tanins contenus dans les feuilles, ces derniers ont été utilisés en Turquie, dans la médecine « traditionnelle » pour traiter la diarrhée et dans l'alimentation diététique. Ils ont été également désignés comme étant porteurs d'activités cytotoxique et antimicrobienne (Kaderi *et al.*, 2014).

L'huile essentielle du caroubier possède des propriétés antimicrobienne et cytotoxiques, et pharmaceutique (Ben Hsouna *et al.*, 2011). De nombreuses études cliniques ont souligné l'efficacité de la poudre de caroube dans le traitement des diarrhées aiguës infantiles (Serairi-Beji *et al.*, 2000).

La haute teneur en fibres de la caroube suggère qu'elle pourrait réduire le taux de cholestérol sanguin (Ruiz-Roso *et al.*, 2010). De plus un extrait de pulpe de caroubier riche en polyphénols augmentait l'oxydation des acides gras, reflétée notamment par une augmentation de la dépense énergétique et les taux de triglycérides mesurés après un repas (Gruendel *et al.*, 2006).

Les fruits sont riches en pectine et en tanins, les gaines sont riches en mannanes et en galactanes, qui sont de puissants antidiarrhéiques. La gomme de caroube est un épaississant alimentaire qui pourrait se révéler utile dans le traitement du reflux gastrooesophagien infantile. En cas d'insuffisance rénale chronique, la gomme de caroube retiendra dans le tube digestif, l'urée, la créatinine, l'acide urique, l'ammoniaque et les phosphates provoquant un abaissement important et bénéfique du taux d'urée dans le sang (Berrougui, 2007).

3.4. Polyphénols de la caroube

3.4.1. Polyphénols de la caroube mûre (sèche)

Les polyphénols se trouvent dans les gousses de caroube sous forme de granules brun clair, de taille entre 100 et 500 μm . Ces granules se trouvent dans la fraction fibreuse de la pulpe de caroube et peuvent être extraits par des solvants polaires, à haute température. Ces composés ont une masse moléculaire très élevée rarement rencontrée chez d'autres plantes (Würsch *et al.*, 1984). Presque la moitié des tannins ont une masse moléculaire comprise entre 3200 et 3600 Dalton (Tamir *et al.*, 1971).

La section d'une gousse de caroube examinée au microscope électronique montre la présence de larges cellules parenchymateuses remplies de granules de tanins ressemblant à des pièces d'ambre en microscopie optique et en analyse par diffraction à rayons X, les granules ne possèdent pas de structure cristalline (Würsch *et al.*, 1984).

Les composés phénoliques de la caroube sont à l'origine de sa propriété antioxydante (Hariri *et al.*, 2009). Kumazawa *et al.* (2002) ont montré que cette activité antioxydante du polyphénol brut de la gousse de caroube était élevée.

Owen *et al.* (2003) ont procédé à l'extraction et l'identification de 24 composés phénoliques différents présents dans la fibre de la caroube (Figure 03, Annexe 01). Ces composés se groupent en acides phénoliques (acide cinnamique, acide coumarique, acide ferulique, acide syringique, acide gallique, methyl gallate), flavones (apigénine, chrysoeriol, tricétine 3',5'-diméthyl éther, lutéoline), flavonols (quercétine, isorhamnétine, myricétine, kaempferol), glycosides de flavonol (kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside, quercétine-3-O- α -L-rhamnoside, quercétine arabinoside, myricétine-3-O- α -L-rhamnoside, glycoside de myricétine), flavanones (naringénine), isoflavone (genistéine), gallotannins (1,6-di-O-galloyl- β -D-glucose, 1,2,6-tri-O-galloyl- β -D-glucose, 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- β -D-glucose).

Les gousses mûres de la caroube sont riches en tanins condensés et possèdent des teneurs faibles en tanins hydrolysables (Joslyn *et al.*, 1968).

L'extrait de la pulpe de la caroube contient une teneur relative importante en acide gallique au stade mature qui est de 19,53% (Benchikh *et al.*, 2016). En effet, Nachtomi et Alumot (1963) et Joslyn *et al.* (1968) ont rapporté que les gousses mûres sont plus riches en acide gallique que les gousses vertes. Cette augmentation est probablement due à la dégradation des tannins ou de leurs dérivés (monogalloylglucoside, digalloylglucoside, trigalloylglucoside et tétragalloylglucoside) (Benchikh *et al.*, 2016).

3.4.2. Polyphénols de la caroube verte

Dans la littérature, très peu d'études sont consacrées aux gousses vertes de la caroube. Une étude récente effectuée par (Benchikh *et al.*, 2016) montre que la teneur en composés phénoliques totaux la plus élevée a été enregistrée au stade immature (19,82 g/100 g). Les gousses vertes sont riches en tanins hydrolysables et pauvres en tanins condensés (Joslyn *et al.*, 1968).

Nachtomi et Alumot (1963) ont identifié plusieurs catéchines et leuco-anthocyanines dans les gousses vertes : gallocatéchine, épicatechine, épicatechine gallate et catéchine. Ces molécules sont considérées comme les précurseurs possibles des tannins condensés qu'on trouve dans les gousses mûres.

L'extrait de la caroube verte présente une concentration élevée en polyphénols totaux, dont trente composés phénoliques ont été identifiés d'après les spectres de masse obtenus en couplage chromatographie liquide haute performance et la spectrométrie de masse (Abi Azar, 2007). Les polyphénols des gousses vertes de la caroube sont très riches en acide gallique sous différentes formes, acide gallique, flavan 3-ols (gallocatéchine et gallocatéchine gallate) et gallotannins qui apparaissent majoritaires. L'extrait de caroube contient également des flavonols (quercétine, myricétine et kaempferol) sous forme de flavonols glucosides.

Tous les composés qui ont été identifiés dans l'extrait de gousses vertes de caroube ont été également retrouvés dans les fibres des gousses mûres (Owen *et al.*, 2003 ; Papagiannopoulos *et al.*, 2004). L'acide gallique se trouve en quantités moindres au profit des tannins hydrolysables, di-, tri- et tetra-galloyl-glucose. Au contraire, dans les gousses mûres, l'acide gallique libre constitue 41,8% (en masse) des polyphénols totaux (Owen *et al.*, 2003). Il semble que l'acide gallique trouvé dans les gousses mûres est un dérivé, par hydrolyse enzymatique, de tanins hydrolysables plus complexes abondants dans les gousses vertes (Joslyn *et al.*, 1968).

l'étude effectuée par (Benchikh *et al.*, 2016) a apporté l'identification de 15 composés phénoliques (Figure 09) à savoir monogalloylglucoside, monogalloyldiglucoside, acide gallique, digalloylglucoside, dérivé de digalloylglucoside, dérivé de digalloylglucoside, trigalloylglucoside, digalloylglucoside, trigalloylglucoside, tétragalloylglucoside , dérivé d'acide cinnamique , et comme flavonoïdes, l'étude a identifié myricétine rhamnoside, quercétine rhamnoside, kaempférol (Figure 10).

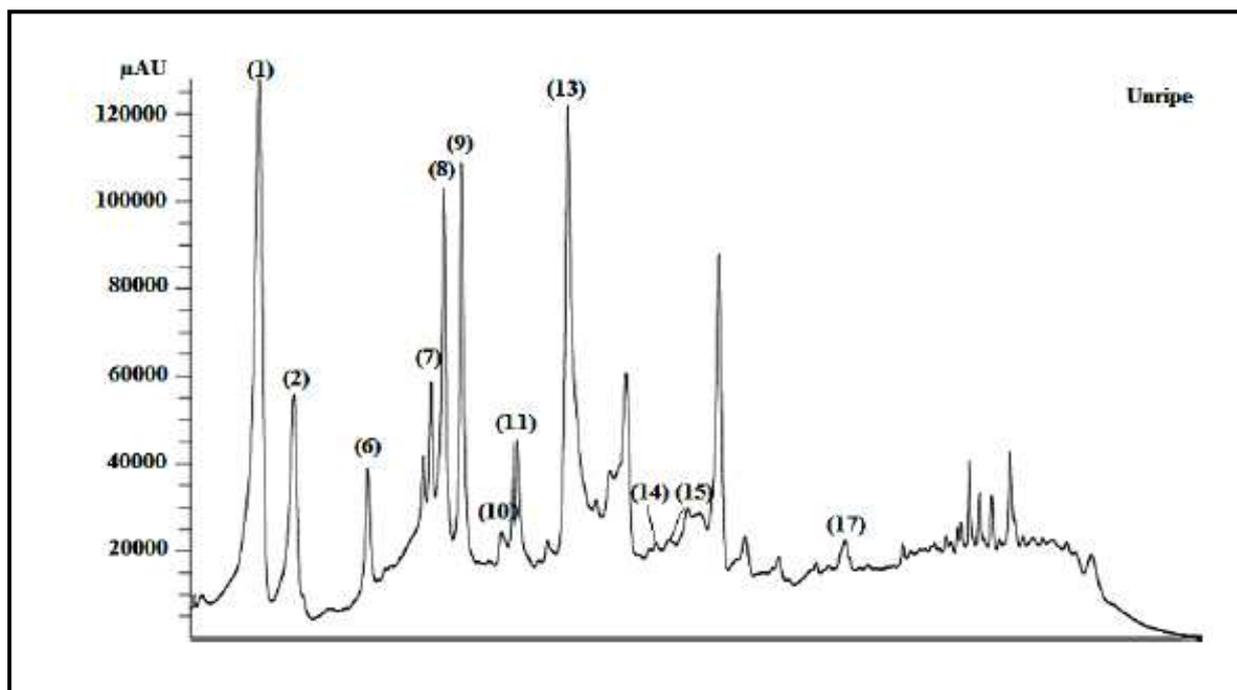


Figure 09. Chromatogramme HPLC des polyphénols de la caroube verte (Benchikh *et al.*, 2016).

Les composés identifiés étaient: (1) monogalloylglucoside, (2) acide gallique, (3-5) monogalloyl-diglucoside, (6 et 10) digalloylglucoside, (7) dérivé du digalloylglucoside, (8) dérivé de digalloylglucoside, (9) trigalloylglucoside, (11 et 13) tetragalloylglucoside, (12) dérivé de l'acide gallique, (14) dérivé l'acide cinnamique, (15) myricétine rhamnoside, (16) rhamnoside de quercétine, (17) kaempférol, et (18) apigénine.

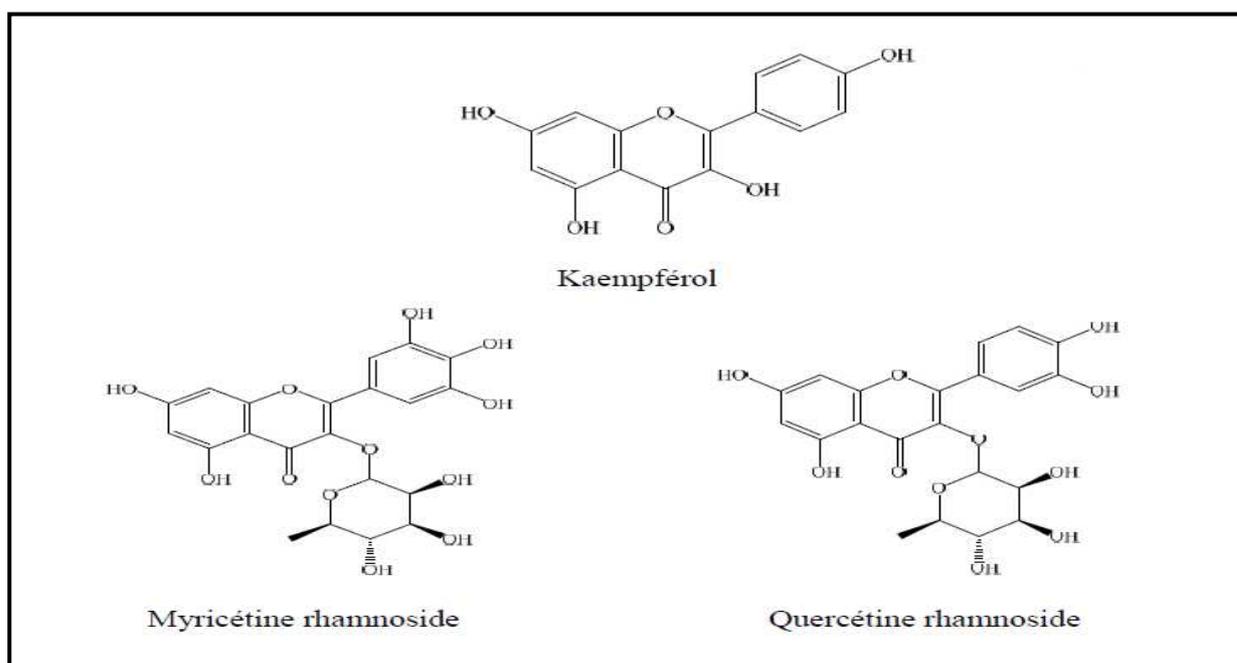


Figure 10. Structure des flavonoïdes et leurs dérivés identifiés dans la caroube verte (Benchikh, 2015).

Matériel et méthodes

Nous rappelons que le principal objectif de cette étude est la caractérisation polyphénolique des extraits de la caroube verte et l'étude de la possibilité d'incorporation de ces deux extraits dans une formulation d'un yaourt et leurs effets sur la précipitation des protéines laitières.

1. Matériel végétal

La matière première utilisée dans ce présent travail est constituée de gousses vertes de caroube (*Ceratonia siliqua L.*). Elles ont été récoltées au stade immature (gousses entièrement formés mais de couleur verte), au niveau de la ville d'AKBOU, wilaya de BEJAIA, en mois de mai 2016 (Figure 01, Annexe 03).

Après la récolte, une quantité des gousses vertes a été utilisée au niveau du laboratoire de contrôle de la qualité de la laiterie RAMDY située au niveau de la zone industrielle de la ville d'AKBOU, l'autre quantité a été utilisée au niveau du laboratoire de recherche BIOQUAL de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agroalimentaires (I.N.A.T.A.A.), où elles ont subi différents traitements.

2. Méthodes appliquées

La démarche optée pour la réalisation de ce travail (Figure 11) est scindée en deux parties, la première partie est réservée au traitement de la matière première, l'extraction du jus à partir des gousses fraîches, et les composés polyphénoliques à partir de la poudre lyophilisée ainsi que le dosage des polyphénols et l'évaluation de l'activité antioxydante dans les deux extraits. Cette étape a été effectuée au niveau du laboratoire de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agroalimentaires (I.N.A.T.A.A.).

La deuxième partie concerne l'élaboration des trois produits (yaourt témoin, coagulum élaboré à base d'un mélange de ferments lactiques et du jus de caroube et un coagulum élaboré avec seulement du jus de caroube), la caractérisation physicochimique du jus de caroube, le lait destiné à la formulation et les produits élaborés, ainsi qu'une caractérisation microbiologique des produits finis. Cette partie a été réalisée au niveau des laboratoires physicochimique et microbiologique de la laiterie RAMDY.

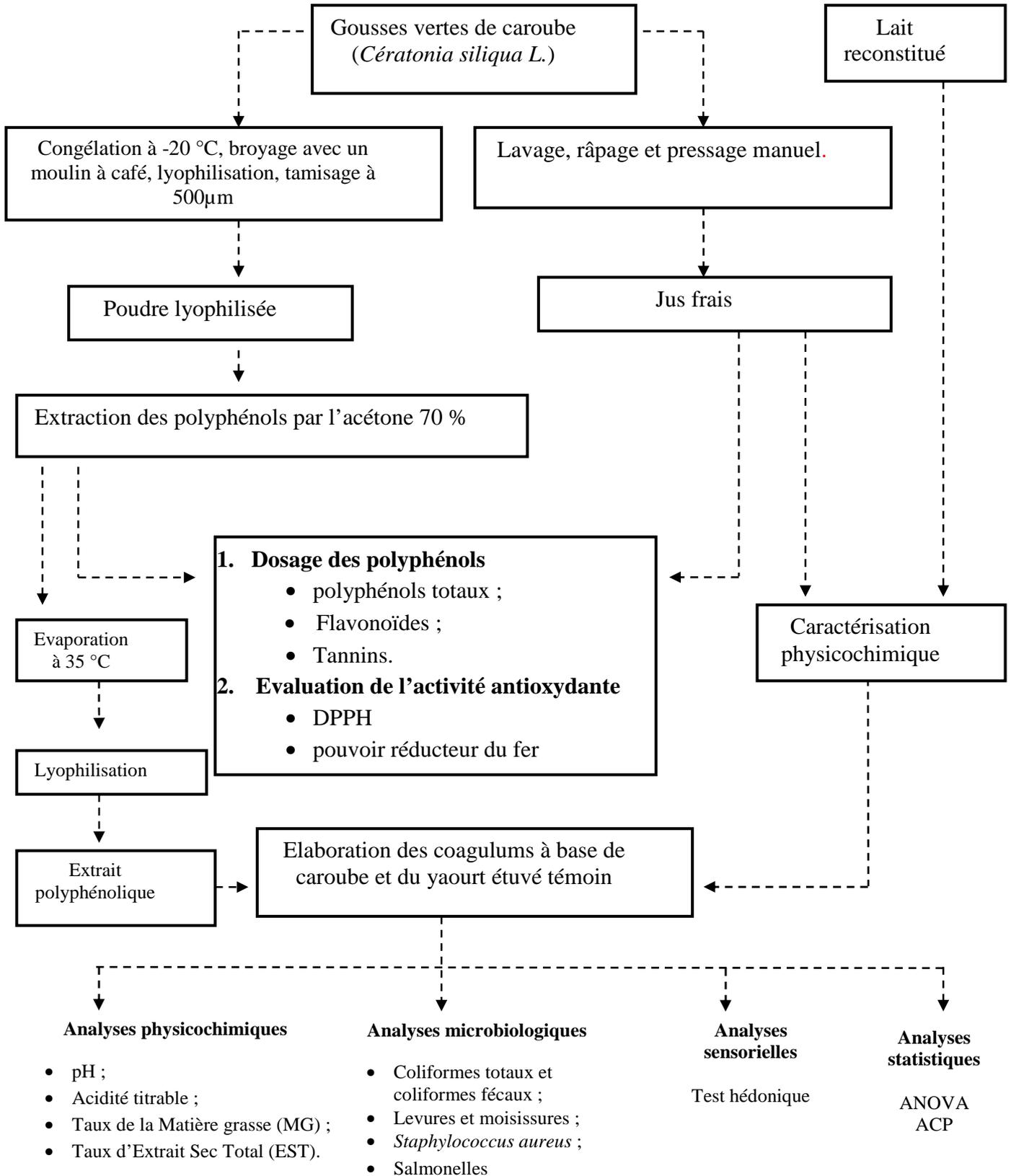


Figure 11. Diagramme général de la méthodologie du travail suivie.

2. 1. Procédure d'extraction

2.1. 1. Extraction des composés polyphénoliques

a. Prétraitement de la matière première

Avant de procéder à l'étape d'extraction des composés polyphénoliques, la caroube a subi des prétraitements selon le protocole de Benchikh et Louailèche (2014) modifié et résumé dans la figure 12.

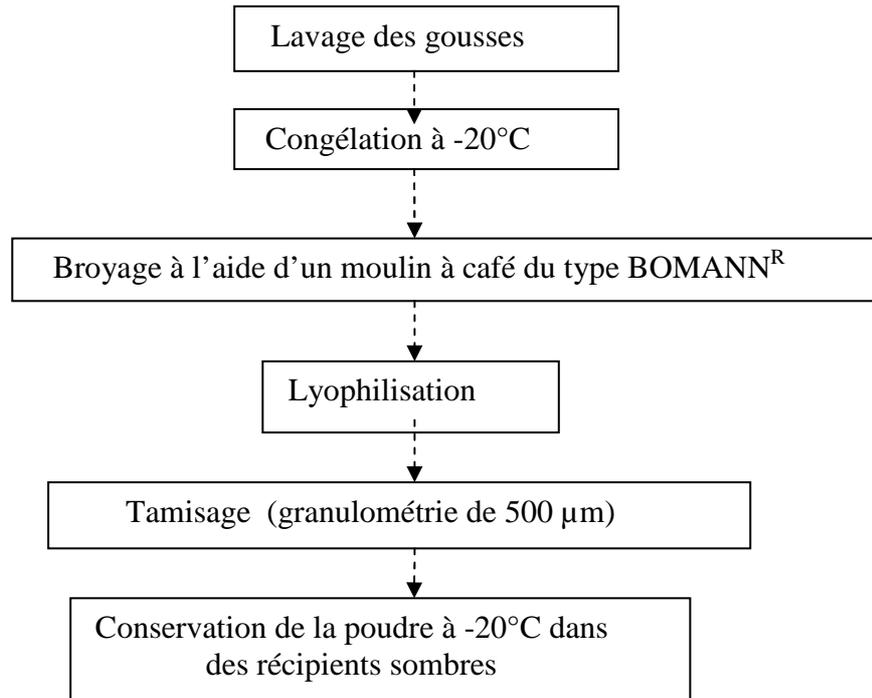


Figure 12. Préparation des gousses de caroube pour l'extraction des composés polyphénoliques (Benchikh et Louailèche, 2014).

b. Extraction par l'acétone (70%)

Beaucoup d'auteurs ont étudié l'influence de différentes conditions d'extraction sur les rendements d'extraction de composés polyphénoliques de source végétale. La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante, qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols. Entre autre, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé. Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié à l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante (Mahmoudi *et al.*, 2013).

L'extraction solide-liquide, en utilisant un mélange aqueux d'un solvant organique, a été utilisée dans notre cas.

L'acétone 70 % a été choisi comme solvant d'extraction des composés polyphénolique de caroube parce qu'elle donne le meilleur rendement d'extraction des polyphénols par rapport aux autres solvants tels que le méthanol, l'éthanol et l'eau, cela a été démontré par Benchikh et Louailèche (2014) dans leur étude sur l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques à partir de caroube. En effet, le solvant acétonique a l'avantage de précipiter les protéines et d'extraire faiblement les sucres (Charpentier *et al.* 2006). En outre, l'addition de l'eau aux solvants organiques permet d'augmenter la solubilité des polyphénols par modulation de la polarité du solvant en question. En fait, le mélange acétone/eau extrait mieux les polyphénols polaires (Benchikh et Louailèche, 2014).

Pour extraire les polyphénols à partir de la poudre de la caroube lyophilisée, nous avons opté pour le protocole de Benchikh et Louailèche (2014) (Figure 13).

