

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

Université de Constantine 1

Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires
(INATAA)

Département de : Technologie Alimentaire

No d'ordre :

No de série :

Mémoire en vue de l'Obtention du Diplôme de

Magister

En : Sciences Alimentaires

Option : Technologie Alimentaire

Les ferments locaux et leurs applications en
technologie laitière

Présenté par : M^{elle} BOUHANNA Imène

Devant le jury composé de :

Président : M^r. BOUDJLLAL A. Professeur / I.N.A.T.A.A / UC1

Examineurs : M^{me}. KHARROUB K. Professeur / I.N.A.T.A.A / UC1

M^{me}. BENATALLAH L. MCA / I.N.A.T.A.A / UC1

Promoteur : M^r. IDOUI T. MCA / Université de Jijel

Année universitaire 2013-2014

Remerciement

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

*J'exprime toute ma reconnaissance et mon plus grand respect à **Mr Idoui Tayeb** pour avoir assuré l'encadrement de ce mémoire, pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir fait bénéficier de ses larges compétences, et notamment de ses précieux et judicieux conseils scientifiques et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire. ...je ne peux que sincèrement vous exprimer mon respect et ma gratitude.*

*Je suis particulièrement reconnaissante à **Mr .Boudjljal Abdelghani** d'avoir accepté de juger mon travail en tant que président ainsi que, **M^{me} Kharroub Karima** et **M^{me} Benatallah Leila** de bien vouloir évaluer et examiner ce mémoire.*

*Ma plus sincère gratitude à **M^{me} Roula .M** et **Mr Khlifi .I** pour m'avoir accueilli au sein des laboratoires et m'avoir donné les moyens de mener à bout cette étude.*

*Un grand merci à **Mr Sifour .M**, maitre de conférences A à l'université de Jijel, pour son aide et ses conseils scientifiques précieux.*

*Je tiens à remercier toutes les personnes des laboratoires pédagogique et de recherche qui, par leur aide technique ou leur simple présence amicale (**Hadiaya, Nasiha, salima, soumia, wazina, asmaa**.....) ont contribué au bon déroulement des travaux de ce mémoire. Que les participants dans les séances d'analyses sensorielles soient remerciés pour leur disponibilité et leur application.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect à **mes parents** et particulièrement à mon père et je le remercie de m'avoir donné des conseils et qui m'a soutenu le long de vingt six ans pour atteindre ce point.*

*Je remercie du fond du cœur mon fiancé **Abdelhalime** qui m'a soutenu, encouragé et motivé toute au long de ce travail. Son aide, scientifique et personnelle, a été précieuse pour pouvoir surmonter des moments pas toujours faciles et avec qui j'ai eu le plaisir de partager les moments de bonheur.*

*Un grand merci à ma tante **Faiza** qui est la sœur et l'amie.*

Je tiens également à remercier tous ceux qui, à divers titres, m'ont aidé directement et indirectement durant ce travail.

*Enfin je n'oublie pas les deux simples bactéries **St. thermophilus** et **Lb. bulgaricus** qui étaient mes partenaires dans ce travail !*

Merci pour tout, simplement.

☆☆ *Dédicace* ☆☆

☆☆☆ *À mes chers parents en témoignage de
ma connaissance pour leur patience, leur
sacrifice et leur soutien toute au long de mes
études.*

Que dieu leur prête santé ☆☆☆

☆☆☆ *À mon cher fiancé*

*« Abdelhalime » qui n'a jamais cessé de
croire en moi.*

Source d'amour et de tendresse

Sans toi, ma vie sera plus difficile ☆☆☆

☆☆ *Imène* ☆☆

Sommaire

Sommaire

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	01

I. Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Aptitudes technologiques des bactéries du yaourt