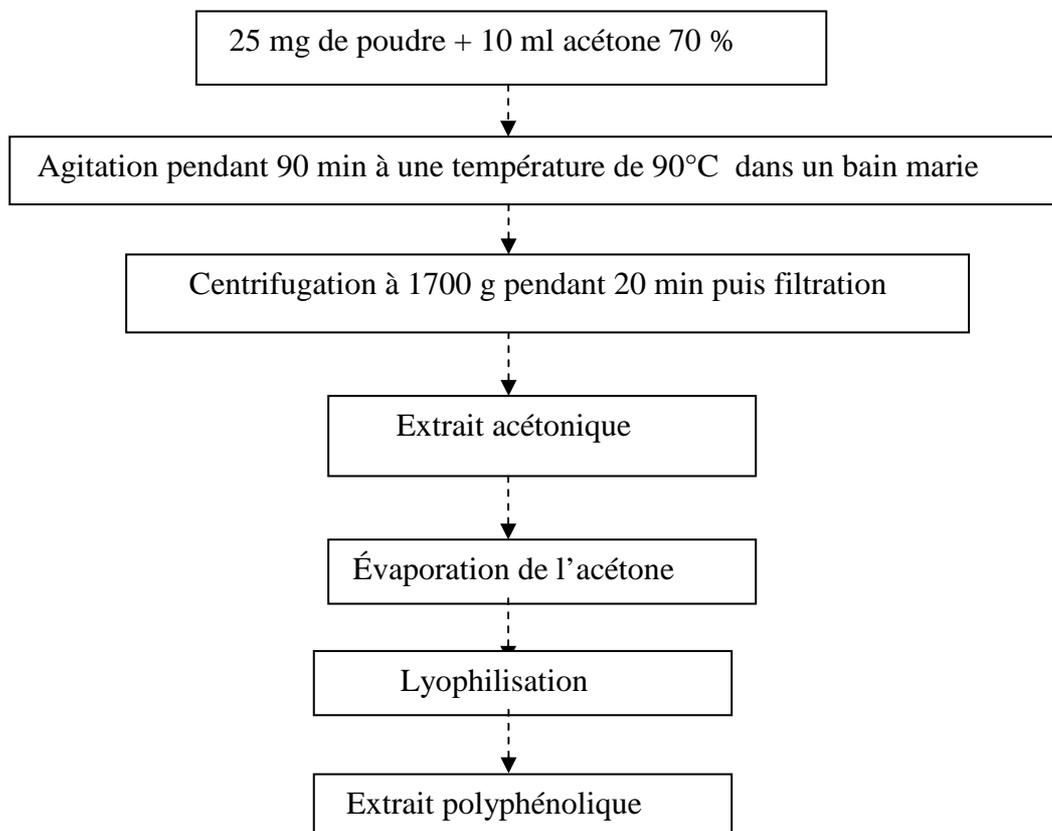


Figure 13. Extraction des polyphénols à partir de la poudre de caroube (Benchikh et Louailèche, 2014).

2.1.2. Extraction du jus à partir des gousses vertes de la caroube

L'extraction du jus a été effectuée sur des gousses fraîches de caroube après avoir subit un lavage préalable, un râpage et un pressage manuel.

Le jus (Figure 03, Annexe 03) a été porté à ébullition pendant 10 min afin de l'assainir et de détruire toute activité enzymatique et tout germe microbien. Après refroidissement à température ambiante, il est conservé dans flacons stériles, hermétiquement fermés à l'abri de la lumière et à une température de 4°C, jusqu'à utilisation.

Le rendement en jus est défini comme étant le rapport entre la masse du jus obtenue après extraction et la masse de la matière végétale (caroube verte) utilisée. Le rendement exprimé en pourcentage (%) est calculé par la formule suivante :

$$RE = (M_2 \times 100) / M_1$$

Où :

RE : Rendement en jus en % ;

M₁ : Masse de la caroube utilisée en gramme (g).

M₂ : Masse du jus extrait en g.

2.2. Dosage des composés polyphénoliques

Avant de procéder aux différents dosages, l'extrait acétonique et le jus ont été dilués avec les facteurs de dilution de 1/15 et 1/1000, respectivement en se basant sur des tests préliminaires.

2.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux, basé sur La méthode de Folin-Ciocalteu, a été décrit dès 1965 par Singleton et Rossi. Depuis, son utilisation, celle ci est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines les plus diverses (Charpentier et Boizot, 2006).

Le réactif de Folin, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀), est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximale aux environs de 750 -765 nm (Bonnaillie *et al.*, 2012).

Le dosage et la teneur en polyphénols totaux (PT) sont déterminés selon la méthode de Géorgie *et al.* (2005) dont les différentes étapes sont résumées dans la figure 14.

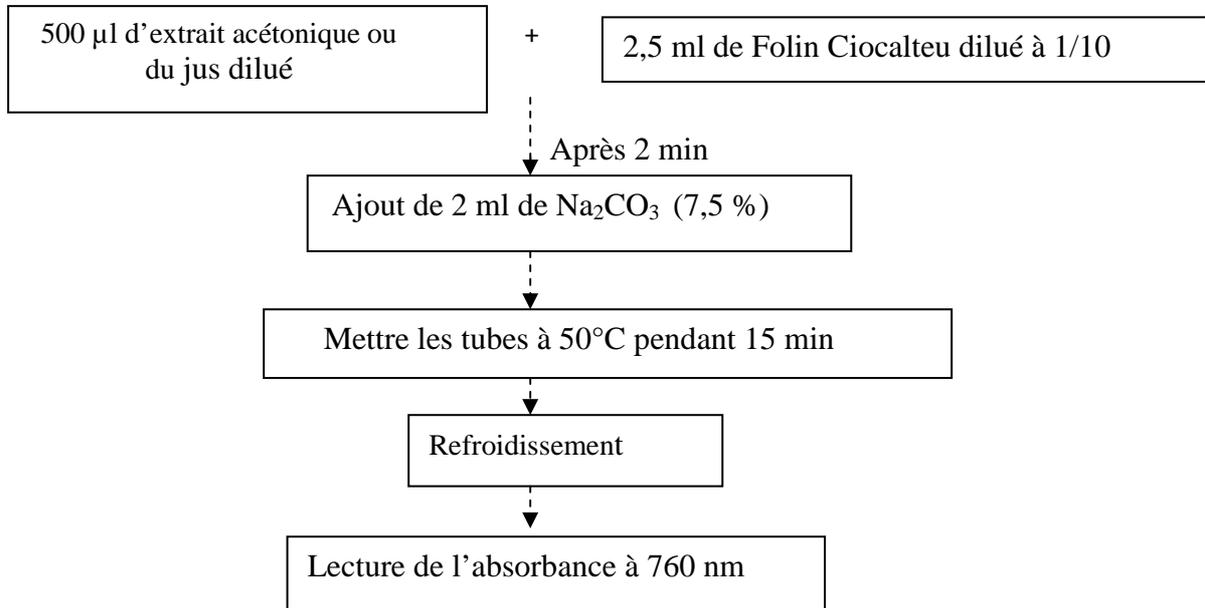


Figure 14. Récapitulation des étapes de dosage des polyphénols totaux (Géorgie *et al.*, 2005).

La concentration en PT est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard (Figure 01; Annexe 04). Les résultats sont exprimés en mg Equivalent Acide Gallique par 100 ml du jus (mg EAG/ 100 ml du jus) et en mg EAG/g d'extrait sec pour la poudre de caroube (poids sec).

2.2.2. Dosage des flavonoïdes

La propriété chélatante des flavonoïdes est basée sur la formation de complexe flavonoïdes-métaux tel que l'aluminium sous forme de chlorure d'aluminium (AlCl₃). La liaison des atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes avec le chlorure d'aluminium forme des complexes jaunâtres (Ribéreau-Gayon, 1968). Le dosage et la teneur en flavonoïdes sont déterminés par la méthode colorimétrique (Quettier-Deleu *et al.*, 2000) (Figure 15).

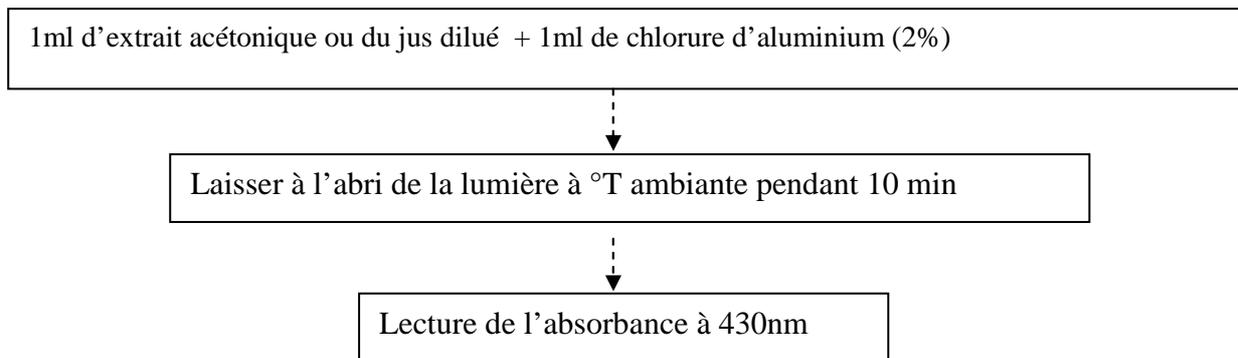


Figure 15. Récapitulation des étapes du dosage des flavonoïdes (Quettier-Deleu *et al.*, 2000).

La teneur en flavonoïdes est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard (Figure 02 ; Annexe 04). Elle est exprimée en mg Equivalent Quercétine par 100 ml du jus (mg EQ/ 100 ml du jus) et en mg EQ/ g de poids sec pour la poudre.

2.2.3. Dosage des tanins

a. Tanins condensés

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide. Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère (Ba *et al.*, 2010).

Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500nm (Schofield *et al.*, 2001) (Figure 16).

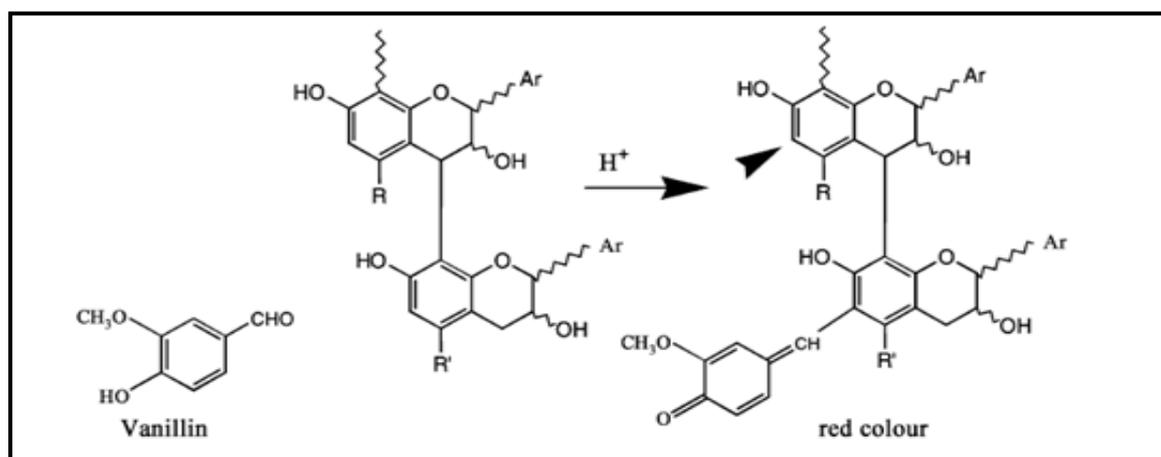


Figure 16. Présentation chimique du test de vanilline pour les tanins condensés (Schofield *et al.*, 2001).

La quantification des tanins condensés dans l'extrait polyphénolique ou bien dans le jus frais a été effectuée selon le protocole de Heimler *et al.* (2006).

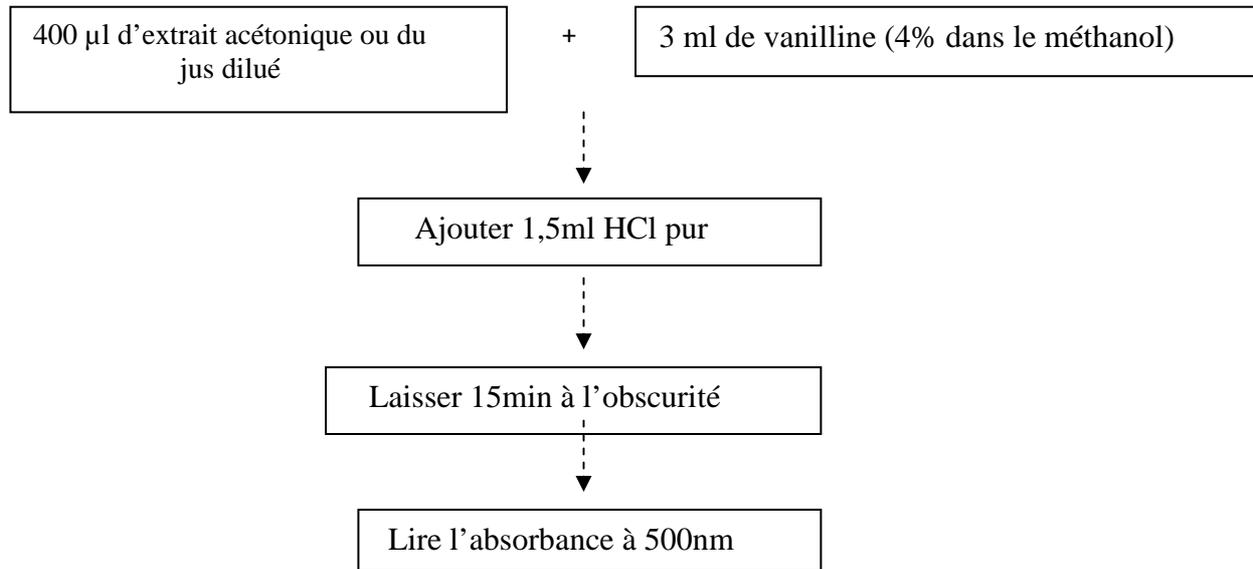


Figure 17. Récapitulation des étapes de dosage des tanins condensés (Heimler *et al.*, 2006).

La teneur en tanins condensés est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la catéchine comme standard (Figure 03 ; Annexe 04). Elle est exprimée en mg Equivalent Catéchine par 100ml du jus (mg EC/ 100 ml du jus) et en mg EC/ g de poids sec pour la poudre.

b. Tanins hydrolysables

La propriété principale des tanins est la précipitation des protéines en fonction des facteurs liés au milieu réactionnel (pH, température et temps). L'utilisation de la BSA (Albumine Sérique Bovine ou *Bovin Serum Albumin*) en milieu acide a pour objectif de séparer les tanins des autres polyphénols présents dans l'extrait. Le chlorure ferrique (Fe Cl_3) réagit avec les tanins (en milieu alcalin: SDS/TEA) (Sodium Dodecyl Sulfate/Triéthanolamine ou Trolamine) pour former des chélates de couleur violette (Fe-phénolate) qui sont déterminés par spectrophotométrie (Hagerman et Butler, 1989).

La quantification des tanins hydrolysables est réalisée par la méthode de Hagerman et Butler (1978) (Figure 18).

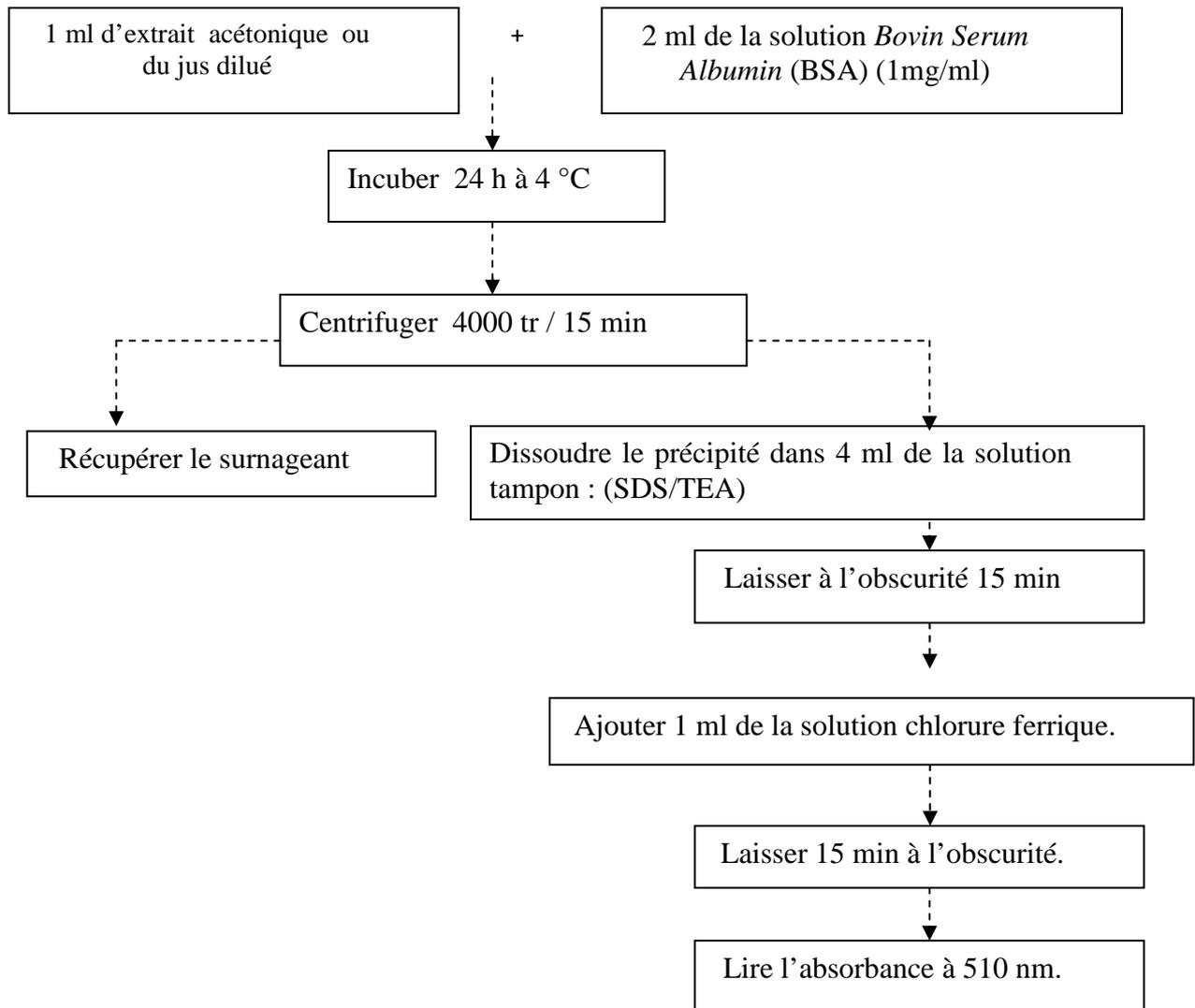


Figure 18. Récapitulation des étapes de dosage des tanins hydrolysables (Hagerman et Butler, 1978).

La teneur en tanins hydrolysables est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide tannique comme standard (Figure 04 ; Annexe 04). Elle est exprimée en mg Equivalent Acide Tannique par 100 ml du jus (mg EAT/ 100 ml du jus) et en mg EAT/g de poids sec pour la poudre.

2.2.4. Détermination de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'extrait polyphénolique et du jus frais a été évaluée *in vitro* par deux méthodes :

- Pouvoir de piégeage du radical DPPH;
- Pouvoir réducteur du fer ferrique en fer ferreux.

2.2.4.1. Test de l'activité antiradicalaire

La réduction du radical libre DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence des extraits.

Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. La forme non radicalaire DPPH-H est formée. Cette réduction est représentée par le changement de la couleur initiale violet (DPPH) et l'apparition de la couleur jaune (DPPH-H). Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Les réactions ont lieu à température ambiante et en milieu éthanolique, qui permet une bonne solubilisation de la plupart des antioxydants. Ce test est très utilisé, car il est rapide, facile et non couteux (Figure 19) (Hadbaoui, 2012).

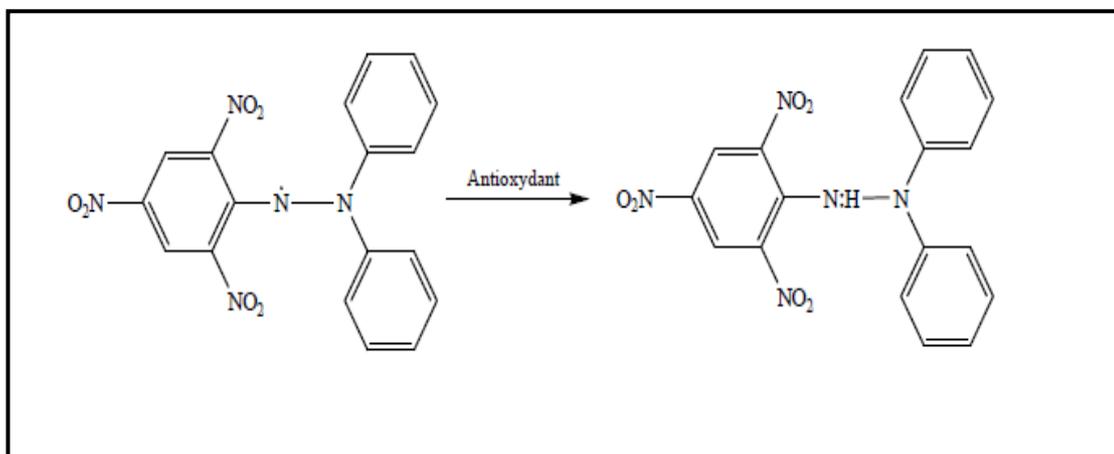


Figure 19. Réduction du radical DPPH° (Molyneux, 2004).

Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH°, qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon.

La mise en évidence du test de l'activité antiradicalaire (DPPH) de l'extrait polyphénolique et du jus étudiés, est effectuée selon la méthode de (Brand-Williams, 1995) (Figure 20).

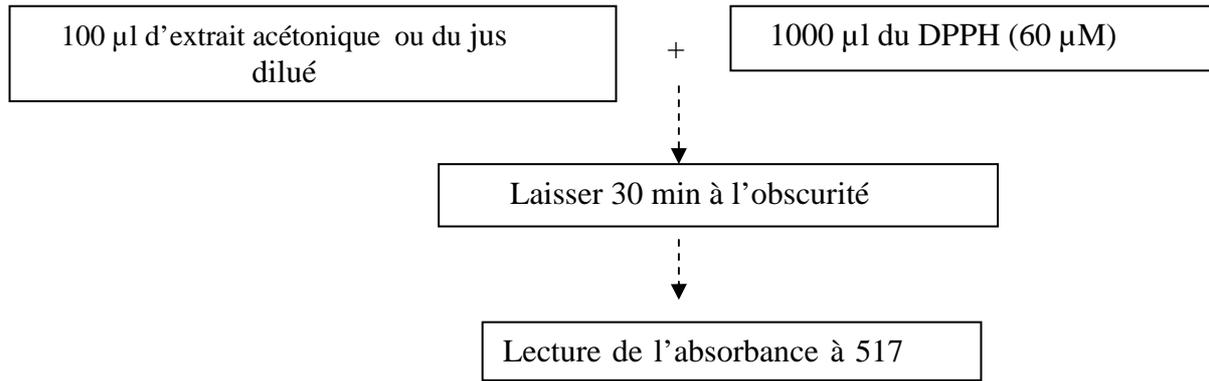


Figure 20. Récapitulation des étapes d'évaluation de l'activité antiradicalaire (Brand-Williams, 1995).

Le pouvoir d'inhibition du radical libre, exprimé en %, est déterminé en appliquant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$$

A₀ : Absorbance du témoin (constitué par le solvant d'extraction et la solution de DPPH mais sans le l'extrait acétonique qui contient les polyphénols).

A₁ : Absorbance d'échantillon.

2.2.4.2. Pouvoir réducteur du fer

Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans l'extrait à réduire le fer ferrique Fe³⁺ du complexe ferricyanure en fer ferreux Fe²⁺. La forme réduite donne une couleur verte proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Odabasoglu *et al.*, 2004)

La méthode d'Oyaizu (1986) a été utilisée pour estimer le pouvoir réducteur. La procédure est résumée dans la figure 21.