I.1. Les bactéries spécifiques du yaourt.....	03
I.1.1. L'espèce <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	03
I.1.2. L'espèce <i>Streptococcus thermophilus</i>	04
I.1.3. La proto-coopération entre <i>St. thermophilus</i> et <i>Lb. Bulgaricus</i>	05
I.2. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques du yaourt.....	06
I.2.1. Aptitude acidifiante.....	07
I.2.2. Aptitude protéolytique.....	07
I.2.3. Aptitude texturante.....	08
I.2.4. Aptitude aromatisante.....	09
I.2.5. Aptitude antagonistique.....	09
I.2.6. Aptitude lipolytique.....	10

Chapitre II : Le yaourt et sa technologie

II.1. Définition et données sur le yaourt.....	11
II.2. Les composants du yaourt.....	11
II.3. Technologie de fabrication du yaourt.....	12
II.3.1. Préparation du lait.....	13
II.3.2. Standardisation du mélange.....	13
II.3.3. Homogénéisation.....	14
II.3.4. Traitement thermique.....	15
II.3.5. Fermentation lactique.....	15
II.3.6. Conditionnement et stockage.....	16
II.3.6.1. Yaourt ferme.....	16
II.3.6.2. Yaourt brassé.....	17
II.4. Conservation des yaourts.....	17
II.4.1. Conditions et durée légale de conservation.....	17
II.4.2. Qualité du yaourt au cours de la conservation.....	18
II.4.2.1. Qualité physicochimique.....	18
II.4.2.2. Qualité microbiologique.....	19
II.4.2.3. Qualité organoleptique.....	19
II.5. Le yaourt et ses biens faits.....	20

Chapitre III : Les plans d'expériences

III.1. Introduction.....	22
III.2. Notions utilisées aux plans d'expériences.....	22
III.2.1. Espace expérimental.....	22
III.2.2. Surface de réponse.....	23

III.2.3. Notion de modélisation mathématique	23
III.2.3.1. Equation mathématique	23
III.2.3.2. Erreur	24
III.2.3.3. p-value	24
III.2.3.4. Coefficient de détermination R^2	24
III.3. Types de plans d'expériences	24
III.3.1. Les plans pour surface de réponse	25
III.3.1.1. Le modèle Box-Behnken	25

II. Matériel et Méthodes

II.1. Matériel	27
II.1.1. Le Lait	27
II.1.2. Les ferments	27
II.1.3. Les souches indicatrices	27
II.1.4. Les antibiotiques	28
II.1.5. Les milieux de culture	28
II.1.6. Les produits chimiques et réactifs	28
II.1.7. Appareillage	28
II.2. Méthodes	29
II.2.1. Préparation des ferments thermophiles	29
II.2.1.1. Revivification, vérification de la viabilité des ferments et examen microscopique	29
II.2.1.2. Courbe de croissance des ferments lactiques	29
II.2.1.3. La viabilité des ferments lactiques	30
II.2.2. Aptitudes technologiques des ferments thermophiles	30
II.2.2.1. Aptitude acidifiante	30
II.2.2.2. Aptitude protéolytique	31
II.2.2.3. Aptitude lipolytique	32
II.2.2.4. Aptitude texturante	32
II.2.2.5. Aptitude aromatisante	34
II.2.2.6. Aptitudes antagonistique et effets de surnageant	34
II.2.2.7. Résistance aux antibiotiques	37
II.2.3. Optimisation de la fermentation lactique par le modèle de Box Behnken	37
II.2.4. Fabrication du yaourt nature étuvé et évaluation de sa qualité	38
II.2.4.1. Fabrication du yaourt	38
II.2.4.2. Qualité du yaourt au cours de la conservation	40
II.2.4.3. Analyse statistique des résultats	43

III. Résultats et Discussion

III.1. Etude des aptitudes technologiques	44
III.1.1. Confirmation de la viabilité et de la pureté des ferments thermophiles mixtes locaux	44
III.1.2. Croissance des ferments thermophiles mixtes sur bouillon MRS	44
III.1.3. Dénombrement des ferments thermophiles mixtes sur lait entier	45
III.1.4. Aptitude acidifiante	47
III.1.5. Activité texturante	51
III.1.6. Activité protéolytique	56
III.1.7. Activité lipolytique	62