Le pouvoir réducteur est estimé en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique utilisé comme standard (Figure 05, Annexe 04) et exprimé en Equivalent mg d'Acide Ascorbique par 100 ml du jus (mg EAA/100 ml du jus) et en mg EAA/g de poudre.

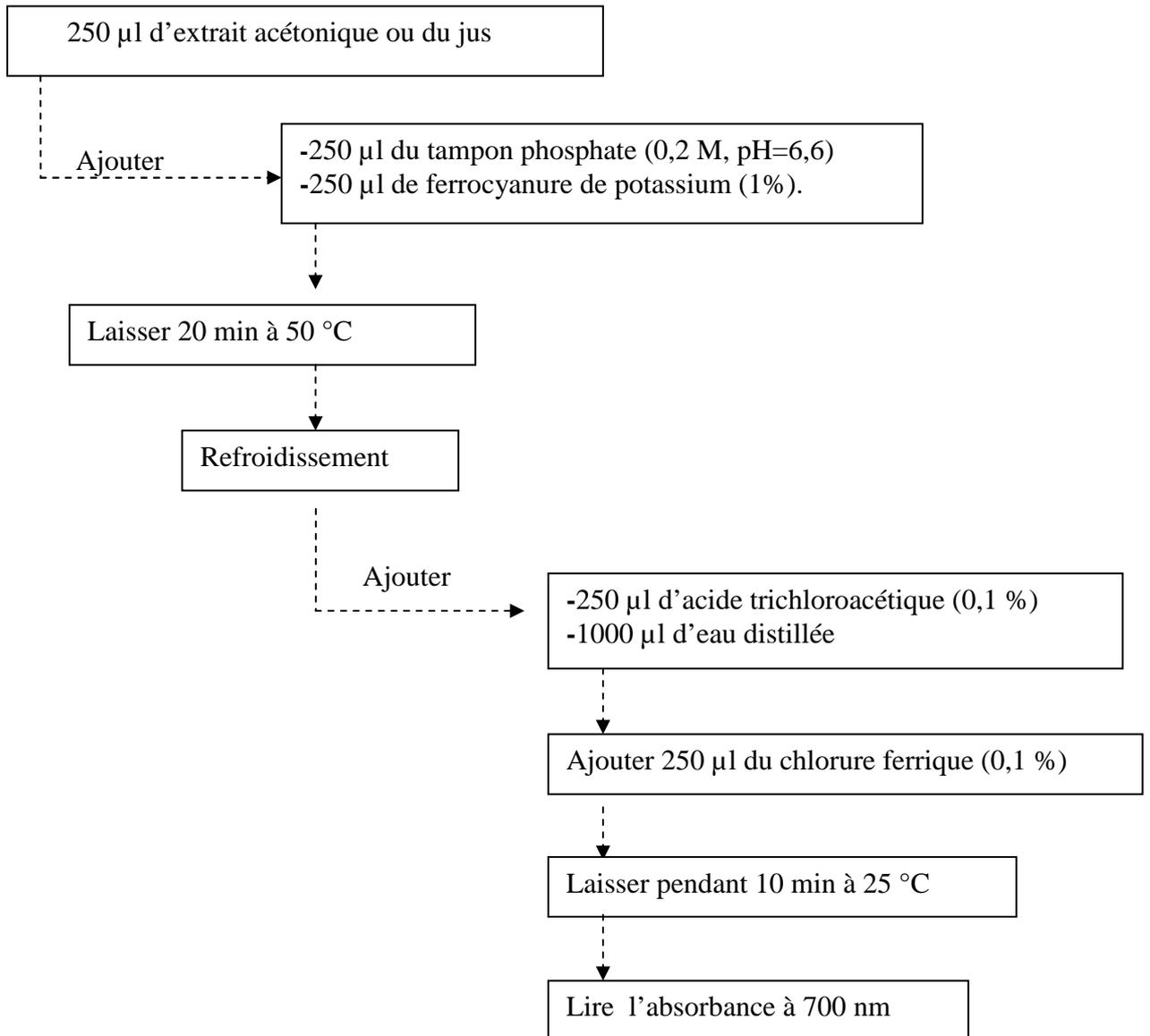


Figure 21. Récapitulation des étapes d'évaluation du pouvoir réducteur du fer (Oyaizu, 1986).

2.3. Essais d'élaboration de coagulums à base des extraits de la caroube verte

2.3.1. Mise en œuvre du diagramme de fabrication du yaourt étuvé RAMDY

Les différentes étapes de fabrication du yaourt étuvé au niveau de la laiterie RAMDY sont représentées dans la figure 22.

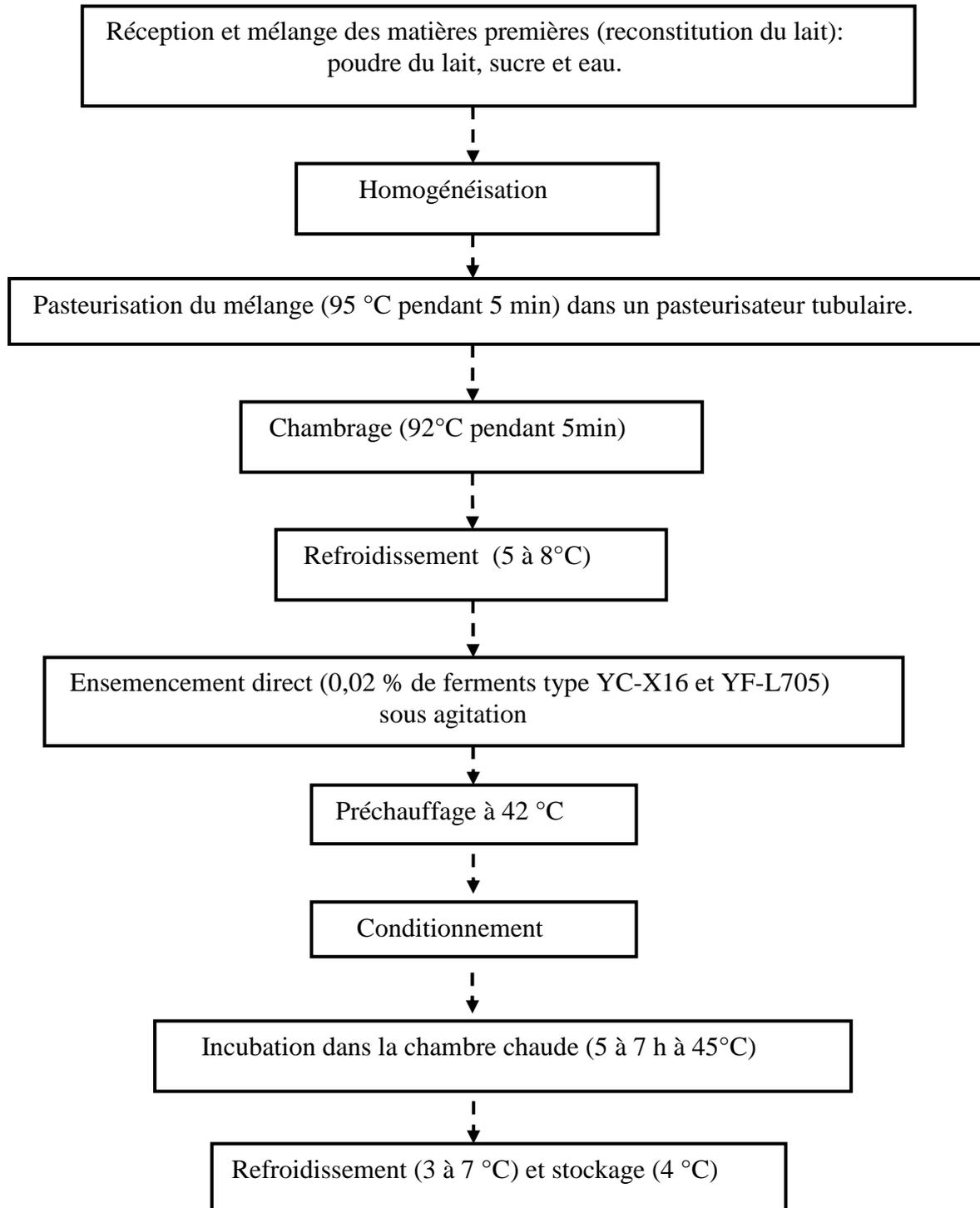


Figure 22. Diagramme de fabrication du yaourt étuvé RAMDY.

2.3.2. Incorporation des deux extraits (polyphénolique et du jus frais) de caroube verte

L'extrait acétonique a subi, un chauffage au rotavapeur (à une température de 35 °C) pour éliminer l'acétone utilisé durant l'étape d'extraction, puis une lyophilisation afin d'éliminer la fraction d'eau utilisé avec l'acétone pour une meilleure conservation. L'extrait obtenu est un Extrait Polyphénolique (EP).

L'incorporation de l'extrait polyphénolique (Figure 01, Annexe 06) et le jus frais de caroube verte a été effectuée au niveau du laboratoire microbiologique de la laiterie RAMDY dans des conditions stériles, au même stade d'ajout des ferments lactiques, tels que mentionnés dans le diagramme de fabrication du yaourt. Le lait utilisé dans la formulation correspond au même lait reconstitué destiné à la fabrication du yaourt témoin et il a été récupéré après l'étape de pasteurisation dans des conditions aseptiques.

L'extrait polyphénolique a été testé pour différentes concentrations, dans l'ordre de 1, 2, 3 et 4 mg pour 5 mg du lait (20, 40, 60 et 80%). Concernant le jus de caroube, après son ébullition pendant 10 minutes et refroidissement, trois doses ont été incorporées dans la formulation (5%, 10%, 15%) en se basant sur des tests préalables et sur des travaux antérieurs.

En tenant compte de tous les essais, trois types de produits ont été élaborés : Yaourt témoin, Coagulum incorporé de ferments lactiques et du jus de caroube et Coagulum à base du jus de caroube seul.

Nous avons donné le nom Coagulum pour le produit élaboré avec l'extrait polyphénolique et celui élaboré avec le jus de caroube car il n'a pas la même composition que le yaourt connu, la dénomination yaourt est exclusivement réservé au produit renfermant des ferments lactiques.

2.4. Analyses physicochimiques du lait, du jus et des produits élaborés

Les analyses physicochimiques ont été effectuées sur les matières premières (lait reconstitué et jus de caroube) ainsi que les produits élaborés (yaourt témoin et Coagulum de caroube) (Tableau 03).

Tableau 03. Paramètres mesurés sur les matières premières et les produits élaborés.

Produits	Analyses	Méthodes d'analyses
Lait	pH	Méthode par pH-mètre HANNA
	Acidité titrable (°D)	NF V 04.206
	Taux d'extrait sec total (EST) (%)	Dessiccation infrarouge
	Taux de matière grasse (MG) (%)	NF V04.210
Jus de caroube	Brix	Witherspoon et Jackson (1995)
	pH	Méthode par pH-mètre HANNA
	Taux d'extrait sec total (EST) (%)	Dessiccation infrarouge
Produit élaboré	pH	Méthode par pH-mètre HANNA
	Acidité titrable (°D)	NF V 04.206
	Taux d'extrait sec total (EST) (%)	Dessiccation infrarouge
	Taux de matière grasse (MG) (%)	NF V04.210

2.4.1. Mesure du pH

La mesure du pH a été effectuée à l'aide d'un pH-mètre HANNA.

La mesure s'effectue en introduisant les deux sondes (pH et température) dans l'échantillon de 40 ml préalablement chauffé à une température de 20-25°C. La valeur de pH est lue directement sur le pH- mètre.

2.4.2. Mesure de l'acidité

Le principe consiste à mesurer la teneur en acide lactique, elle est déterminée par titrage volumique à l'aide d'une solution alcaline.

L'analyse de l'acidité mesure les ions H^+ disponibles dans le milieu ; qu'ils soient dissociés, c'est-à-dire ionisés, ou non. Ainsi on déplace les équilibres chimiques pour neutraliser les ions H^+ des acides faibles. Le titrage de l'acidité se fait par la soude NaOH en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré. La figure 23 résume les différentes étapes de mesure de l'acidité.

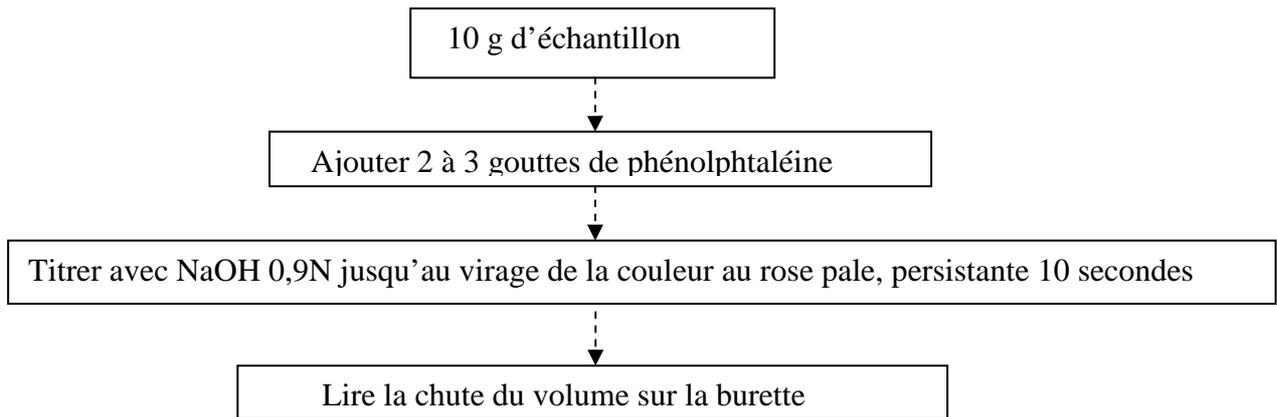


Figure 23. Etapes de mesure de l'acidité.

L'acidité s'exprime en équivalent d'acide lactique. Le degré Dornic (°D) correspond à 0,01g d'acide lactique par litre du produit. L'acidité en °D correspond à la chute de burette en ml×10.

$$A = V \times 10$$

A : acidité dornique.

V : volume en ml de la soude utilisée.

2.4.3. Mesure de l'extrait sec total

La matière sèche des échantillons étudiés est déterminée par évaporation au moyen d'un appareil balance dessiccateur. L'EST est la quantité ou le pourcentage du contenu anhydre de l'aliment, obtenue après dessiccation à une température de 105°C jusqu'à obtention d'une valeur constante. La mesure d'extrait sec est réalisée selon la figure 24.

La lecture se fait directement en lisant la valeur de matière sèche sur l'appareil en pourcentage (%).

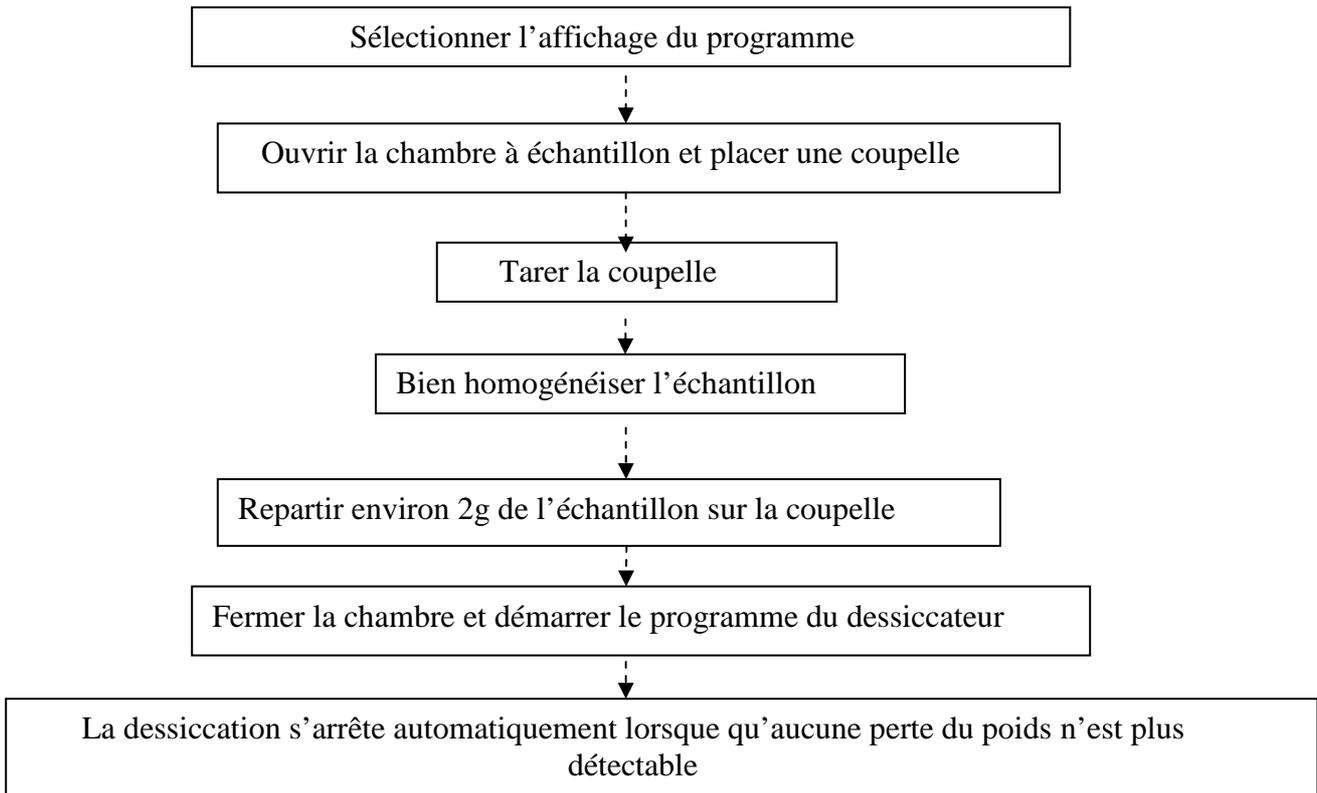


Figure 24. Etapes de mesure de l'extrait sec total.

2.4.4. Détermination de la teneur en matière grasse du lait

La teneur en matière grasse est déterminée selon la méthode de Gerber ou méthode acidobutyrométrique décrite par NF V04.210.

Les protéines sont dégradées par l'acide sulfurique et la chaleur produite fait fondre la matière grasse. L'alcool isoamylique aide à la séparation de la matière grasse. La centrifugation permet la séparation de la phase grasse de la phase aqueuse.

Les différentes étapes de la détermination de la matière grasse sont résumées dans la figure 25.

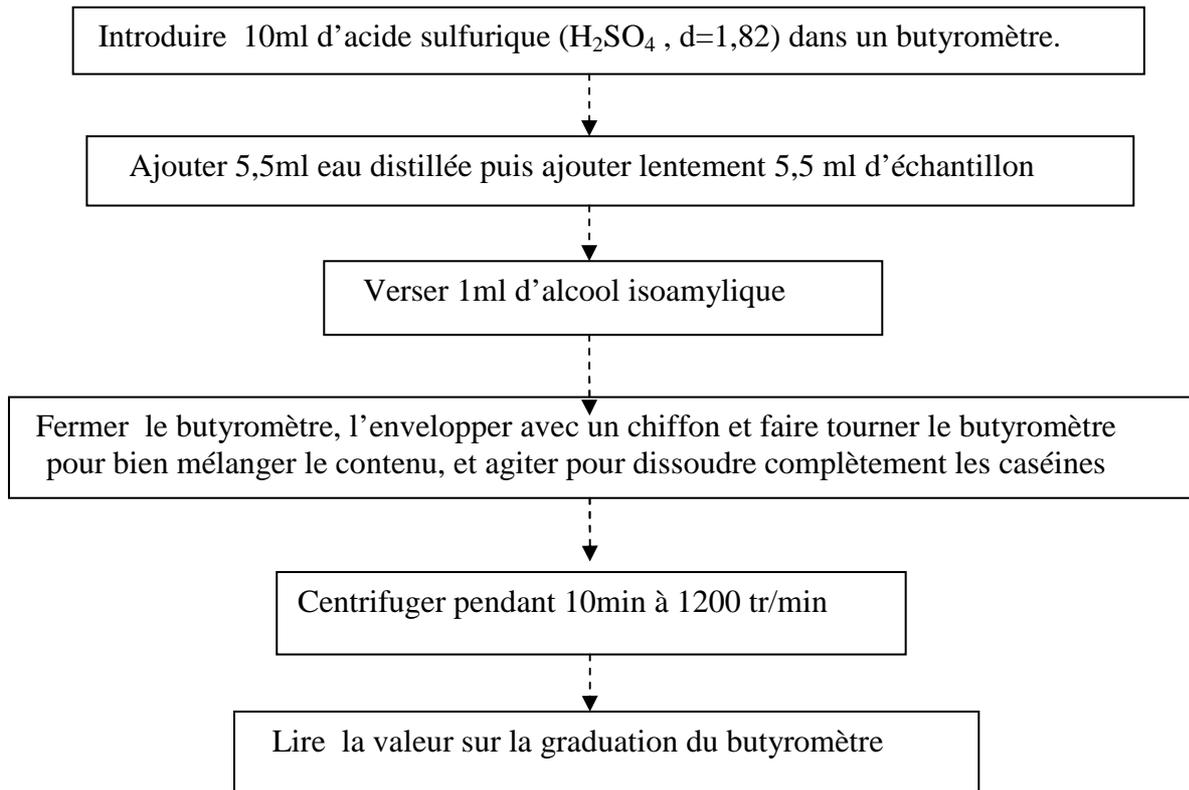


Figure 25. Etapes de détermination de la teneur en matière grasse du lait.

Remarque : dans le cas du yaourt ou des coagulums, après la soumission de l'acide sulfurique dans le butyromètre, on ajoute 5,5ml d'eau distillée puis on ajoute lentement 5,5 ml d'échantillon (il faut diluer le yaourt), ensuite on procède aux mêmes étapes de la détermination de la teneur en matière grasse que le lait.

Deux phases apparaissent l'une foncée, l'autre claire. C'est la phase claire qui représente le pourcentage de matière grasse dans l'échantillon et qu'on peut lire sur l'échelle graduée du butyromètre.

Lire sur l'échelle graduée du butyromètre X et X' :

$$\text{Teneur en MG (\%)} = X' - X$$

X : position inférieure.

X' : position supérieure.

2.4.5. Détermination de la teneur en matière sèche soluble par le Brix

Le degré Brix est l'un des critères de base utilisés pour la définition de jus de fruits. Théoriquement, il est bien connu que le degré Brix indique le pourcentage de matière sèche soluble dans l'eau du jus de fruit.

Le Brix du jus frais des gousses vertes de la caroube est déterminé avec un réfractomètre portable (HI - 96801). La lecture est faite en plaçant une goutte de jus, sur la plaque de charnière de l'instrument, face à la lumière. La valeur du Brix est lue à travers l'œil de l'instrument. Il est essentiel de nettoyer le réfractomètre avec de l'eau distillée après chaque lecture pour s'assurer qu'aucune particule ne reste sur la plaque articulée (Witherspoon et Jackson, 1995).

2.5. Analyses microbiologiques

Les germes recherchés et dénombrés dans les produits élaborés sont : les Coliformes totaux, les Coliformes fécaux, *Staphylococcus aureus*, les Salmonelles, les levures et les moisissures.