III.1.8. Activité aromatisante.....	64
III.1.9. Activité antagoniste	67
III.1.10 Résistances aux antibiotiques	78
III.2. Optimisation de la production d'acide lactique par le modèle de Box Behnken.....	81
III.2.1. Constitution de la matrice d'expérience.....	81
III.2.2 Analyse par le logiciel.....	83
III.2.3. Optimisation du modèle.....	89
III.2.4. Validation du modèle.....	89
III.3. Fabrication du yaourt nature étuvé et évaluation de sa qualité.....	90
III.3.1. Fabrication du yaourt nature étuvé.....	90
III.3.2. Qualité des yaourts au cours de la conservation.....	91
Conclusion et perspectives	104
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau 01: Les facteurs et leurs niveaux choisis pour l'optimisation	39
Tableau 02 : Nombre de cellules viables à différents taux d'ensemencement	45
Tableau 03 : Production des exopolysaccharides par les ferments thermophiles mixtes	52
Tableau 04: Résultats de la protéolyse des ferments thermophiles mixtes et l'activité trypsique sur milieu AB	57
Tableau 05: Résultat de l'activité lipolytique des ferments lactiques	63
Tableau 06: Activité antibactérienne des ferments thermophiles sur les souches indicatrices	68
Tableau 07: Activité inhibitrice des surnageants natifs	71
Tableau 08: Activité inhibitrice des surnageants neutres	73
Tableau 09: Résultats de l'antibiogramme des ferments thermophiles	79
Tableau 10: Matrice expérimentale du modèle factoriel Box-Behnken représentant l'effet de température, extrait sec total, taux d'ensemencement et rapport <i>St/Lb</i> sur la production d'acide lactique	82
Tableau 11 : Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle Box-Behnken	84
Tableau 12: Analyse de la variance	85
Tableau 13: Conditions optimales de la production d'acide lactique	89
Tableau 14 : Evolution du nombre de germes viables du ferment au cours du stockage	96
Tableau 15: Evaluation de la qualité microbiologique pendant la conservation	99
Tableau 16: Résultats de l'analyse descriptive au début et à la fin de la conservation	101

Liste des figures

Figure 01: Aspect des cellules de <i>Lb. bulgaricus</i> sous microscope électronique à balayage	03
Figure 02 : Aspect des cellules de <i>St. thermophilus</i> sous le microscope électronique à balayage	05
Figure 03: Proto-coopération entre <i>St. thermophilus</i> et <i>Lb. bulgaricus</i>	06
Figure 04: Schéma de la fabrication du yaourt	13
Figure 05 : Domaine de variation d'un facteur	22
Figure 06: Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse	23
Figure 07: Diagramme de fabrication du yaourt nature étuvé	39
Figure 08: Croissance des ferments thermophiles mixtes sur bouillon MRS	44
Figure 09: Evolution du pH et d'acidité à différents taux d'ensemencement par FTM 1	47
Figure 10: Evolution du pH et d'acidité à différents taux d'ensemencement par FTM 2	47
Figure 11: Evolution du pH et d'acidité à différents taux d'ensemencement par FTM 3	48
Figure 12: Evolution du pH et d'acidité à différents taux d'ensemencement par ST-M6	48
Figure 13: Evolution du pH et de l'acidité à 3% d'ensemencement	49
Figure 14: Production d'acide lactique par les ferments locaux (3%) et le ferment industriel (1%)	50
Figure 15: Aspect des gels formés après 24heures d'incubation	51
Figure 16: Production des EPS sur milieu MRS par les ferments lactiques	53
Figure 17: Aspect des colonies de FTM 3 sur milieu hyper-saccharosé	53
Figure 18 : Evolution de la viscosité pendant les premières 4heures d'incubation	55
Figure 19: Activité protéolytique des ferments et activité trypsique sur milieu AB	57
Figure 20: Activité protéolytique sur bouillon nutritif additionné du lait écrémé	58
Figure 21: Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h par l'action de ferment FTM 1 sur le lait écrémé à 12%	60
Figure 22: Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h par l'action de ferment FTM 2 sur le lait écrémé à 12%	60
Figure 23: Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h par l'action de ferment FTM 3 sur le lait écrémé à 12%	61
Figure 24: Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h par l'action de ferment ST-M6 sur le lait écrémé à 12%	62
Figure 25: Activité lipolytique des ferments lactiques	64
Figure 26: Résultats de la recherche de l'acétoïne (VPI, VPII)	65
Figure 27: Production d'acétaldéhyde par les ferments thermophiles mixtes	66
Figure 28: Activité inhibitrice des ferments lactiques locaux	69
Figure 29: Activité inhibitrice des surnageants natifs des ferments lactiques sur <i>S. aureus</i>	72
Figure 30: Production d'acide lactique par les ferments thermophiles mixtes	75
Figure 31: Quantification d'acide lactique produit par le ferment FTM3	75

Figure 32: Production de peroxyde d'hydrogène par les ferments thermophiles mixtes	76
Figure 33: Quantification du peroxyde d'hydrogène produit par le ferment FTM1	77
Figure 34: Antibiogramme de ferments FTM 1	80
Figure 35: Effet des quatre facteurs sur la production d'acide lactique	83
Figure 36: Correlation entre T° et EST sur la concentration d'acide lactique (g/L)	86
Figure 37: Correlation entre T° et TE sur la concentration d'acide lactique (g/L)	86
Figure 38: Correlation entre T° et St/Lb sur la concentration d'acide lactique (g/L)	87
Figure 39: Correlation entre EST et TE sur la concentration d'acide lactique (g/L)	87
Figure 40: Correlation entre EST et St/Lb sur la concentration d'acide lactique (g/L)	88
Figure 41: Correlation entre TE et St/Lb sur la concentration d'acide lactique (g/L)	88
Figure 42: Aspect des deux yaourts fabriqués	90
Figure 43: Evolution du pH et de l'acidité dornic	91
Figure 44 : Evolution de la synérèse pendant la conservation	93
Figure 45 : Evolution de la matière sèche	95
Figure 46 : Evolution de la matière organique	95
Figure 47: Evolution de la matière minérale	95
Figure 48: Viabilité des ferments lactiques utilisés dans la fabrication des yaourts	96
Figure 49 : Ferments lactiques au premier jour de conservation	98
Figure 50 : Aspect visuel des yaourts destinés à l'analyse sensorielle	101