2.5.1. Recherche des coliformes totaux et fécaux

Le principe consiste à compter les colonies caractéristiques des coliformes totaux qui se développent en 24 h à 37°C et les coliformes fécaux qui se développent en 24 h à 44°C, sur la gélose Violet cristal Rouge neutre Bile Lactose (VRBL) (ISO 4832).

Le milieu de culture est une gélose VRBL avec un pH = 7,4 ± 0,2 à 25°C. Sa composition est donnée dans le Tableau 01, Annexe 07.

Le mode opératoire consiste à diluer 10 g d'échantillon dans 90 ml de la solution du Ringer ; prélever 1 ml de la dilution et l'introduire dans une boîte de pétrie stérile ; ajouter environ 15 ml de la gélose VRBL (ensemencement en masse). Après refroidissement de la gélose, ajouter une deuxième couche de gélose pour favoriser l'anaérobiose. Deux répétitions ont été effectuées. Incuber à 37°C pour les coliformes totaux et à 44 °C pour les coliformes fécaux pendant 24h. Après incubation, compter les colonies rouges violets. Le nombre de bactéries coliformes par gramme est donné par la formule suivante : $N = C \times (1/d)$

C : nombre de colonies ;

d : facteur de dilution.

2.5.2. Recherche de *Staphylococcus aureus*

Le principe repose sur le dénombrement des colonies caractéristiques apparues sur la gélose Baird Parker (ensemencement en surface), après une incubation pendant 48 heures à 37°C (ISO 6888-1). Le milieu de culture est une gélose Baird Parker pré coulée avec un pH de $7,2 \pm 0,2$ à 25°C, sa composition est donnée dans le Tableau 02, Annexe 07.

Le mode opératoire consiste à déposer 0,1 ml de la dilution (comme indiqué au dessus: 10 g d'échantillon dans 90 ml de la solution Ringer) à la surface du milieu Baird Parker pré coulée en boîte de Pétri stérile ; étaler soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible sans toucher les bords de la boîte puis incuber à 37 °C pendant 48h.

Les colonies caractéristiques de *Staphylococcus aureus* apparaissent noires brillantes et convexes entourées d'un halo d'éclaircissement après 48h d'incubation sur le milieu Baird Parker.

2.5.3. Recherche des levures et moisissures

L'isolement des levures et des moisissures nécessite des milieux sélectifs contenant des substances antibactériennes (ISO 7954 ; Guiraud, 2003).

Le milieu *Oxytetracycline-Glucose Yeast Extract agar* (OGYE) est le milieu utilisé dans cette étude, auquel un antibactérien est ajouté afin d'inhiber tout développement bactérien. 5 ml de l'oxytétracycline ont été ajoutés à 250 ml de l'OGYE (250 ml) préalablement fondue et l'ensemble est homogénéisé avant utilisation.

Le mode opératoire consiste à diluer 10 g d'échantillon dans 90 ml de la solution du Ringer ; prélever 1 ml de la dilution et l'introduire dans une boîte de pétrie stérile ; ajouter environ 15ml de la gélose OGYE additionné de 5ml de l'oxytétracycline pour 250ml du milieu (ensemencement en masse) puis incuber à 22°C pendant 5 jours.

Les colonies blanches représentent les levures par contre les moisissures apparaissent sous forme de poile de chat.

2.5.4. Recherche des salmonelles

La recherche des salmonelles se fait en suivant trois étapes qui sont : le pré-enrichissement, l'enrichissement et l'isolement sur un milieu sélectif (J.O-N° 42 du 15.06.2005).

Le pré-enrichissement consiste à diluer 25 ml d'échantillon à analyser dans 225 ml d'eau peptonée tamponnée (E.P.T) puis à l'incuber à 37 °C pendant 24 h. L'intérêt de cette étape pour la plupart des produits analysés est de permettre la récupération des bactéries stressées.

L'enrichissement consiste à préparer le Bouillon SFB D/C (Sélénite F Bouillon Double/Concentration) (avec ajout du disque SFB au tube); prélever 1 ml de pré enrichissement et l'introduire dans un tube contenant 10 ml du bouillon puis à incuber à 37 °C pendant 24h.

L'isolement sur gélose *Salmonella- Schigella* ou milieu (SS) consiste à prélever avec une anse quelques gouttes du milieu d'enrichissement et ensemercer en stries sur les boîtes de pétri contenant la gélose SS, puis à incuber à 37°C pendant 24h. Les salmonelles se présentent sous formes des colonies translucides avec un centre noir, comme elles peuvent se présenter sans centre noir.

2.6. Analyse sensorielle

L'analyse sensorielle a été effectuée au sein du laboratoire de contrôle de la qualité de l'unité industrielle RAMDY, à une température de 20°C (sous climatisation).

Un groupe de 50 personnes ont pris part à cette analyse sensorielle hédonique et les sujets sont constitués par le personnel des laboratoires et de l'unité de production de RAMDY. Les types de produits, au nombre de trois (yaourt témoin élaboré avec les ferments lactiques représenté par **A**, coagulum élaboré avec un mélange de ferments lactiques et du jus frais de la caroube représenté par **B** et le coagulum élaboré avec seulement du jus de caroube représenté par **C**).

Les produits élaborés **A**, **B** et **C** sont présentés simultanément aux sujets avec comme accompagnement de l'eau. L'analyse s'est déroulée comme suit : on demande à chaque sujet de remplir une fiche d'analyse sensorielle, contenant toutes les informations relatives aux paramètres de dégustation (Annexe 08). Après dégustation de chaque produit étudié, il est demandé aux sujets de boire de l'eau pour enlever le goût du précédent échantillon.

2.7. Analyse statistique

Toutes les analyses physicochimiques effectuées ont été répétées trois fois, et les résultats obtenus ont été traités statiquement à l'aide d'un logiciel statistique XLSTAT version

7.5.2 par une analyse de la variance paramétrique (ANOVA) pour déterminer la signification des différences d'un produit à un autre (le seuil de signification a été fixé à 0,05).

D'autre part, il était question de savoir quelles sont les propriétés des produits élaborés qui ont été les plus affectées par la substitution des extraits de la caroube afin de vérifier jusqu'à quel point la recette peut être modifiée sans décevoir les attentes du consommateur. Pour répondre à ces questions, tous les résultats des mesures effectuées dans le présent travail ont été évalués par traitement statistique (ACP). Cette analyse a été réalisée à l'aide du logiciel STATISTICA version 7.0.

L'analyse en composantes principales (ACP) est une technique de compression des données définies comme étant multi variées, qui permet de multiples traitements distingués dans le graphique par la présence de plusieurs variables. Ainsi, elle permet la distinction de plusieurs produits par différents descripteurs sensoriels (Drake, 2007). Un avantage majeur de cette analyse est que l'influence de certains attributs peut être mise en exergue, pouvant être pris comme indicateurs de choix par les dégustateurs (Chikhouné *et al.*, 2014).

Résultats et discussions

1. Rendement en jus extrait de la caroube

Le rendement moyen en jus extrait à partir des gousses vertes de la caroube, par simple pression manuelle, est de l'ordre de $37,54 \% \pm 1,00$. Ce rendement est inférieur à ceux obtenus par certains auteurs, notamment par Abi Azar (2007) qui est de 41 %. Cette différence pourrait s'expliquer par l'effet variétal, les conditions environnementales (le climat et la zone géographique) ainsi que la méthode d'extraction employée. En effet, Abi Azar (2007) a fait l'extraction du jus au niveau du laboratoire en utilisant un extracteur à jus électrique qu'est plus performant que la méthode manuelle.

En plus de la méthode d'extraction, la région géographique apparaît aussi comme un facteur influençant le rendement. La caroube utilisée dans la présente étude est de Béjaïa par contre celle utilisée par Abi Azar (2007) est du Liban.

2. Teneurs en composés phénoliques du jus et de l'extrait acétonique de la caroube verte

Les teneurs en composés phénoliques de l'extrait acétonique et du jus extrait des gousses vertes de la caroube sont résumées dans le tableau 04.

Tableau 04. Teneurs en composés polyphénoliques de l'extrait acétonique et du jus de la caroube.

	Polyphénols totaux (mg EAG)	Flavonoïdes (mgEQ)	Tanins condensés (mg EC)	Tanins hydrolysables (mg EAT)
Extrait acétonique (1g de poids sec ou lyophilisé)	242,62 ± 39,72	2,97±0,13	59,05±3,23	82,26±6,62
Jus (100ml de jus)	8548,77±134,70	62,38± 2,13	934,57±14,91	2122,21±149,47

2.1. Teneurs en polyphénols totaux (PT)

2.1.1. Teneurs en polyphénols totaux dans l'extrait acétonique

L'extrait acétonique présente une teneur en PT de l'ordre de $242,62 \pm 39,72$ mg EAG/g de poids sec (soit 24,262 g EAG /100 g de poudre lyophilisée). Cette teneur est supérieure à celles obtenues par Benchikh *et al.* (2016) et Joslyn *et al.* (1968) qui sont respectivement de

l'ordre de 19,82 g EAG /100 g et 204,3 mg EAG /g de matière sèche pour les gousses vertes. Des teneurs relativement variables ont été citées dans la littérature. Ouzounidou *et al.* (2012) ont cité des teneurs comprises entre 13,6 et 24,8 mg EAG/100 g dans la caroube verte des variétés Grecques. Sebai *et al.* (2013) ont trouvé une teneur de 28,07 mg EAG/kg dans la caroube verte Tunisienne.

Selon Benchikh *et al.* (2016), la différence des teneurs en PT observée dans les différentes études pourrait s'expliquer par la provenance géographique, la méthode d'extraction, le cultivar, la variété et surtout le degré de maturité des gousses. En effet plus les gousses vertes deviennent mûres, plus la teneur en composés phénoliques diminue. Cette diminution pourrait être expliquée par la conversion des composés phénoliques solubles en composés phénoliques insolubles. Ces derniers peuvent se lier facilement aux polysaccharides de la paroi cellulaire. Elle pourrait être aussi due, probablement, à l'oxydation de ces composés par les enzymes comme la polyphénoloxydase (PPO) (Benchikh *et al.*, 2016).

2.1.2. Teneurs en polyphénols totaux dans le jus

La teneur en PT obtenue dans le jus est de l'ordre de $8548,77 \pm 134,57$ mg EAG/100ml du jus (soit $8,548 \pm 0,134$ g EAG /100 ml du jus ou bien 85,48g EAG /L du jus). Ce résultat indique une teneur en PT très élevée par rapport à d'autres études, notamment celles de Joslyn *et al.*, (1968) et Abi Azar (2007) dont les teneurs en polyphénols totaux citées sont respectivement de 6,9 g EAG /L et 45,2g EAG /L du jus dans le cas des gousses fraîches.

De même, certaines opérations unitaires, comme le traitement thermique des gousses vertes, peuvent influencer la teneur en polyphénols de ce dernier. Dans ce même contexte, Abi Azar (2007) a obtenu une teneur en polyphénols totaux de 14,05g EAG /L dans le cas du jus extrait à partir des gousses vertes congelées et 9,58 g EAG /L dans le cas du jus extrait à partir des gousses vertes lyophilisées.

En plus des facteurs déjà cités (traitement thermique, cultivar, climat et maturité), Viuda-Martos *et al.* (2011) ont signalé l'impact des conditions de stockage et la méthode d'obtention du jus sur le contenu phénolique du jus.

2.2. Teneurs en flavonoïdes

2.2.1. Teneurs en flavonoïdes dans l'extrait acétonique

D'après les résultats enregistrés dans le tableau 4, on constate que l'extrait acétonique contient $2,97 \pm 0,13$ mg EQ/g de poudre lyophilisée de la caroube verte. Nos résultats sont similaires à ceux de Benchikh *et al.* (2016) qui ont trouvé des teneurs comprises entre 2,63 et 3,2 mg EQ/g de poudre lyophilisée, et inférieures à ceux de Sebai *et al.* (2013) qui ont rapporté une teneur de 6,14 mg QE / kg de poudre lyophilisée. Ces variations peuvent être aussi attribuées à certains facteurs comme le degré de maturité et/ou à la variété.

2.2.2. Teneurs en flavonoïdes dans le jus

Les flavonoïdes présents dans le jus frais de la caroube verte sont de l'ordre de $62,38 \pm 2,13$ mg EQ/100 ml du jus. Malheureusement, l'absence des études effectuées sur l'évaluation des teneurs en flavonoïdes dans le jus de la caroube verte, rend difficile la comparaison de nos résultats avec la littérature. A l'exception de Abi Azar (2007) qui a été le seul auteur à évaluer la teneur en PT seulement.

2.3. Teneurs en tanins condensés et hydrolysables

2.3.1. Teneurs en tanins condensés et hydrolysables dans l'extrait acétonique

Les teneurs en tanins condensés et hydrolysables de l'extrait acétonique (Tableau 04) sont respectivement de $59,05 \pm 3,23$ mg EC/g et $82,26 \pm 6,62$ mg EAT/ g de poudre de la caroube verte lyophilisée. Sur le plan quantitatif, les tanins hydrolysables extractibles sont plus importants que les tanins condensés extractibles.

Plusieurs travaux ont été focalisés sur le degré de polymérisation du tanin et en particulier sur la combinaison tanin-macromolécules. Parmi eux, les travaux d'Akroum (2006) qui ont porté sur la combinaison des tanins avec le gluten, l'amidon et le BSA, où il s'est avéré qu'en plus de la concentration du tanin qui a un effet significatif sur le taux de combinaison, la liaison "tanin-macromolécules" est fonction aussi de la structure et du degré de polymérisation du tanin.

Dans le même contexte de la structure et de la nature de la liaison des tanins impliquée dans la combinaison tanin-macromolécules, Lebouverllec (2005) a travaillé sur différents polysaccharides (cellulose, amidon, pectine...) et affirme que les tanins se combinent à ces derniers avec des liaisons non-covalentes. Riou *et al.* (2002) ont constaté que, en solution

modèle, les tanins condensés ont tendance à s'agréger au cours du temps pour se stabiliser avec une taille de particule augmentant avec la concentration et le degré de polymérisation.

2.3.2. Teneurs en tanins condensés et hydrolysables dans le jus

De même pour le jus de la caroube verte, les teneurs en tanins condensés et hydrolysables sont consignés dans le Tableau 04. Ces résultats montrent que le jus contient $934,57 \pm 14,91$ mg EC de tanins condensés et $2122,21 \pm 149,47$ mg EAT de tanins hydrolysables dans 100 ml du jus. Une tendance analogue est observée pour le jus où les tanins hydrolysables extractibles sont majoritaires par rapport aux tanins condensés extractibles.

Au vu des résultats obtenus, et à titre comparatif, les teneurs des tanins hydrolysables du jus ou de l'extrait acétonique sont plus élevées que les teneurs des tanins condensés dans les mêmes extraits. Selon Nishira et Joslyn (1968) et Joslyn *et al.* (1968), ce constat a été pratiquement similaire pour les gousses vertes où les tanins hydrolysables sont quantitativement plus importants que les tanins condensés. Mais, il s'avère que c'est l'inverse dans les gousses mûres. Nachtomí et Alumot (1963) ont identifié plusieurs composés phénoliques simples comme : leuco-anthocyanine, gallocatéchine, épicatechine, épicatechine gallate et catéchine dans les gousses vertes. Ces molécules sont considérées comme les précurseurs possibles des tanins condensés présents dans les gousses mûres.

Nous signalons que les gousses vertes de la caroube et leur jus ont fait l'objet de très peu d'études, à l'exception de quelques travaux qui ont été conduits dans le but de comparer la composition en polyphénols des gousses mûres et des gousses vertes de la caroube.

2.4. Activité antiradicalaire et pouvoir réducteur du fer ferrique de l'extrait acétonique et du jus de la caroube

L'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques est d'intérêt crucial, car c'est la qualité attribuée à ces composés (Ramful *et al.*, 2011). Au cours de cette étude, nous rappelons que la capacité antioxydante des extraits est évaluée par deux tests qui sont : le test de l'activité antiradicalaire, et la mesure du pouvoir réducteur du fer ferrique en fer ferreux.

2.4.1. Activité antiradicalaire (DPPH)

Les résultats du test l'activité antiradicalaire sont représentés dans la figure 28.

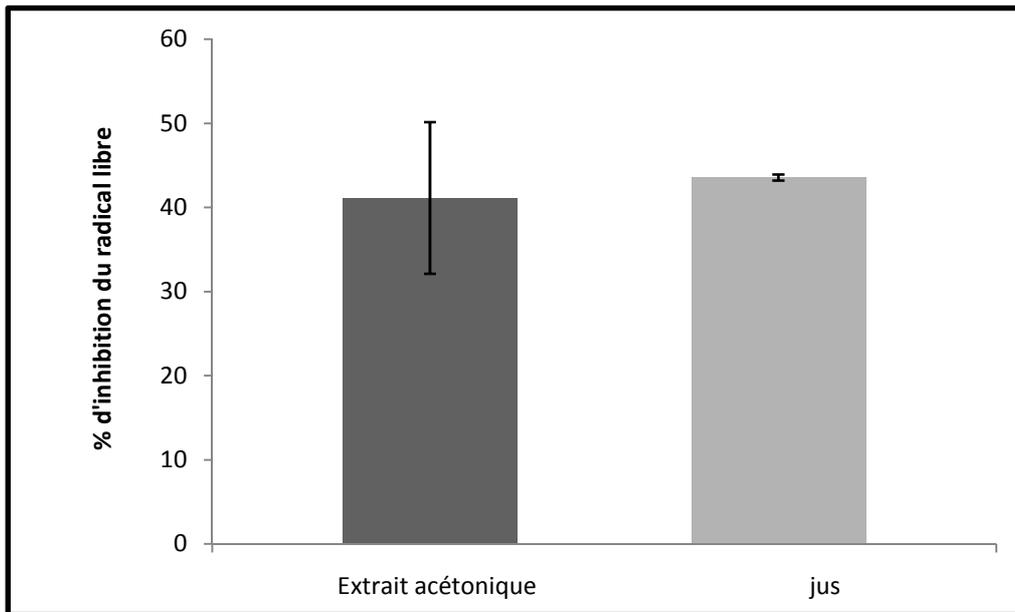


Figure 26. Activité antiradicalaire des composés polyphénoliques de l'extrait acétonique et du jus de la caroube.

A l'égard de la figure 26, nous constatons que l'extrait acétonique présente une activité antiradicalaire (exprimée en % d'inhibition du radical libre) de $41,00 \pm 9,00$ %, elle est relativement inférieure à celle de jus ($43,00 \pm 0,36$ %) ($p \leq 0,05$). Cette différence pourrait être due soit à la quantité en composés phénoliques qui est plus élevée dans le cas du jus, soit à la participation de composés phénoliques non extractibles dans l'extrait acétonique, soit à la contribution d'autres composés, doués d'activité antiradicalaire, présents dans le jus.

2.4.2. Pouvoir réducteur du fer ferrique en fer ferreux

Le pouvoir réducteur du fer peut servir comme un indicateur efficace du potentiel antioxydant des extraits de la caroube. Nous rappelons que ce test évalue la capacité des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}).

Au vu des résultats obtenus dans la présente étude, l'extrait acétonique et le jus ont montré un fort pouvoir de réduction du fer qui sont respectivement de $124,64 \pm 7,76$ mg EAA/g (soit 12,46 gEAA/100g), et de $7160,09 \pm 482,70$ mg EAA/100 ml du jus.

En se référant à la littérature, on trouve que la valeur obtenue dans le cas de l'extrait acétonique est faible par rapport à celle citée par Benchikh *et al.*, (2016) (22,73 g EAA/100g de poids sec).

3. pH, Extrait sec total et Brix du jus extrait des gousses vertes de la caroube

Les résultats obtenus du pH, de l'extrait sec total et du Brix du jus de la caroube sont mentionnés dans le tableau 05.

Tableau 05. pH, Taux d'extrait sec total et Brix du jus des gousses vertes de la

	pH	EST (%)	Brix (°Brix)
Jus de la caroube	5,39±0,01	25,56±0,81	29,93±0,93

Le pH du jus obtenu est en moyenne de 5,39±0,01. Ce résultat est légèrement supérieur à celui d'Abi Azar (2007). Cet auteur a obtenu un pH de 5,00 dans le cas du jus extrait avec un broyeur électrique et un pH de 5,30 dans le cas du jus extrait manuellement. Ce faible écart observé entre les valeurs du pH peut être dû à l'impact du procédé d'extraction du jus.

Concernant l'EST, la valeur obtenue est équivalente à 25,56±0,81. Elle est remarquablement supérieure aux valeurs citées par Abi Azar (2007) qui sont 14,79 % et 9,02% de matière sèche respectivement pour le jus extrait au laboratoire et le jus extrait manuellement. Cette différence pourrait s'expliquer par les effets de facteurs intrinsèque (variétal) et/ou extrinsèque (géographique, climatique, technique...). Selon la littérature, parmi les constituants importants de la matière sèche, on trouve les protéines dont les teneurs varient en fonction de la nature du sol (par rapport à sa composition en azote). Selon Avallone *et al.* (1997), les teneurs en protéines de la caroube varient de 1 à 7%.

La valeur moyenne du Brix obtenue dans la présente étude est 29,93±0,93 °Bx. Ce résultat se révèle important. Le Brix est la mesure de la concentration (%) d'un composé solide soluble en solution aqueuse. Plus sa valeur est élevée, plus il est concentré.

4. pH, Acidité, Taux d'extrait sec total, Taux de matière grasse du lait reconstitué

Le lait destiné à la fabrication du yaourt témoin et des coagulums élaborés a fait l'objet d'une analyse physicochimique. Les paramètres analysés sont : le pH, l'acidité Dornic, l'EST et la teneur en Matière Grasse. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 06.

Tableau 06. pH, Acidité, Taux d'extrait sec total, Taux de matière grasse du lait reconstitué

	pH	Acidité (°D)	Taux d'EST (%)	Taux de MG(%)
Lait reconstitué	6,88±0,01	15±0,00	22.38 ±0,45	1,63±0,15

La valeur moyenne du pH du lait utilisé dans la formulation du yaourt et des coagulums est de 6,88±0,01. Cette valeur indique que le lait utilisé est frais car son pH n'est pas acide.

De la même manière, l'acidité Dornic est considérée comme un indicateur du degré de fraîcheur du lait. Elle représente la quantité de l'acide lactique présent dans le lait. En effet, moins un lait est frais, plus il contient d'acide lactique (Ait Amer Meziane, 2008). Naturellement, le lactose contenu dans le lait se dégrade progressivement en acide lactique par les bactéries lactiques originelles du lait. Les échantillons du lait reconstitué analysés présentent une acidité Dornic de l'ordre de 15 °D, ce qui indique que ce lait destiné à la formulation des coagulums, est frais.

En effet, le lait normal à une acidité de titration comprise entre 14 et 18° D (Ould Moustapha *et al.*, 2012). Quand cette acidité est supérieure à 18 °D, cela peut conduire à l'instabilité du lait à la chaleur comme la pasteurisation et la stérilisation.

Quant à la matière grasse, les échantillons de lait pasteurisé analysés ont présenté des teneurs d'une moyenne de 1,63±0,15 % (Tableau 6). Cette teneur est conforme à la norme rapportée par le journal officielle de la république algérienne 1993 (1,45 à 1,93 %).