Liste des Abréviations

❖ Genres bactériens et flores

A. : *Acinetobacter*

B. : *Bacillus*

CT : Coliformes Totaux

CTT : Coliformes Thermotolérants

E. : *Escherichia*

FTM: ferment thermophile mixte

K. : *Klebsiella*

L. : *Listeria*

Lb. : *Lactobacillus*

P. : *Pseudomonas*

S. : *Staphylococcus*

St. : *Streptococcus*

❖ Unités de mesures

°D : Degré dornic

M: Molaire

mM : millimolaire

mpas : millipascal

N : Normalité

rpm : Rotation par minute

U : Unité

UFC : Unité Formant Colonie

UI : Unité Internationale

❖ Milieux de culture

MEVAG : Milieu d'Etude de la Voie
d'Attaque des Glucides

MRS : de Man-Rogosa et Sharp

OGA : Gélose glucose à l'oxytétracyclique

VRBL : Gélose lactosée biliée au cristal
violet et au rouge neutre

❖ Autres abréviations

3D: 3 dimensions

ANOVA: analyze of variance

ATCC: American Type Culture Collection

C/N: carbone/azote

DO : Densité Optique

EPS : Exopolysaccharide

EST : extrait sec total

FAO: Food and Agriculture Organization

HPLC: high performance liquid
chromatography

NI: non identifié

P : Probabilité ou risque de commettre une
erreur

sp. : Espèce non précisée

ssp. : Sous espèce

TCA : Acide Trichloracétique

TE: taux d'ensemencement

TG : triglycéride

YFC: yaourt au ferment commercial

YFL: yaourt au ferment local

Introduction

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

Dans chaque processus de fermentation, l'optimisation des paramètres physiques et chimiques est d'une grande importance due à son impact économique. Le développement d'un milieu économique nécessite une bonne sélection des conditions nutritionnelles et physiques. Cependant, l'optimisation de ces conditions de fermentation peut être réalisée par des techniques conventionnelles ou statistiques. Les techniques conventionnelles impliquent le changement d'une seule variable à la fois en fixant les autres variables; elles sont longues et inaptes à déterminer le point optimale due aux interactions entre les différents facteurs **(Weuster-Botz, 2000)**. Alors que, les techniques statistiques offrent plusieurs avantages, elles sont rapides, fiables et permettent de réduire le nombre des expériences. Ces techniques statistiques ont été utilisées dans l'optimisation de nombreux processus de fermentation : pour les cultures bactériennes, les cellules animales et pour les cultures des champignons **(Weuster-Botz, 2000 ; Ahuja et al., 2004 ; Djekrif-Dakhmouche et al., 2006)**.

L'Algérie qui se classe comme le plus gros consommateur de laits et ces dérivés au Maghreb avec 110 L/habitant/an **(Anonyme,2005)**, reste dépendante en matière d'approvisionnement en ferments lactiques vis à vis des laboratoires étrangers et fait recours à l'importation de ces produits en vue de leurs utilisations dans la fabrication de divers produits laitiers y compris le yaourt, c'est pourquoi, un intérêt particulier a été donné aux bactéries lactiques locales dont assez de travaux sur ces bactéries des laits crus, ont été publiés **(Guessas et Kihal, 2004 ; Cheriguene et al., 2006 ; Idoui et al., 2008)**. De même, des résultats de recherches sur la flore lactique du beurre traditionnel de vache, de brebis et de chamelle, ont été couronnés par des publications **(Kacem et Karam, 2006 ; Idoui et Karam, 2008 ; Idoui et al., 2009)**.

Notre travail s'insère dans cette préoccupation et porte sur l'étude des aptitudes technologiques de trois ferments thermophiles locaux préalablement isolés des produits laitiers traditionnels pour prévoir la possibilité de leur utilisation en industrie laitière.

Hormis l'introduction et la conclusion, ce manuscrit est constitué de trois parties : une partie bibliographique, une autre expérimentale avec des résultats et une discussion.

La revue bibliographique est composée de trois chapitres, dans le premier chapitre, nous allons donner des informations sur les deux bactéries spécifiques du yaourt ; *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* et leurs aptitudes technologiques. Le deuxième chapitre est consacré au yaourt, sa technologie de fabrication et sa qualité pendant la conservation. Dans le troisième chapitre l'essentiel des connaissances sur les plans d'expériences va être présenté.

Dans la seconde partie du manuscrit sont alors exposés le large éventail du matériel et des méthodes mis en œuvre dans le cadre du travail expérimental, où sont détaillés les procédés d'étude des aptitudes technologiques des trois ferments thermophiles mixtes locaux comparativement à un autre ferment thermophile industriel suivie d'une optimisation de la fermentation par le modèle de Box Behnken. L'essai de fabrication suivi d'une étude de la qualité pendant quinze jours de conservation d'un yaourt nature étuvé en utilisant le ferment présentant les meilleures aptitudes technologiques et en exploitant les résultats de l'optimisation sont également présentés. Les résultats et la discussion sont ensuite développés dans une troisième partie.

I. Synthèse
Bibliographique

I.1. Les bactéries spécifiques du yaourt

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

I.1.1.L'espèce *Lactobacillus bulgaricus*

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

Lb. bulgaricus est une bactérie thermophile, très exigeante en calcium et en magnésium et sa température optimale de croissance est d'environ 42°C, elle est responsable de la production d'acétaldéhyde (Marty-Teyesset et al., 2000).