5. Elaboration d'un coagulum

5.1. Résultats préliminaires et choix de l'extrait de la caroube à incorporer

Nous rappelons que pour l'élaboration des coagulums, le lait reconstitué a été testé successivement avec les polyphénols purs de l'extrait polyphénolique puis avec le jus brut extrait des gousses vertes de la caroube. Les résultats préliminaires ont montré que l'ajout du jus entier au lait a provoqué la formation d'un précipité, par contre l'ajout de polyphénols de l'extrait acétonique, quel que soit le pourcentage d'incorporation, n'a entraîné aucun changement des propriétés structurales du lait (absence totale de coagulation). Pour cette raison, tous les coagulums ont été formulés avec le jus entier extrait des gousses vertes.

Suite à ce constat, nous suggérons que l'extrait polyphénolique manque d'efficacité par rapport au jus. Cela peut être due à la méthode d'extraction qui, en utilisant des solvants organiques d'une part et des températures élevées d'autre part, ne permet pas de récupérer tous les polyphénols ce qui a influé sur leurs propriétés actives, donc l'efficacité de ces molécules est moindre pour précipiter les protéines lactiques.

Malgré l'existence de travaux impliquant la forte combinaison des polyphénols de la caroube isolés avec les protéines lactiques, nous envisageons l'hypothèse d'existence d'autres constituants, isolés ou combinés, dotés d'activité coagulante dans le jus entier.

5.2. Incorporation du jus extrait des gousses vertes pour l'élaboration des coagulums

Nous rappelons que le jus extrait des gousses vertes est porté à ébullition pendant 10 min dont le but d'inactiver tout type d'enzyme qui peut être présent dans l'extrait et d'exclure l'hypothèse qu'il s'agisse d'une éventuelle réaction enzymatique qui entraîne la coagulation des protéines lactiques. L'étude de Abi Azar (2007) a montré qu'il n'y a aucun effet de l'ébullition de l'extrait sur les rendements en matière fraîche de coagulum et en protéines.

D'après Abi Azar (2007), la réaction de complexation des protéines lactiques par les polyphénols de la caroube est immédiate et quasi instantanée. En effet, les caséines présentent un bon substrat pour les polyphénols et en particulier la caséine β qui est très riche en résidus proline. En effet, les tanins ont une affinité plus élevée pour les protéines que pour les polysaccharides, car le groupe phénolique des tanins est un excellent donneur d'hydrogène capable de former de fortes liaisons avec l'oxygène des fonctions carboxyle et carbonyle des protéines (Desphande et Salunkhe, 1982).

Pour choisir le pourcentage du jus à incorporer et qui donne la meilleure précipitation des protéines lactiques dans le cas du yaourt, nous avons testé trois différents pourcentages : 5, 10 et 15 %. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 27 et 28.

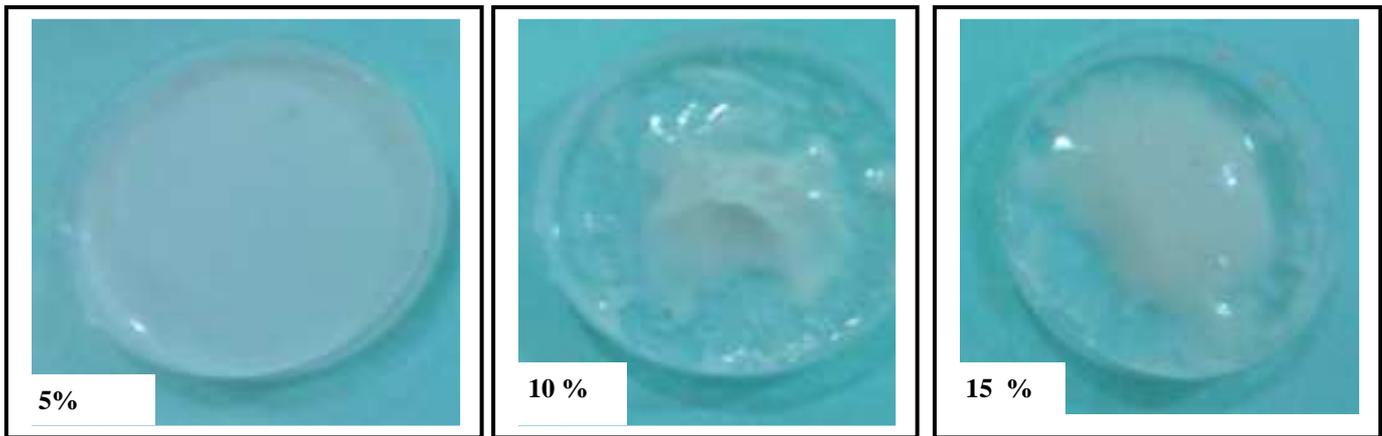


Figure 27. Photographie des résultats de précipitation du lait par l'ajout du jus de caroube à différents pourcentages



Figure 28. Photographie du Coagulum en pot (À base de 10% du jus de gousses vertes de caroube).

D'après ces résultats on constate que le pourcentage 10% du jus incorporé au lait a donné une meilleure précipitation des protéines laitières dont le coagulum est bien ferme, par contre le pourcentage 5% n'a donné aucune précipitation et le pourcentage 15% a donné un coagulum lâche.

La dose optimale (10%), qui a donné une bonne précipitation des protéines du lait, est inférieure à celle constatée par Abi Azar (2007) qui est de l'ordre de 30 % du jus de la caroube. Cette différence est probablement due à la différence des teneurs en composés phénoliques dans les deux jus utilisés en relation avec la méthode d'extraction du jus et du cultivar.

La dose de 15 % du jus incorporée au lait a permis d'obtenir une complexation des protéines mais le précipité formé n'est pas ferme, cela peut être expliquée par le pourcentage élevé des polyphénols par rapport à la concentration des protéines du lait. En effet, en présence

d'un excès de polyphénols, tous les sites des liaisons protéiques sont occupés. Par conséquent, la complexation est faible, car les polyphénols n'ont pas accès à d'autres sites de liaison libres pour se complexer. Ceci conduit à des agrégats de petite taille et ainsi à un coagulum moins ferme et aqueux (Abi Azar, 2007). Selon Siebert *et al.* (1996), la formation d'un précipité dépend des concentrations des polyphénols et des protéines dans la solution ainsi que du rapport polyphénols/protéines.

Dans le même axe d'étude, Abi Azar (2007) justifie l'utilisation unique de l'extrait de gousses vertes pour la coagulation des protéines lactiques par l'abondance des tanins hydrolysables dans ce dernier. Selon ce même auteur, 92% des protéines engagées dans la réaction sont précipitées et le jus agit sur le lait en privilégiant d'abord l'action sur la caséine β , ce qui doit entraîner la coagulation de l'ensemble des protéines par déstructuration des micelles, puis en précipitant les protéines sériques. L'étude effectuée par Jobstl *et al.* (2004) montre aussi qu'en formant des complexes avec les polyphénols, la molécule protéique étudiée (caséine β) adopte une conformation compacte différente de la structure originelle flexible et déroulée.

Par rapport au type de liaison impliquée, Abi Azar (2007) indique que la complexation des protéines lactiques par les polyphénols de la caroube verte est une interaction hydrophobe entre les protéines et les polyphénols et que les sites hydrophobes des protéines lactiques sont accessibles quelque soit la température, donc la réaction est indépendante de la température contrairement à la présure et les ferments qui agissent à des températures optimales bien déterminées.

5.3. Effet conjugué ferments-jus de caroube

Pour étudier l'effet conjugué ferment-jus de caroube, un deuxième type de produit a été élaboré en ajoutant le jus de caroube (avec une dose de 10 %) au lait après avoir ajouté 0,02% de ferments lactiques type YC-X16 et YF-L705.

Dans les premiers temps, seul l'extrait de caroube semble agir et les ferments lactiques n'ont montré aucun effet remarquable. Mais après l'étape d'incubation à la température 42 °C, la réaction de coagulation prend le chemin inverse, l'action des ferments lactiques prend part sur la réaction des polyphénols.

Dans le produit obtenu, on remarque la séparation de deux phases : le jus de la caroube complexé avec quelques protéines du lait dans la phase inférieure du pot, et le reste du lait fermenté par les ferments ajoutés dans la phase supérieure. Ce résultat est expliqué par le fait que les polyphénols de la caroube n'ont pas d'effet sur les ferments lactiques (ne sont pas des inhibiteurs de ces ferments) contrairement à la présure qui est inhibée par les polyphénols de la caroube, du fait que les polyphénols agissent sur le même substrat que sont les protéines lactiques (Abi Azar, 2007). Les polyphénols de la caroube n'inhibent pas l'action coagulante des ferments lactiques. Les coagulums obtenus par action des ferments ou de l'extrait de caroube ont une organisation du réseau coagulum différente : celle des ferments donne un coagulum lisse alors que celle du jus donne une texture granuleuse du coagulum.

Ces coagulums ont été comparés au témoin : le yaourt étuvé de RAMDY fabriqué selon le diagramme de fabrication mentionné précédemment à base de ferments lactiques de type YC-X16 et YF-L705.

6. Caractérisation physicochimique des produits élaborés

6.1. pH

Le pH est un facteur crucial et critique dans la technologie de fabrication du yaourt et joue un rôle important dans les propriétés sensorielles du produit fini. La figure 29 présente les valeurs du pH des trois coagulums élaborés.

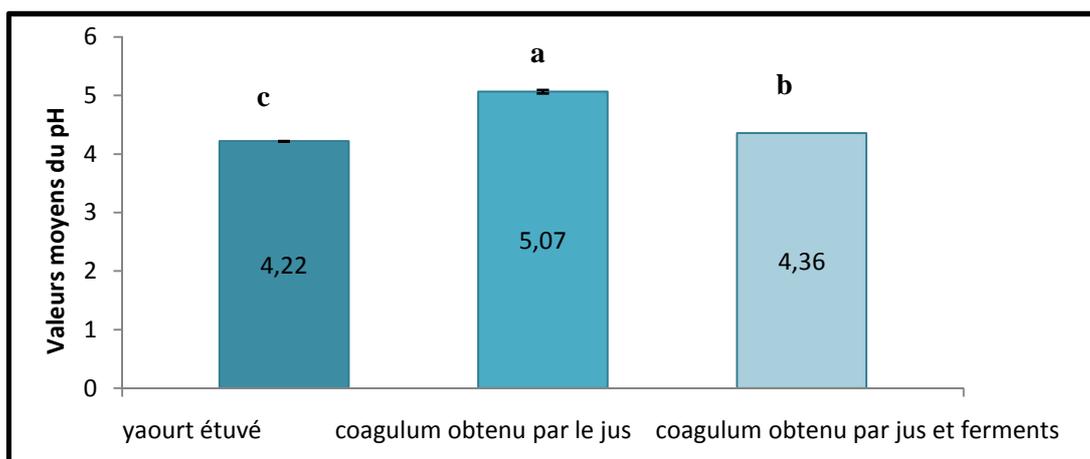


Figure 29. Valeurs moyennes du pH des produits élaborés.

Le témoin (yaourt étuvé) et le coagulum élaboré avec le jus de caroube et les ferments lactiques présentent des valeurs de pH très proches : 4,22 pour le premier type et 4,36 pour le deuxième ($\rho \leq 0,05$). Ces valeurs concordent avec les normes internes de l'entreprise. Le coagulum élaboré à base du jus de caroube présente un pH de 5,07. Ce pH est un peu élevé par rapport aux deux autres produits. Cette différence peut être expliquée par l'activité des ferments lactiques sur le lactose du lait engendrant la production de l'acide lactique et de ce fait l'abaissement du pH du produit.

6.2. Extrait Sec Total

Les résultats de l'EST des produits élaborés sont représentés dans la figure 30.

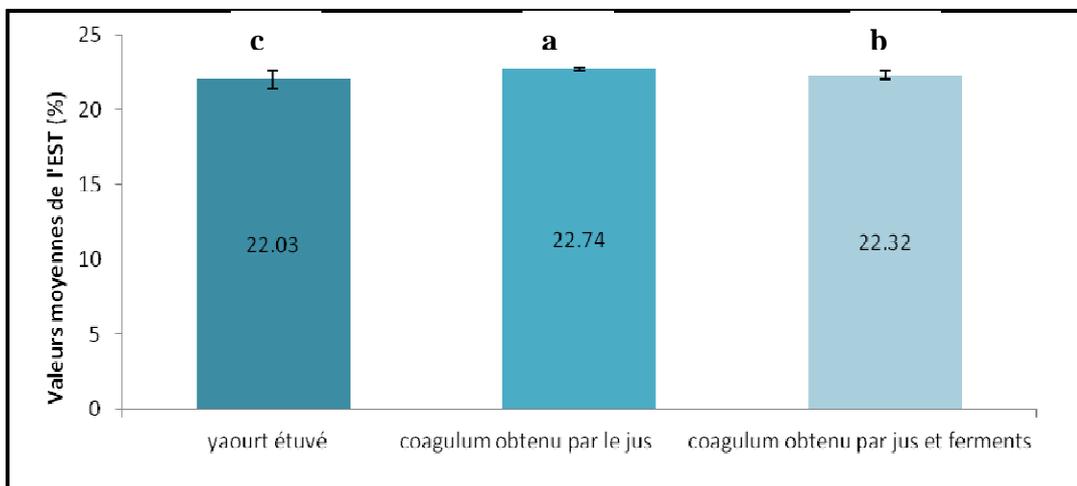


Figure 30. Valeurs moyennes de l'Extrait Sec Total des produits élaborés.

Ces résultats présentent une conformité avec les normes de l'EST du yaourt déclarées par la laiterie RAMDY. Néanmoins, une très faible différence de teneur en matière sèche est observée dans le cas du coagulum élaboré avec le jus de caroube qui a présenté une teneur moyenne de 22,74, ce qui est due probablement à une quantité de matière sèche apportée par l'extrait de caroube, mais qui reste faible par rapport au témoin et le produit élaboré par la combinaison du jus et ferments présentant respectivement 22,03 et 22,32 % ($\rho \leq 0,05$).

6.3. Acidité

Les moyennes de l'acidité titrable mesurée sur les produits élaborés sont résumées dans la figure 31.

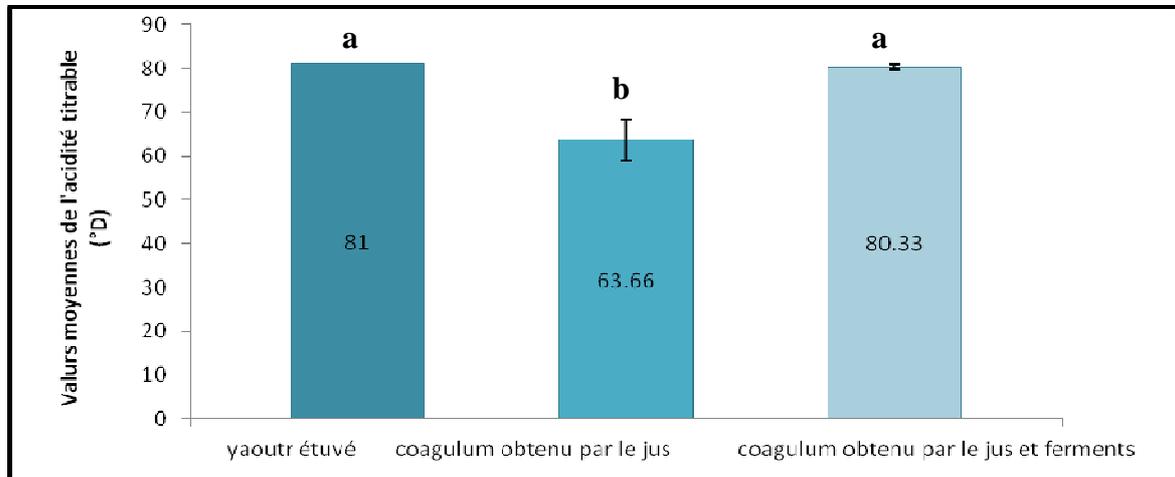


Figure 31. Valeurs moyennes de l'acidité titrable des produits élaborés.

Les résultats correspondants à l'acidité titrable des trois produits élaborés sont donnés dans la figure 32.

Le témoin et le coagulum élaboré avec les ferments lactiques et le jus de caroube à la fois ont presque la même acidité qui en moyenne de $81 \pm 0,00$ °D pour le premier et $80,33 \pm 0,57$ °D pour le deuxième et sont plus élevées par rapport coagulum élaboré avec le jus de la caroube seul, à présenté une acidité de $63,66 \pm 4,72$ °D ($p \leq 0,05$). Ces valeurs sont en accord avec les normes internes de l'entreprise. Cette différence peut être expliquée par le fait que les trois produits ne contiennent pas la même quantité d'acide lactique. En effet, la quantité d'acide lactique totale évaluée est probablement celle existante dans le lait de départ, à laquelle vient s'ajouter l'acidité développée par l'action des ferments lactiques qui transforment le lactose du lait en acide lactique dans les deux produits renferment les ferments lactiques.

L'acidité Dornic dans ces derniers types est la résultante de l'acidité naturelle du lait à laquelle vient s'ajouter l'acidité développée par les ferments lactiques, alors que l'acidité titrable du coagulum du jus de la caroube est représentée par l'acidité naturelle du lait.

6.4. Matière grasse

Le yaourt témoin est le seul produit qui a adonné un résultat de la teneur en matière grasse qui est en moyenne de $(1,95 \pm 0,07)$ %. Cette valeur est conforme aux normes en vigueur interne de l'entreprise RAMDY et ceux du codex (2003) qui exige une valeur inférieure à 15%.

Concernant les produits renfermant le jus de la caroube, la détermination de la teneur de la matière grasse, n'a pas été possible. On a observé que le mélange a noircit lors de la centrifugation.

La teneur en matière grasse des produits renfermant le jus de caroube revient peut être à la teneur du lait du départ en matière grasse, car la littérature indique que la caroube contient de très faibles teneurs en matière grasse (0,24 à 4,44%) (Benchikh *et al.*, 2016).

7. Analyses microbiologiques des produits élaborés

Les résultats des analyses microbiologiques des trois produits élaborés sont donnés dans le tableau 7.

Tableau 07. Résultats des analyses microbiologies des produits élaborés.

	Témoin	Coagulum à base du jus	Coagulum à base du jus et ferments
Coliformes totaux	Absence	Absence	Absence
Coliformes fécaux	Absence	Absence	Absence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Absence	Absence	Absence
Salmonelles	Absence	Absence	Absence
Levures moisissures	Absence	Absence	Absence

Selon les résultats consignés dans le tableau 07, tous les produits élaborés présentent une bonne qualité microbiologique. Il y a absence totale de germes dans les trois produits. Ces résultats sont conformes aux normes du journal officiel de la république algérienne n°35 du 27 mai 1998.

L'absence totale de germes dans les trois produits est due à l'application et à l'efficacité des traitements thermiques effectués sur les matières premières, ainsi que le respect de règles et des conditions d'hygiène lors d'élaboration des ces produits.

8. Etude de la variabilité des produits élaborés

8.1. Structuration des variables

Les résultats de l'ACP (Analyse en Composantes Principales) des 03 types des coagulums élaborés sont présentés dans la figure 32. Le nombre d'axes choisis est de deux, vu que 46,97% de l'information totale a été fournie par ces deux axes. Les axes 1 et 2 représentent la disposition des différents attributs sensoriels étudiés (variables sensorielles au nombre de 09) caractérisés par l'analyse sensorielle des trois types de coagulums sur le cercle unité.

La première composante principale, représentée par l'axe1, a apporté 32,34 % de l'information totale. Elle a fait ressortir deux groupes importants : le groupe 1 est représenté par les variables : brillance (B), arôme (Ar) et couleur (C) contribuant positivement à l'axe1 ; le groupe 2 est représenté par les variables : astringence (As) et granulométrie (Gr) contribuant négativement au même axe. Ces deux groupes s'opposent l'un à l'autre.

La tendance de regroupement des variables B, Ar et C indiquent que ces paramètres agissent comme descripteurs sensoriels pertinents pour le dégustateur : il s'agit du toucher.

Du côté opposé du même axe, on remarque que les variables, formant le deuxième groupe : As et Gr, sont corrélés positivement entre elles, mais négativement avec le groupe précédent. Ceci peut probablement s'expliquer par le fait que l'astringence et le caractère granuleux sont perçus par le goût, ce qui est contraire à la sensation du toucher qui caractérise la tendance du groupe (B, Ar et C).

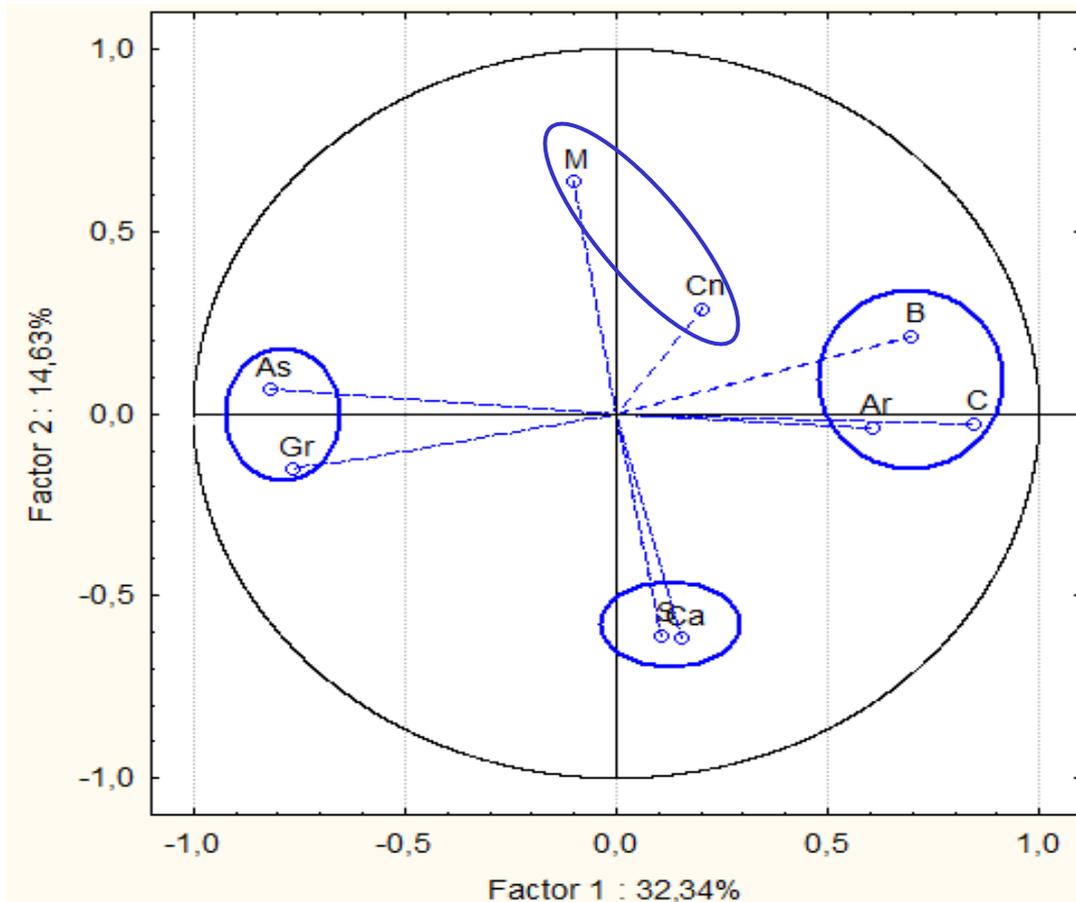


Figure 32. Répartition des variables dans le plan 1/ 2 (cercle des variables).

La deuxième composante principale, représentée par l'axe2, a apporté 14,63% de l'information totale. Elle décrit positivement les variables : aspect moussant (M) et paramètre consistance (Cn), et négativement deux variables : aspect cassant (C) et saveur sucrée (S) des coagulums élaborés.

Ces deux groupes s'opposent l'un à l'autre. Cette tendance prête quelque peu à confusion, car le sucré est sensé se mettre avec le groupe représentant le goût (As, Gr) et le cassant (Ca) avec le groupe du toucher (B, Ar et C). Ceci nous indique également que la perception de certains attributs sensoriels par les dégustateurs n'obéit pas forcément à leur prédiction.

8.2. Structuration des coagulums

La figure 33 représente la distribution des observations (nuage de points) correspondant aux coagulums élaborés. Nous rappelons que les trois coagulums sont codés par A (yaourt témoin élaboré avec les ferments lactiques), B (Coagulum élaboré avec un mélange de ferments

lactiques et du jus de caroube) et C (Coagulum élaboré seulement avec le jus de caroube). On remarque une condensation importante des points appartenant aux trois types de coagulum au niveau du centre du cercle, ce qui rend difficile la caractérisation de ces points. Donc il est difficile de donner une tendance propre de chaque coagulum en fonction des variables étudiées. D'après (Moskowitz and Krieger, 1995), les aliments présentent des matrices alimentaires complexes et il est très difficile d'isoler l'effet d'un attribut sensoriel, sans le relier aux autres effets provenant des autres attributs sensoriels. Le goût, la flaveur, la texture et l'apparence constituent les descripteurs sensoriels primordiaux à tenir en compte lors d'une analyse sensorielle.

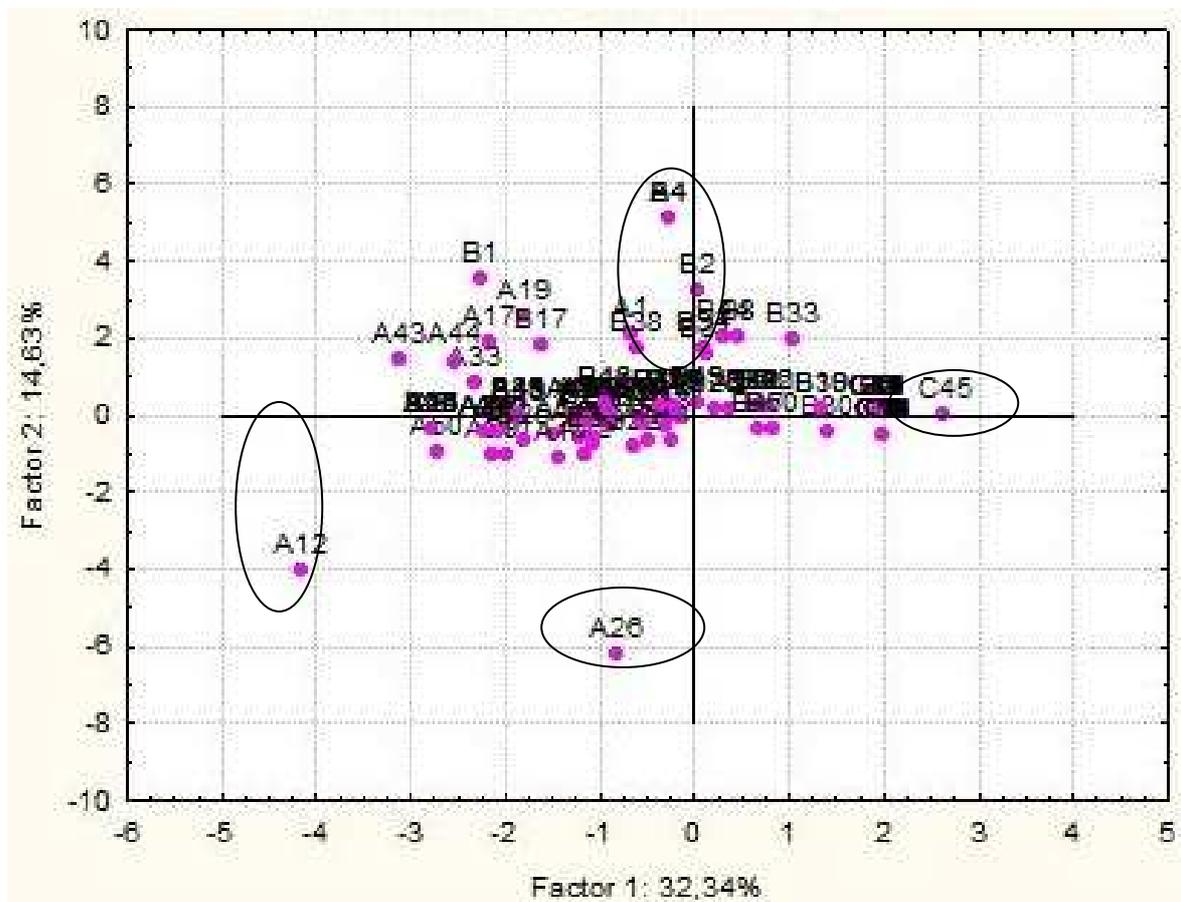


Figure 33. Répartition de nuages de points dans le plan 1/ 2 (cercle des individus).

Conclusion générale

Nous rappelons que l'objectif du présent travail est la caractérisation phénolique de deux extraits de caroube verte (extrait polyphénolique et jus entier extrait des gousses fraîches) et l'étude de la possibilité d'incorporation de ces deux extraits dans la formulation d'un yaourt type étuvé et leurs effets sur la précipitation des protéines laitières.

Les principaux résultats obtenus ont montré que ces deux extraits sont riches en composés phénoliques, en particulier en polyphénols totaux ($242,62 \pm 39,72$ mg EAG/g de poids sec de caroube et $8548,77 \pm 134,57$ mg EAG/100 ml du jus frais) et qu'ils sont dotés d'une forte activité antioxydante. Ces résultats font de l'extrait de caroube verte un agent antioxydant exceptionnel très riche en polyphénols.

L'effet de ces deux extraits, sur la précipitation des protéines laitières, a été testé par l'élaboration de coagulum. Le test de coagulation a révélé que la précipitation des protéines n'a abouti qu'avec le jus. De ce fait, ce dernier peut être utilisé en tant qu'agent de la coagulation du lait. Pour s'assurer qu'aucune activité enzymatique dans l'extrait n'était responsable de la coagulation du lait, un test d'ébullition a été réalisé. Cette propriété pourrait être due probablement à la richesse du jus en tanins condensés et hydrolysables à la fois.

Différents essais concernant l'élaboration des coagulums à base du jus de caroube verte ont été réalisés. Trois coagulums ont été élaborés avec des concentrations de 5%, 10 % et 15%. Les résultats obtenus ont montré que la dose optimale du jus qui a donné une bonne coagulation du lait est de 10 %. Cette dose nous a permis d'avoir un coagulum ferme avec une légère synérèse du lactosérum. Les polyphénols de caroube verte ont montré la particularité de complexer les protéines laitières.

L'étude de l'effet de la combinaison du jus de caroube verte et des ferments lactiques sur la coagulation du lait a montré l'absence d'effet inhibiteur des polyphénols sur les ferments lactiques. Au début de la réaction, les polyphénols ont une tendance à précipiter les protéines mais par la suite et au cours de l'incubation du produit, les ferments lactiques ont montré une affinité plus élevée aux protéines qu'aux polyphénols. En effet, le produit obtenu par cette combinaison a possédé les mêmes caractéristiques physicochimique et microbiologique que le yaourt témoin étuvé de RAMDY. Ces caractéristiques s'avèrent conformes aux normes internes de l'entreprise.

La caractérisation physicochimique du coagulum obtenu par le jus de caroube à une concentration de 10 % a révélé que le coagulum obtenu a présenté un pH de 5,07. Cette valeur indique que ce nouveau produit est moins acide par rapport au témoin (yaourt étuvé de RAMDY) et le coagulum élaboré avec la combinaison de ferments et du jus. Les résultats de

l'acidité titrable ont confirmé cet aspect, le coagulum a présenté une valeur de 63,66 °D, par comparaison au yaourt témoin et au produit élaboré avec la combinaison de ferments et du jus qui ont donné 81 et 80,33 °D respectivement.

Par rapport à l'extrait sec, le jus de caroube a contribué avec une faible quantité ce qui a été observé au niveau de teneur en EST dans le coagulum élaboré (EST = 22,74 %). Pour la teneur en matière grasse du coagulum élaboré, elle est représentée par la matière grasse apportée par le lait du départ.

A l'échelle microbiologique et d'après les résultats obtenus le produit élaboré a montré une bonne qualité microbiologique.

Enfin, une analyse sensorielle *via* un test hédonique de dégustation, a été réalisée et a permis d'étudier l'acceptabilité et l'appréciation des dégustateurs envers les yaourts produits. L'analyse sensorielle a révélé des aspects relativement intéressants que l'ACP a clairement démontrés, notamment la corrélation de certains paramètres par rapport. Une corrélation négative est obtenue entre le premier groupe (brillance, couleur et arôme) et le deuxième (astringence et granuleux). Les paramètres du premier groupe sont perçus par le toucher par contre ceux du deuxième groupe sont perçus par le goût. Une appréciation de la majorité des dégustateurs a été apporté pour le produit élaboré avec le jus de caroube verte où il s'est avéré un peu plus sucré par rapport au témoin et moins acide.

A partir de la présente étude, quelques perspectives sont à envisager :

- La mise en évidence de la nature des interactions impliquées dans la précipitation des protéines lactiques par les polyphénols de la caroube, ainsi que les types de polyphénols engagés dans la réaction,
- L'approfondissement de cette étude par l'application d'autres tests tels que l'analyse des complexes (protéine-polyphénol) par chromatographie liquide haute performance et spectrométrie de masse,
- L'élaboration d'autres produits laitiers fermentés dont la coagulation sera réalisée à base du jus de caroube ;
- L'élargissement de la gamme d'utilisation des polyphénols de caroube verte dans d'autres formulations alimentaires en industrie agro-alimentaire.

Références bibliographiques

Abi Azar R. (2007). *Milk protein complexation by green carob pods extract. Technological properties of obtained coagulums*. Thèse de doctorat : AgroParisTech, 197 p.

Ait Amer Meziane L. (2008). Aptitude des laits de chèvre et de brebis à la coagulation par des protéases d'origine avicole. Institut national agronomique El-Harrach (Algérie). 116p.

Ait Chitt M., Belmir M. et Lazrak A., (2007). Production des plantes sélectionnées et greffées du caroubier. *Transfert de technologie en Agriculture*, 153 : 1-4.

Aliakbarian B., Casale M., Paini M., Alessandro Alberto Casazza A.A., Lanteri S. et Perego P. (2014). Production of a novel fermented milk fortified with natural antioxidants and its analysis by NIR spectroscopy, *Food Science and Technology*, 62: 376-383.

Arts M.J., Haenen G.R., Wilms L.C., Beetstra S.A., Heijnen C.G., Voss H.P. et Bast A. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5) : 1184-1187.

Atta-ur-Rahman. (2003). Studies in natural products chemistry, volume 28, Bioactive natural products (Part I). *Edition Elsevier Science B. V.* p 652.

Avallone R., Plessi M., Baraldi M. et Monzani A. (1997). Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua* L.): protein, fat, carbohydrates and tannins. *Journal of Food Composition Anal.*, 10 :166-172.

Ayaz F.K., Torun H., Ayaz S., Correia P. J., Alaiz M., Sanz C., Grúz J. et Strnad M. (2007). Determination of chemical composition of Anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *Journal of Food Quality*, 30, 1040-1055.

Ba K., Tine E., Destain J., Cissé N., Thonart P. (2010). Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14, 131-139.

- Bacon J. et Rhodes M. J. C. (2000). Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 838-843.
- Battle I. et Tous J. (1997). Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. *Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute*, Rome, Italy, 1-79.
- Ben Hsouna A., Trigui M. et Ben Mansour R. (2011). Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiologie*, 148:66–72
- Ben Hsouna A., Trigui M. et Jaoua S. (1986). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of the ethyl acetate extract of endemic *Ceratonia siliqua* L. leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, 34: 827-829.
- Benchikh Y. (2015). Étude de l'effet du stade de maturité sur les caractéristiques physico-chimiques, les propriétés antioxydantes et les profils phénoliques de trois variétés de *Ceratonia siliqua* L. Thèse de doctorat : Université abderrahmane mira-Bejaia. 137p.
- Benchikh Y. et Louaileche H. (2014). Effects of extraction conditions on the recovery of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp. *Acta Botanica Gallica: Botany Letters*, 161(2), 175- 181.
- Benchikh Y., Paris C., Louaileche H., Charbonne C., Ghoul M., Chebil L. (2016). Comparative characterization of green and ripe carob (*Ceratonia siliqua* L.): physicochemical attributes and phenolic profile. *SDRP Journal of Food Science and Technology*.1 :7.
- Benmahioul B., Kaïd-Harche M. et Daguin F. (2011). Le caroubier, une espèce méditerranéenne à usages multiples. *Forêt méditerranéenne*, 8p.

- Berrougui H. (2007). Le caroubier (*Ceratonia siliqua L.*), une richesse nationale aux vertus médicinales. *Maghreb Canada Express* 5, n°9
- Bohin M. C., Vincken J.-P., van der Hijden H. T. et Gruppen H. (2012). Efficacy of food proteins as carriers for flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (16), 4136-4143.
- Boizot N. et Charpentier J-P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier Technique, INRA*. pp. 79-82.
- Bonnaillie C., Salacs M., Vassiliova E. et Saykova I. (2012). Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea L.*). *Revue de génie industriel*, 7, 35-45.
- Bottazzi V., Battistotti B. et Montescani G. (1973). Influence des souches seules et associées de *L. bulgaricus* et *Str. thermophilus* ainsi que des traitements du lait sur la production d'aldéhyde acétique dans le yaourt, *Istituto di Microbiologia Lattiero-casearia, Università' Cattolica dei Sacra Cuore, Piacenza, Italie*. 13 : 525-526.
- Boudier J. F et Luquet, F. M. (1990). Produits frais. In laits et produits laitiers. Vache- brebis- chèvre. *Techniques et documentation, Lavoisier, Paris*, 35-66.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. et Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30.
- Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11): 317-333.
- Brown P.J. et Wright W.B. (1963). An Investigation of the interactions between milk proteins and tea polyphenols. *Journal of Chromatography A.*, 11: 504-514.
- Calixto F.S. et Canellas J. (1982). Components of nutritional interest in carob pods *Ceratonia siliqua*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 33, 1319–1323.

- Champeau A. (2011). La texture des produits pâtisseries : entre mesure rhéologique et analyse sensorielle. Mémoire M2 ILTS Option TS. Paris 7. 45p.
- Chandan R.C. et O'Rell K.R. (2006). Ingredients for yoghurt manufacture and Principles of yoghurt processing, In Manufacturing yoghurt and fermented milk. *Blackwell Publishing, Iowa, USA*. p.179-210.
- Charlton A.J., Baxter N.J., Khan M.L., Moir A.J.G., Haslam E., Davies A.P. et Williamson M.P. (2002). Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1593-1601.
- Chen C.C. (2010). Casein complexes. U.S. Patent 2010/0099607 A1.
- Chikhoun A., Bedjou F., Oubouzi S., Boukefoussa R., Bechri B., Tarmoul H., Abdeladim T., Tounsi A., Hamitri M., Chikh S. et Kouadri L. (2014). Development of Sugar Cane Molasses in Formulations of Madeleines, Mini Croissants, and Buns Incorporated with Interesterified Oil. *Journal of Chemistry*, 8.
- Chira K., Suh J.H., Saucier C. et Teissède P.L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6: 75–82.
- CODEX STAN 243-2003. Norme codex pour les laits fermentés.
- Crozier A. (2003). Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview. In *Plants" Diet and Health"*. Ed. *Goldberg*. pp: 27- 48.
- Crozier I.B. (2009). Jaganath, M.N. Clifford, *Natural Product Reports*. 26 1001.
- Custódio L., Escapa A.L., Fernandes E., Fajardo A., Rosa A., Albericio F., Neng N., Nogueira J.M.F. et Romano A. (2011). Phytochemical profile antioxidant cytotoxic activities of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) germ flour extracts, *Plant Foods Human Nutrition*. 66: 78–84.
- De Candolle A. (1983). *L'origine des plantes cultivées*. Balière, Paris, France.

Desphande S.S. et Salunkhe D.K. (1982). Interaction of tannic acid and catechin with legume starches. *Journal of Food Science*, 47, 2080-2081.

Dhaouadi K., Belkhir M., Akinocho I., Raboudi F., Pamies D., Barrajon E., Estevan C., Fattouch S. (2014). Sucrose supplementation during traditional carob syrup processing affected its chemical characteristics and biological activities. *Food Science and Technology*. 57:1-8.

Dickinson M. E. et Mann, A. B. (2006). Nanomechanics and morphology of salivary pellicle RID A-3992-2012.J.Mater.Res.21:1996-2002.

Doha Mohamed A., Hamed Ibrahim M. et Al-Okbi Sahar Y. (2008). *Ceratonia siliqua* Pods as a Cheap Source of Functional Food Components. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, Vol. 104, N ° 1, pp. 25-29.

Dupas C. (2009). Influence des protéines laitières sur le pouvoir antioxydant et la biodisponibilité des polyphénols du café. Thèse de doctorat : Ecole doctorale ABIÉS, 262p.

El-Sherif G., El-sherif M. A. et Tolba K. H. (2011). Extraction and identification of natural antioxidants from liquorices (*Glycyrrhiza glabra*) and carob (*Ceratonia siliqua*) and its application in El-Mewled El-Nabawy sweets (*Sesames* and *Folia*). *Nature and Science*. 9 (11): 108-115.

FAO (2012). Food and agriculture organization of the United Nations. Available from: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/F> (data accessed: February 11, 2015).

Frazier R.A., Deaville E.R., Green R.J., Stringano E., Willoughby I., Plant J. et Mueller-Harvey I. (2010). Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51(2), 490-495.

Gabriela Bernardo-Gila M., Roque R., Roseiro L. B., Duarte L. C., Girio F. et Esteves P. (2011). Supercritical extraction of carob kibbles (*Ceratonia siliqua L.*), *Journal of Supercritical Fluid*, 59: 36– 42.

Georgé S., Brat P., Alter P. et Amiot M.J. (2005). Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1370-1373.

Gruendel S., Garcia AL. et Otto B. (2006). Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fiber and polyphenols enhances lipid oxidation and lowers postprandial acylated ghrelin in humans.1. *Journal of Nutrition*, 136:1533–8

Guiraud J.P. (2003). *Microbiologie alimentaire*. Ed. Paris: Dunod. 653p.

Hadbaoui Z. (2012). Evaluation de l'activité antioxydante des fractions lipidiques, protéiques et phénoliques de sorgho et de mil locaux. Thèse de Doctorat : Université de Kasdi Merbah Ouargla-Algérie.

Haddarah A. (2013). L'influence des cultivars sur les propriétés fonctionnelles de la caroube Libanaise. Thèse de doctorat : L'Université Libanaise (Ecole Doctorale des Sciences et Technologie) Et l'Université de Lorraine (France). 132 p.

Hagerman A.E. et Butler L.G., (1989). Choosing Appropriate Methods and Standards for Assaying Tannin. *Journal of Chemical Ecology*. 15(6):179-1810.

Hagerman A.E. et Robbins C.T. (1987). Implications of soluble tannin-protein complexes for tannin analysis and plant defense mechanisms. *Journal of Chemical Ecology*. 13:1243-1259.

Halal M.F., et Nayra S.M. (2011). Use of natural plant antioxidant and probiotic in the production of novel yogurt. *Journal of Evolutionary Biology Research*. 3(2): 12-18.

Han J., Britten M., St-Gelais D., Champagne C.P., Fustier P., Salmieri S., et Lacroix, M. (2011). Polyphenolic compounds as functional ingredients in cheese. *Food chemistry*, 124(4), 1589-1594.

Haslam E. (1998). Practical polyphenols: from structure to molecular recognition and physiological action, Thèse de Doctorat : Cambridge University Press, 420p.

Haslam E. et Lilley T. H. (1988). Natural astringency in foodstuffs - A molecular interpretation. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*. 27(1): 1-40.

Haslam E., Lilley T. H., Warminski E., Lio H., Cai Y., Martin R., Gaffney S. H., Goulding P. N. et Luck G. (1992). Polyphenol complexation, a study in molecular recognition. In *Phenolic compounds in foods and their effect on health, I: Analysis, occurrence and chemistry*. Eds. Washington, U.S.A.: ACS Symposium Series, 8-49.

Hasni I., Bourassa P., Hamdani S., Samson G., Carpentier R. et Tajmir-Riahi H.A. (2011). Interaction of milk -and β -caseins with tea polyphenols. *Food Chemistry*, 126 : 630- 639.

Heenan P. S., Dufour J-P., Hamid N., Harvey W. et Delahunty C. M. (2010). The influence of ingredients and time from baking on sensory quality and consumer freshness perceptions in a baked model cake system LWT - *Food Science and Technology*, (43) : 1032–1041.

Heimler D., Vignolini P., Giulia Dini M., Francesco Vincieri F. et Rmani A. (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local *Brassicaceae* edible varieties. *Food Chemistry* , 99 : 464-469.

Howard A.N., Nigdikar S. V., Rajput-Williams J., et Williams N. R. (2000). Food supplements. *United States Patent*, 6086910.

Imhof R. Glattli H. et Bosset J.O. (1994). Volatil organic aroma compounds produced by thermophilic and mesophilic mixed strain dairy starter cultures. *Lebensmittel Wissenschaft and technologie*, 27:442-449.

Jobstl E., O'Connell J., Fairclough J.P.A. et Williamson M.P. (2004). Astringency- A molecular model for polyphenol / protein binding, *Fibre Diffraction Revue*. 12: 66-69.

Jobstl E., Howse J.R., Fairclough J.P.A. et Williamson M.P. (2006). Noncovalent cross-linking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:4077-4081.

Joslyn M. A., Nishira H. et Ito S. (1968). Leucoanthocyanins and related phenolic compounds of carob pods (*Ceratonia siliqua*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 19 : 543-550.

Journal Officiel de la république Algérienne. (1993). Arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation, N° JORA : 69 du 27-10-1993.

Journal Officiel de la république Algérienne. (1998). Arrêté interministériel du 01 Safar 1419 correspondant au 27 mai 1998 relatif aux critères microbiologiques relatifs à certaines denrées alimentaires, N° JORA : 35 du 27-05--1998.

Journal Officiel de la république Algérienne. (2005). Arrêté interministériel du 8 Joumada El Oula 1426 correspondant au 15 juin 2005 relatif méthode de recherche des salmonella dans le lait et les produits laitiers, N° JORA : 42 du 15-06-2005.

Kaderi M., Ben Hamouda G., Zaeir H., Hanana M. et Hamrouni L. (2014). Notes ethnobotanique et phytopharmacologique sur *Ceratonia siliqua* (L.). *Phytothérapie*, p5.

Kanakis C.D., Hasni I., Bourassa P., Tarantilis P.A., Polissiou M.G. et Tajmir-Riahi H.A. (2011). Milk β -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry*, 127:1046-1055.

Karaaslan M., Ozden M., Vardin H. et Turkoglu H. (2011). Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. *LWT and Food Science and Technology*, 44: 1065-1072.

Klenow S., Jahns F., Pool-Zobel B.L. et Gleis M. (2009). Does an extract of carob (*Ceratonia siliqua* L.) have chemopreventive potential related to oxydative stress and drug metabolism in human colon cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 2999- 3004.

- Kumazawa S., Taniguchi M., Suzuki Y., Shimura M., Kwon M.S. et Nakayama T. (2002). Antioxidant Activity of Polyphenols in Carob Pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 : 373-377.
- Lamontagne M. (2002). Produits laitiers fermentés, Dans : Science et technologie du lait, *Édition des Presses internationales Polytechnique*, Canada, p. 443-468.
- Lecerf J.M. (2016). Particularités et bienfaits des yaourts. *Nutrition et Santé*. 05 (01) : 24-32.
- Loones A. (1994). Lait fermentés par les bactéries lactiques. In Bactéries lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques. Vol 2. De Roissart, H et Luquet, F.M. (Eds), Loriga, Uriage. 135-154.
- Mahaut M., Jeant R., Brulé G. et Schuck P. (2000). Les produits industriels laitiers. *Tech et Doc, Lavoisier, Paris*. p.25-37.
- Mahmoudi S., Khali M. et Mahmoudi N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature et Technologie*. 09, 35 - 40.
- Makris D. P. et Kefalas P. (2004). Carob Pod (*Ceratonia siliqua* L.) as source of polyphenolic antioxidants. *Food Technology and Biotechnology*. 42: 105-108.
- Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*. 26 (2) : 211-219.
- Moskowitz H.R. et Krieger B. (1995). The contribution of sensory liking to overall liking: An analysis of six food categories. *Food Quality and Preference*. 6: 83-90.
- Motilva M.J., Serra A. et Macia A. (2013). Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *Journal of Chromatography A*, 1292 : 66– 82.
- Mouillet L., Luquet F.M. et Boudier J.F. (1977). Détermination des sucres par chromatographie en phase gazeuse. Applications à la mesure de l'activité de la bêta galactosidase dans les ultra-

filtrats de lactosérum et à l'étude de l'évolution du lactose dans les yaourts nature. Collaboration technique A. DEGROS *Labcodral, 105, rue de l'Université - 59509 Douai, 561-562.*

Mulet A., Fernandez-Salguero J., García-Perez J.V. et Bon J. (2015). Mechanistic modeling to address process analysis: Kibbles of carob (*Ceratonia siliqua*, L.) pod extraction. *Journal of Food Engineering*, 176: 71-76.

Nachtomi E., Alumot E. (1963). Tanins and polyphenols in carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Science and Food Agricultural*, 14 : 464-468.

Naczki M., Grant S., Zadernowski R. et Barre E. (2006). Protein precipitating capacity of phenolics of wild blueberry leaves and fruits. *Food Chemistry*. 96: 640–647.

Nishira H. et Joslyn M. A. (1968). The galloyl glucose compounds in green carob pods (*Ceratonia siliqua*). *Phytochemistry*, 7 : 2147-2156.

Nkhili E. (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de doctorat : université d'Avignon. 387p.

Odabasoglu F., Aslan A. , Cakir A., Suleyman H., Karagoz Y., Halici M. et Bayir y. (2004). Comparison of Antioxidant Activity and Phenolic Content of Three Lichen Species. *Phytotherapy Research*, 18 : 938–941.

Ott A., Fay L.B. et Chaintreau A. (1997). Determination and origin of the aroma impact compounds of yoghurt flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 850-858.

Ould Moustapha A., N'diaye A.D. et Ould Kory M.B. (2012). Etude de la qualité du lait pasteurisé des industries laitières situées à Nouakchott Mauritanie. *La science en liberté*. 4 : 2111-4706.

Ouzounidou G., Vekiari S., Asfi M., Gork M. G., Sakcali M. S. et Ozturk M. (2012). Photosynthetic characteristics of Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.) and chemical composition of its fruit on diurnal and seasonal basis. *Pakistan Journal of Botany*, 44 (5) : 1689-1695.

- Owen R.W., Haubner R., Hull W.E., Erben G., Spiegelhalder B., Bartsch H. et Haber B. (2003). Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre, *Food and Chemical Toxicology*, 41: 1727–1738.
- Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reactions. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307–325.
- Ozidal T., Capanoglu E. et Altay F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2) : 954-970.
- Paci kora E. (2004). Interactions physicochimiques et sensorielles dans le yaourt brassé aromatisé. Thèse de doctorat : quels impacts respectifs sur la perception de la texture et de la flaveur. *Institut National Agronomique Paris-Grignon*, p 258.
- Pszczola D. E. (1998). ABC's of nutraceutical ingredients. *Food Technology*, 52(3) : 30-37.
- Puhan Z. et Wielinga M. W. (1996). Products derived from carob pods with particular emphasis on carob bean gum (CBG). *Report Technical Committee of INEC (unpublished)*.
- Quettier-Deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin J.C., Bailleul F. et Trotin F. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 35–42.
- Quezel P. et Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Tome 1). *Centre National de la Recherche Scientifique*, pp.557
- Ramful D., Tarnus E., Aruoma OI. et Bourdon T. (2011). polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food research international*, 44 (7) : 2088-2099.

- Rejeb M. N. (1994). Le caroubier en Tunisie : Situations et perspectives d'amélioration. Dans: Quel avenir pour l'amélioration des plantes ? *Edit. aupelf-uref. John Libbey Eurotext. Paris: 79-85.*
- Ribadeau B., Mercier J.C. et Grosclau F. (1973). Amino-acid composition and sequence of bovine α 1-caseins and β -caseins. *Neth. Milk Dairy Journal*, 27:304-312.
- Ribereau-Gayon, P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris, France.
- Ruiz-Roso B., Quintela J.C. et de la Fuente E. (2010). Insoluble carob fiber rich in polyphenols lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic subjects. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1:50-6.
- Sahu A., Kasoju N. et Bora U. (2008). Fluorescence study of the curcumin-casein micelle complexation and its application as a drug nanocarrier to cancer cells. *Biomacromol.* 9:2905-2912.
- Saura-Calixto F. (1988). Effect of condensed tannins in the analysis of dietary fiber in carob pods. *Journal of Food Science*, 53, 1769-1771.
- Sava N., Van der Plancken I., Claeys W. et Hendrickx M. (2005). The kinetics of heat-induced structural changes of β -lactoglobulin, *Journal of Dairy Science*. 88: 1646-1653.
- Schofield P., Mbugua D-M. et Pell A N. (2001). Analyses of condensed tannins: a review *Animal Food and Technology*. 91:21-40.
- Sebai H., Souli A., Chehimi L., Rtibi K., Amri M., El-Benna J. et Sakly M. (2013). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*. 7(2) : 85-90.
- Serairi-Beji R., Mekki-Zouiten L. et Tekaya-Manoubi L. (2000). Can carob powder be used with oral rehydration solution for the treatment of acute diarrhea. *Med Top* 60:125.

Siebert K.J., Troukhanova N.V. et Lynn P.Y. (1996). Nature of polyphenol-protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 : 80-85.

Singleton V.L., et J.A. Rossi. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–158.

Snappe J.J., Lepoudere A. et Sredzinski N. (2012). Protéines laitières. *Techniques de l'Ingénieur*, F 4 820.

Sodini I., Remeuf F., Haddad S. et Corrieu G. (2004). The relative effect of milk base starter, and process on yoghurt texture: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 113-137.

Sperker B, Werner U, Murdter TE. (2000). Expression and function of beta-glucuronidase in pancreatic cancer: potential role in drug targeting. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*;362:110–5.

Stojadinovic M., Radosavljevic J., Ognjenovic J., Vesic J., Prodic I., Stanic-Vucinic D., et Velickovic T. C. (2013). Binding affinity between dietary polyphenols and β -lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed. *Food chemistry*, 136(3) : 1263-1271.

Tamine A.Y. et Robinson R.K. (1999). *Yoghurt Science and Technology*, CRC Press LLC, Woodhead publishing limited, *Second Edition, England*, 619p.

Tamir M., Nachtomi E. et Alumot E. (1971). Degradation of tannins from carob pods by thioglycolic acid. *Phytochemistry*, 10, 2769-2774.

Tsao R. et Yang R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2: 1231-1246.

Turkmen I. et Eksi A. (2011). Brix degree and sorbitol/xylitol level of authentic pomegranate. *Food Chemistry*, 127:1404–1407.

Vavilov N.I. (1951). *The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants* (translated from the Russian by K.S. Chester). The Ronald Press Company, New York.

Verge S., Richard T., Moreau S., Richelme-David S., Vercauteren J., Prome J.C. et Monti J.P. (2002). First observation of non-covalent complexes for a tannin-protein interaction model investigated by electrospray ionisation mass spectroscopy. *Tetrahedron Letters*, 43 : 2363-2366.

Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J., Sendra E., Sayas-Barbera E. et Perez-Alvarez J. A. (2011). Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food research international*, 44 (5) :1217-1223.

Wegrzyn T., Farr J., Hunter D., Au J., Wohlers M., Skinner M. et Sun-Waterhouse D. (2008). Stability of antioxidants in an apple polyphenol–milk model system. *Food chemistry*, 109 (2), 310-318.

Wilfred V. et Nicholson R. L. (2008). *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer Edition, p 82.

Witherspoon J. M. et Jackson J. F. (1995). *Modern Methods of Plant Analysis*. In: Linskens H. F., Jackson J F. *Fruit Analysis*. Springer, 111p.

Würsch P., Vedovo S., Rosset J. et Smiley M. (1984). The tannins granules from ripe carob pod. *Lebensm.-Wiss.u.-Technology*, 17: 351-354.

Zohary M. (1973). *Geobotanical Foundations of the Middle East*, 2 vols. Stuttgart.

Annexes

Annexe 01. Biosynthèse des composés phénoliques.

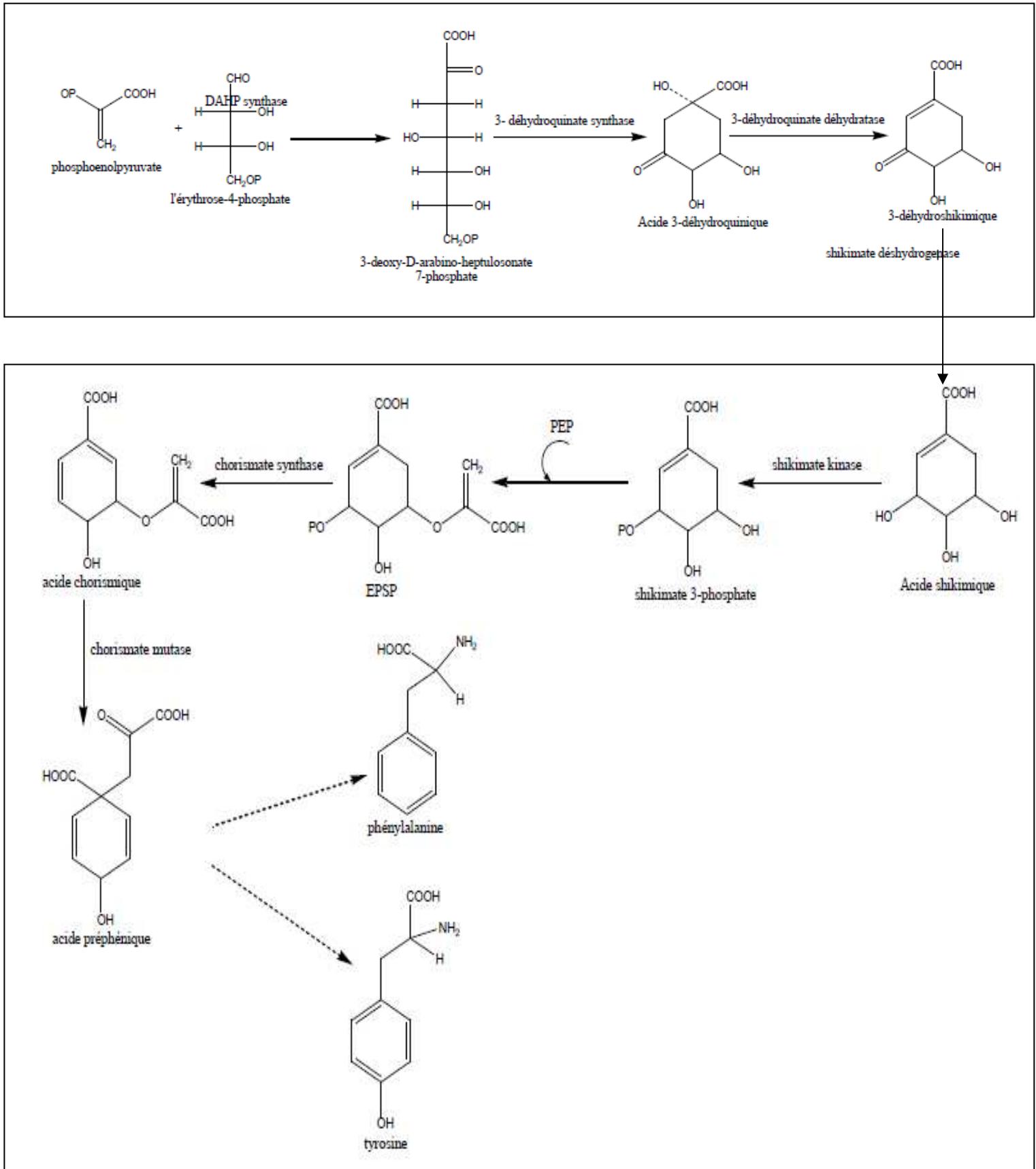


Figure 01. Voie de l'acide shikimique (Wilfred et Nicholson, 2008).

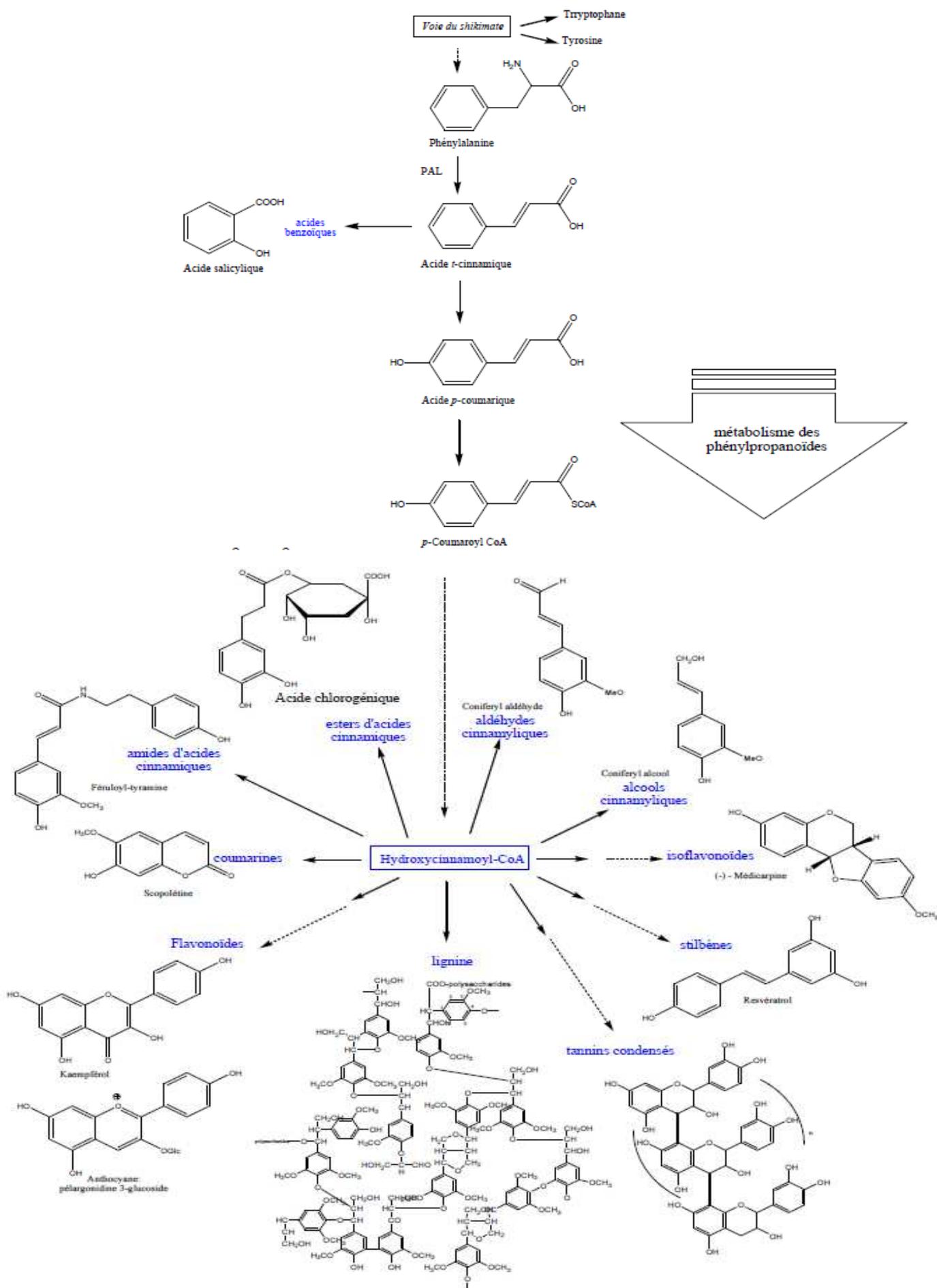
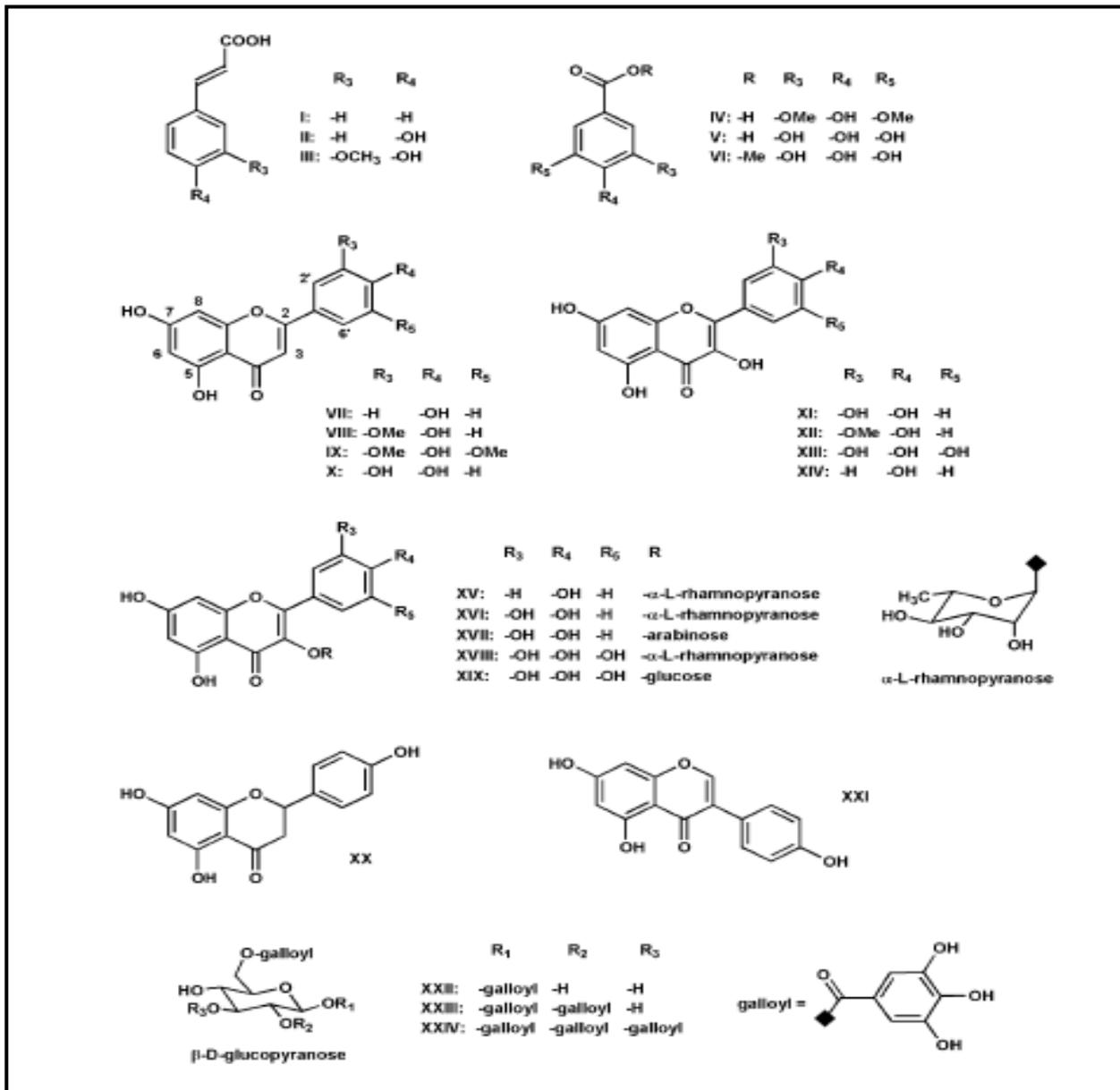


Figure 02. Métabolisme des phénylpropanoïdes conduisant aux principaux groupes de composés phénoliques (Atta-ur-Rahman, 2003).

Annexe 02. Structure des composés phénoliques de la caroube.



Les composés phénoliques identifiés:

I = acide cinnamique,
 II = acide p-coumarique,
 III = acide ferulique,
 IV = acide syringique,
 V = acide gallique,
 VI = methyl gallate. Flavones:
 VII = apigénine,
 VIII = chrysoeriol (luteoline 3' methyl ether),
 IX = tricétine 3',5'-diméthyl ether,
 X = luteoline. Flavonols:
 XI = quercétine,
 XII = isorhamnétine (quercétine 3'-méthyl ether),

XIII = myricétine,
 XIV = kaempferol. Glycosides de flavonol:
 XV = kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside,
 XVI = quercétine-3-O-α-L-rhamnoside,
 XVII = quercétine arabinoside,
 XVIII = myricétine-3-O-α-L-rhamnoside,
 XIX = myricétine glucoside (configurations pour arabinoside XVII et glucoside XIX non confirmées); flavanone:
 XX = naringénine; isoflavone:
 XXI = génistéine. Gallotannins:
 XXII = 1,6-di-O-galloyl-β-D-glucose,
 XXIII = 1,2,6-tri-O-galloyl-β-D-glucose,
 XXIV = 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose.

Figure 01. Structure des composés isolés et identifiés de la fibre de caroube (Owen *et al.*, 2003).

Annexe 03. Caroube verte utilisée.



Figure 01. Photographie des gousses vertes de la caroube (*Ceratonia siliqua L.*).



Figure 02. Photographie de la poudre lyophilisée.



Figure 03. Photographie du jus de la caroube verte.

Annexe 04. Courbes d'étalonnage.

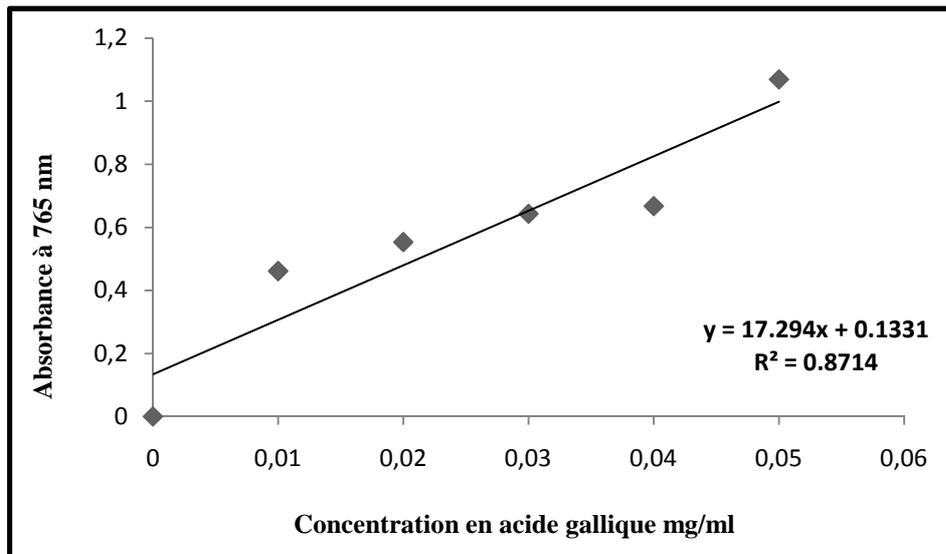


Figure 01. Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.

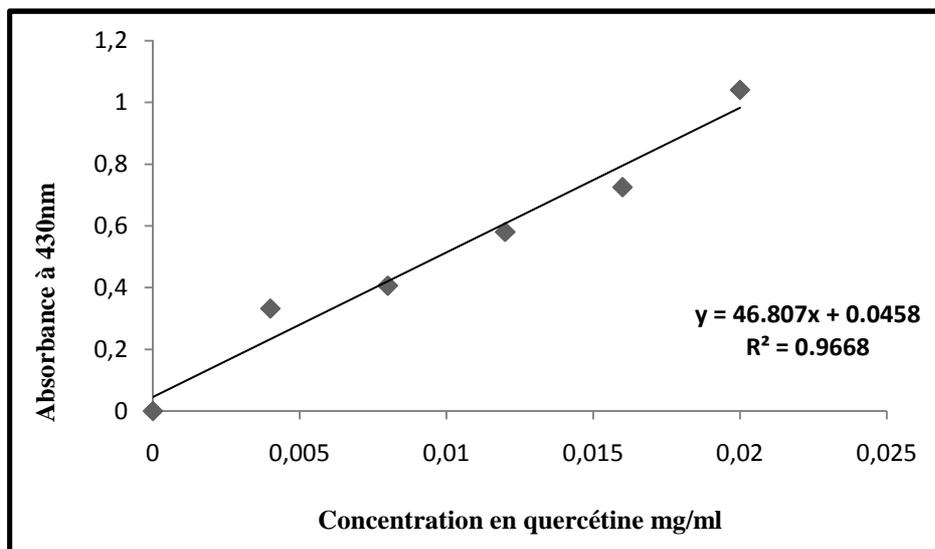


Figure 03. Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

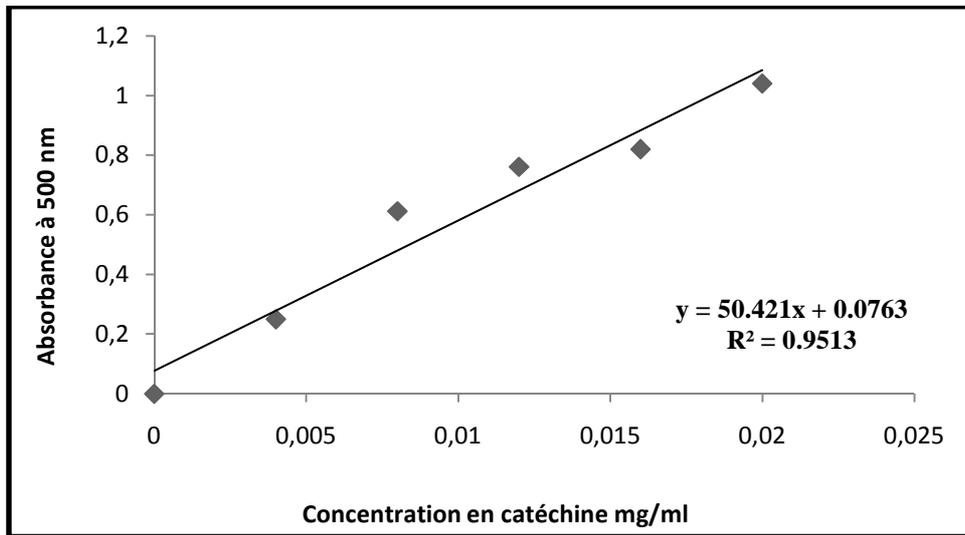


Figure 03. Courbe d'étalonnage des tanins condensés.

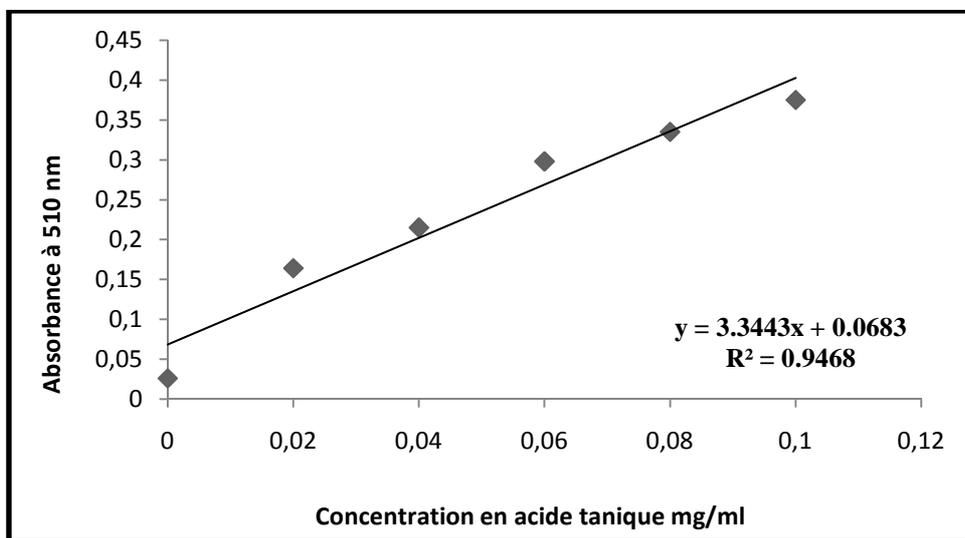


Figure 04. Courbe d'étalonnage des tanins hydrolysables.

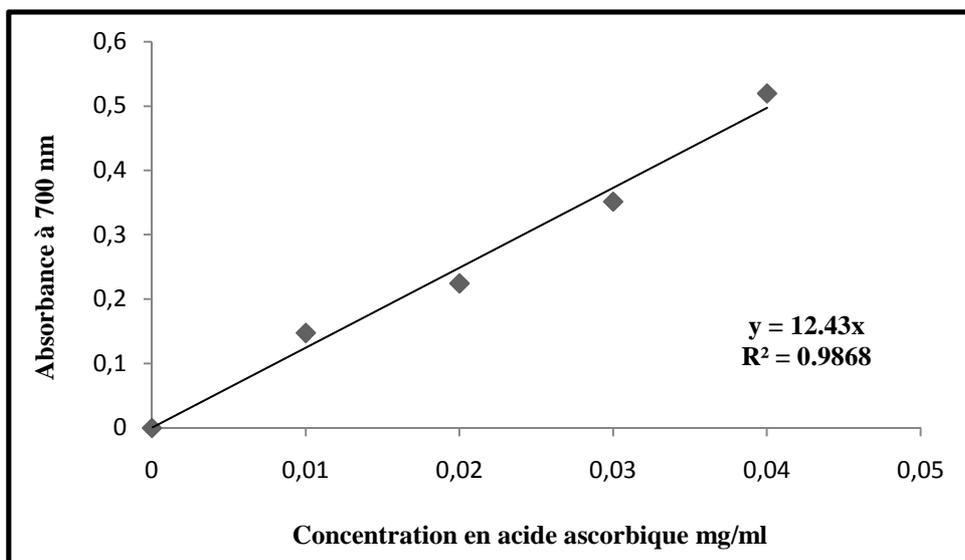


Figure 05. Courbe d'étalonnage du pouvoir réducteur du fer.

Annexe 05. Préparation des solutions des dosages.

Tableau 04. Préparation des solutions des dosages.

Solution	Préparation
Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃ , 7, 5%)	Na ₂ CO ₃7, 5 g Eau distillée.....100 ml
Réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à 1/10)	Réactif de Folin-Ciocalteu.....1 ml Eau distillée.....9 ml
Chlorure d'aluminium (AlCl ₃ , 2%)	AlCl ₃2 g Methanol.....100 ml
DPPH à 60μmole	DPPH.....2,4 mg Méthanol.....100 ml
Tampon phosphate (0,2M et pH 6,6)	KH ₂ PO ₄ (2,7218 g) dans l'eau distillée (100 ml) K ₂ HPO ₄ (3,4836 g) dans l'eau distillée (100 ml) PH de la solution de KH ₂ PO ₄ ajusté à 6,6 avec la solution de K ₂ HPO ₄ (cas ou PH < à 6,6) PH de la solution de K ₂ HPO ₄ ajusté à 6,6 avec la solution de KH ₂ PO ₄ (cas ou PH > à 6,6)
Ferricyanure de potassium (1%, m/v)	Ferricyanure de potassium.....1g Eau distillée.....100 ml
Acide trichloracétique (10%, m/v)	Acide trichloracétique.....10g Eau distillée.....100 ml
Acide gallique (0,05 mg/ml)	Acide gallique.....1 mg Acétone 70%.....20 ml
Quercétine (0,02mg/ml)	Quercétine.....1 mg Acétone 70%.....50 ml
Catéchine (0,02 mg/ml)	Catéchine.....1 mg Acétone 70%.....50 ml
Acide tannique (0,1 mg/ml)	Acide tannique.....2 mg Acétone 70%.....20 ml
Acide ascorbique (0,04 mg/ml)	Acide ascorbique1 mg Acétone 70%.....25 ml
Réactif ferrique (2% de sulfate de fer et d'ammonium dans HCL à 2M)	Sulfate de fer et d'ammonium.....2 g HCL (2M).....100 ml

Tampon acétate (PH = 4,9)	Acide acétique (0,2M).....0,48 ml Na Cl (0,17M).....0,394 g Eau distillée.....40 ml PH ajusté à 4,9
BSA (1mg/ml dans le tampon acétate)	BSA.....40 mg Tampon acétate40 ml
(SDS/TEA)	SDS.....1 g TEA.....5 ml Eau distillée.....100 ml pH ajusté à 9,4 avec le HCL
Chlorure ferrique (Fe Cl ₃ , 0,1%)	Fe Cl ₃0,1 g Eau distillée.....100 ml
Acétate de sodium (0,4M, pH 4,5)	CH ₃ COONa.....3,28 g Eau distillée.....100 ml PH ajusté à 4,5

Annexe 06. Photographie d'extrait polyphénolique (EP) lyophilisé.

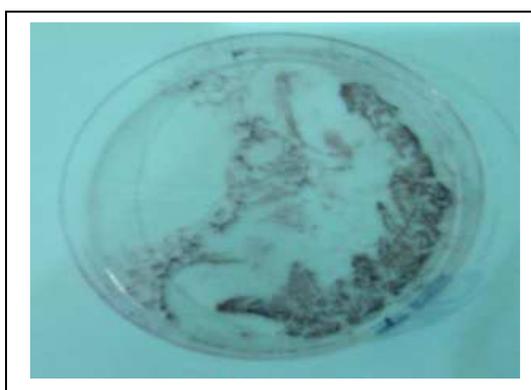


Figure 01. Photographie d'extrait phénolique lyophilisé (EP).

Annexe 07. Composition des milieux de culture utilisés

Tableau 3. Composition de la gélose Lactosée Biliée au Cristal Violet et au Rouge neutre (VRBL).

Composant	Quantité
- Digestat enzymatique de tissus animaux (Peptone)	7,0 g
- Extrait de levure	3,0 g
- Lactose	10,0 g
- Sels biliaires	1,5 g
- Chlorure de sodium	5,0 g
- Rouge neutre	30,0 mg
-Cristal violet	2,0 mg
- Agar-agar	12 à 18 g
- Eau	1000 ml

Tableau 4. Composition du milieu Baird Parker.

Composant	Quantité
- Tryptone	9,47 g
- Extrait de viande	4,74 g
- Extrait autolytique de levure	0,95 g
- Pyruvate de sodium	9,47 g
- Glycine	11,37 g
- Chlorure de lithium	4,74 g
- Agar agar bactériologique	14,21 g
- Plasma de lapin, EDTA	25,0 ml
- Fibrinogène bovin	5,0 g
- Inhibiteur de trypsine	25,0 mg
- Tellurite de potassium	25,0 mg
- Eau.	1000 ml

Tableau 03. Composition d'eau peptonée tamponnée.

Composant	Quantité
- Peptone	10,0 g
- Chlorure de sodium	5,0 g
- Hydrogéo-orthophosphate disodique Dodécahydraté (Na ₂ HP0 ₄ , 12H ₂ O)	9,0 g
- Dihydrogéo-orthophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
- Eau	1000 ml

Tableau 04. Composition d'OGYE.

Composant	Quantité
- Extrait de levure	5 g
- Glucose	20 g
- Agar	12 g
- Eau.	1000 ml

Tableau 04. Composition du bouillon SFB.

Composant	Quantité
- Peptone	5 g
- Tryptone	5 g
- Mannitol	4 g
- Phosphate dipotassique	7g
- Eau	1000 ml

Tableau 05. Composition de la solution Ringer.

Composant	Quantité
- Bicarbonate de sodium	0,05 g
- Chloride de potassium	0,11 g
- Chloride de calcium	0,06 g
- Chloride de sodium	2,25g
- Eau	1000 ml

Tableau 05. Composition du milieu SS.

Composant	Quantité
- Extrait de viande de boeuf	5,0 g
- Peptone	5,0 g
- Lactose	10,0 g
- Sels biliaries	8,5 g
- Citrate de sodium	10,0 g
- Thiosulfate de sodium	8,5 g
- Citrate ferrique	1,0 g
- Vert brillant	0,00033 g
- Rouge neutre	0,025 g
- Agar	15,0 g
-Eau	1000 ml

Annexe 08. Questionnaire de l'analyse sensorielle.

Évaluation sensorielle des coagulums élaborés à l'échelle du laboratoire

Sexe :

Age :

Veillez examiner et goûter chaque échantillon de produit, et donnez votre remarque selon les paramètres mentionnés ci-dessous.

0 : Néant

+ : Faible

++ :

LE VISUEL :

A

B

C

❖ **Couleur:** Blanc
 Blanc cassé

Blanc
 Blanc cassé

Blanc
 Blanc cassé

❖ **Brillance:** Mat
 Brillant

Mat
 Brillant

Mat
 Brillant

LA TEXTURE :

❖ **Cassant :** Oui
 Non

Oui
 Non

Oui
 Non

❖ **Granuleux :** Oui
 Non

Oui
 Non

Oui
 Non

❖ **Consistant à la cuillère :** Oui
 Non

Oui
 Non

Oui
 Non

❖ **Moussant :** Oui
 Non

Oui
 Non

Oui
 Non

LE GOUT :**A****B****C**❖ Saveur :

-
- Sucré
-
-
- Amer
-
-
- Acide

-
- Sucré
-
-
- Amer
-
-
- Acide

-
- Sucré
-
-
- Amer
-
-
- Acide

Intensité :

-
- 0
-
-
- +
-
-
- ++

-
- 0
-
-
- +
-
-
- ++

-
- 0
-
-
- +
-
-
- ++

❖ Astringence :

-
- Présence
-
-
- Absence

-
- Présence
-
-
- Absence

-
- Présence
-
-
- Absence

Intensité :

-
- 0
-
-
- +
-
-
- ++

-
- 0
-
-
- +
-
-
- ++

-
- 0
-
-
- +
-
-
- ++

L'AROME :**A****B****C**

-
-
-
-
- Aucun

-
-
-
-
- Aucun

-
-
-
-
- Aucun

**Persistence
de l'arôme
en bouche :**

-
- Persistant
-
-
- Non persistant

-
- Persistant
-
-
- Non persistant

-
- Persistant
-
-
- Non persistant

ملخص

يعتبر الخروب مصدر هام لمضادات الأكسدة الطبيعية (البوليفينول)، في الواقع أعطى الباحثين والصناعيين في مجال الأغذية الزراعية أهمية متزايدة لمادة البوليفينول بسبب، خصائصها المضادة للأكسدة، وفرتها في نظامنا الغذائي، ودورها الهام في الوقاية والعلاج من العديد من الأمراض. بالتالي، قد أدى الاهتمام الأخير للمستهلكين على الأغذية الوظيفية، والحاجة إلى استبدال المواد المضادة للأكسدة الاصطناعية عن طريق مضادات الأكسدة الطبيعية لاستخدام هذه الجزيئات لصناعة منتجات جديدة. المزيج المكون من المضادات للأكسدة الموجودة في بعض الفواكه مع بروتينات الحليب تعتبر خير مثال و الذي ذكر من قبل العديد من المؤلفين. الهدف من هذا العمل هو تقييم محتوى البوليفينول لخلاصات من الخروب الأخضر (مستخرج بوليفينولي والعصير المستخرج من قرون الخروب الأخضر) ودراسة إمكانية دمج احدي أو كلتي هاتين الخلاصتين في صياغة الياغورت وأثارها على ترسيب بروتينات الحليب. الدفاع وراء هذا إلى حد كبير من قبل البحث عن مجموعة واسعة من الأطعمة المدعمة بالبوليفينول، لا سيما في حالة منتجات الحليب. فحص كميات المركبات الفينولية في الخلاصات المدروسة أعطى مستويات عالية من المركبات الفينولية وهي مجموع البوليفينول الإجمالية، مركبات الفلافونويد والتانين. كذلك تقييم النشاط المضاد للأكسدة، الذي اجري عن طريق اختبار DPPH و قوة الإرجاع للحديد أظهرت أن كلا الخلاصتين لديها نشاط قوي لمضاد الأكسدة. لذلك يمكن اعتبار الخروب الأخضر كمصدر رئيسي لمضادات الأكسدة الطبيعية. كشف اختبار التخثر ترسيب البروتينات مع العصير بنسبة 10%. وقد نتج عن هذا الأخير تخثر ثابت مع خروج بسيط من مصلى الحليب. والواقع أن عصير الخروب الأخضر يبدو أكثر ملائمة كعامل لتخثير بروتينات الحليب في مجال منتجات الحليب وخاصة في صناعة الياغورت. بينت التحليلات الفيزيوكيميائية المجرات على الحليب المخثر، عن قوة الهيدروجين مقدرة ب 5,07، درجة الحموضة 63,66 °د، و إجمالي مستخلص المادة الجافة قدره 22,74%. هذا الحليب المخثر يختلف اختلافاً ملحوظاً عن الشاهد (باوورت رمدي) بالمقارنة مع درجة الحموضة. وأظهرت التحليلات الميكروبيولوجية أن المنتج ذو نوعية جيدة.

الكلمات الدالة : الخروب الأخضر، البوليفينول، الياغورت، بروتينات الحليب،التخثر،الحليب المخثر.

Abstract

Carob is considered as a potential source of natural antioxidants (polyphenols). Indeed, researchers and manufacturers in food industry give an increasing importance for polyphenols due to their antioxidant properties, their great abundance in our diet, and their crucial role in the prevention and treatment of several diseases. Thus, recent interest from consumers for functional foods and the need to replace the synthetic antioxidants by natural antioxidants has led to the use of these molecules to formulate new products. The combination of antioxidant components from some fruit with milk proteins is the best example that has been reported by several authors. The objective of the present work is the polyphenolic assessment of green carob's extracts (Polyphenolic extract and juice extracted from the fresh pods) and study the possibility of their incorporation in a formulation of a yogurt and their effects on the precipitation of milk proteins. This is mainly motivated by the research of a wide range of rich or enriched foods in polyphenols, particularly in case of dairy products. The evaluation of polyphenols in the studied extracts gave high contents of phenolic compounds namely total polyphenols, flavonoids and tannins. Therefore, the assessment of antioxidant activity, by DPPH and iron-reducing power tests, depicted a high antioxidant activity for both extracts. Green carob is therefore considered as an important source of natural antioxidants. Coagulation test revealed a precipitation of proteins with the juice at a level of 10%. The latter allowed to obtain a dense coagulum with a slight whey syneresis. In fact, juice from green carob seems to be more appropriate as a coagulating agent of milk protein in dairy industry, especially in yoghurt production. Physicochemical analyses of the obtained coagulum showed a pH of 5.07, an acidity of 63,66 ° D and a total dry extract of 22,74%. This coagulum is significantly different from the control yoghurt. Microbiological analyses reported that the coagulum formulated showed a good stability towards pathogens and germs of contamination.

Key words: carob, polyphenols, yogurt, milk proteins, precipitation, coagulum.

Résumé

La caroube est considérée comme une source potentielle en antioxydants naturels (polyphénols). En effet, les chercheurs et les industriels en agro-alimentaires donnent une importance croissante pour les polyphénols en raison de leur propriété antioxydante, leur grande abondance dans notre alimentation, et leur rôle crucial dans la prévention et le traitement de plusieurs maladies. Ainsi, l'intérêt récent des consommateurs pour les aliments fonctionnels et la nécessité de remplacer les antioxydants synthétiques par des antioxydants naturels a conduit à l'utilisation de ces molécules pour formuler de nouveaux produits. La combinaison des constituants antioxydants issus de certains fruits avec les protéines laitières présente le meilleur exemple qui a été rapporté par plusieurs auteurs. L'objectif du présent travail est l'évaluation du contenu polyphénolique des extraits de la caroube verte (extrait polyphénolique et jus extrait des gousses fraîches) et l'étude de la possibilité d'incorporation de ces deux extraits dans la formulation d'un yaourt et leurs effets sur la précipitation des protéines laitières. Ceci est considérablement motivé par la recherche d'une large gamme d'aliments riches ou enrichis en polyphénols, particulièrement dans le cas des produits laitiers. Le dosage des composés phénoliques dans les extraits étudiés a donné des teneurs élevées en composés phénoliques à savoir les polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins. Ainsi l'évaluation de l'activité antioxydante, réalisée par le test au DPPH et le pouvoir réducteur du fer, a montré que les deux extraits possèdent une forte activité antioxydante. Donc la caroube verte peut être considérée comme une source importante en antioxydants naturels. Le test de la coagulation a révélé une précipitation des protéines avec le jus avec une dose de 10%. Cette dernière a permis d'obtenir un coagulum ferme avec une légère synérèse du lactosérum. En effet, le jus de la caroube verte semble être plus approprié comme agent coagulant des protéines laitières dans le domaine laitier notamment dans la fabrication du yaourt. Les analyses physicochimiques effectuées sur le coagulum obtenu, montrent un pH de 5,07, une acidité de 63,66 °D et un extrait sec total de 22,74%. Ce coagulum est significativement différent du témoin. Les analyses microbiologiques montrent que le coagulum élaboré présente une bonne stabilité vis-à-vis des germes pathogènes et de contamination.

Mots clés : caroube, polyphénols, yaourt, protéines laitières, précipitation, coagulum.