La Figure 01 illustre l'aspect microscopique des cellules de *Lb. bulgaricus*.



Figure 01: Aspect des cellules de *Lb. bulgaricus* sous le microscope électronique¹.

¹WWW.raw-milk-facts.com

I.1.2. L'espèce *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus salivarius, ssp. *thermophilus* est un cocci Gram positif, disposé en chaînes en longueurs variables ou par paires, anaérobie facultatif, immobile, on le trouve dans les laits fermentés et les fromages (Roussel et al., 1994). C'est une bactérie dépourvue de l'antigène D, sensible au bleu de méthylène (0,1%) et aux antibiotiques, elle est incapable de métaboliser le galactose et se développe bien de 37 à 40 °C, mais croît encore à 50 °C. Thermorésistante, elle survit au chauffage à 65 °C pendant 30 minutes ou à 74 °C pendant 15 secondes, son métabolisme est de type homofermentaire (Vaillancourt et al., 2008).

St. thermophilus se différencie des autres espèces de même genre par son habitat (lait et produits laitiers), par son caractère non pathogène et ses propriétés probiotiques et technologiques (Iyer et al., 2010).

En industrie agro-alimentaire, *St. thermophilus* est en deuxième position derrière *Lactococcus lactis* dans le classement des bactéries lactiques utilisées. Elle est la seule espèce du genre streptocoque utilisée dans la fabrication des produits laitiers fermentés, elle est utilisée dans la fabrication de nombreux fromages, à pâtes pressées cuites (Emmental, Gruyère, Parmesan et Granatypes,...) mais aussi pour la Mozzarella, le Cheddar, et certains laits fermentés (Parente et Cogan, 2004; De Vuyst et Tsakalidou, 2008).

Le rôle principal de cette bactérie dans la fabrication du yaourt est la fermentation du lactose du lait en acide lactique, mais elle est nettement moins acidifiant que le lactobacille, il produit généralement de 0,5 à 0,6 % d'acide lactique (pH voisin de 5,2) uniquement de configuration L qui est l'isomère préféré dans les produits alimentaires, dû à la présence de L lactate déshydrogénase chez l'être humain (Narayanan et al., 2004 ; Panesar et al., 2007). Certaines souches sont capables de supporter un pH de 4,3 à 3,8. En plus de son pouvoir acidifiant, elle est responsable de la texture des laits fermentés, elle augmente la viscosité du lait par production de polysaccharides (FAO, 1995).

La figure 02 illustre l'aspect microscopique des cellules de *St. thermophilus*.



Figure 02 : Aspect des cellules de *St. thermophilus* sous le microscope électronique².

I.1.3. La proto-coopération entre *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*

La fabrication du yaourt repose sur les interactions prenant place entre deux espèces de bactéries lactiques, *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*. Souvent l'association entre ces deux espèces est appelée proto-coopération car elle est bénéfique mais pas indispensable à la croissance de chaque espèce dans le lait (**Thevenard, 2011**). Cette proto-coopération recherchée, entraîne une stimulation mutuelle qui se traduit par (**Mihail et al., 2009**):

- ✓ Un accroissement de la vitesse d'acidification;
- ✓ Un accroissement des niveaux de populations bactériennes finales;
- ✓ Une diminution du pH final du produit ;
- ✓ Une stimulation de la production de composés aromatiques notamment de l'acétaldéhyde ;
- ✓ Une meilleure stabilité du produit fini ;
- ✓ Une production plus importante de certains composés comme des polysaccharides extracellulaires (EPS).

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

² WWW.musee-afrappier.qc.ca

De son côté, le streptocoque stimule le lactobacille par production d'acide formique, le dioxyde de carbone et l'acide pyruvique (figure 03) (Jeantet et al., 2008).

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

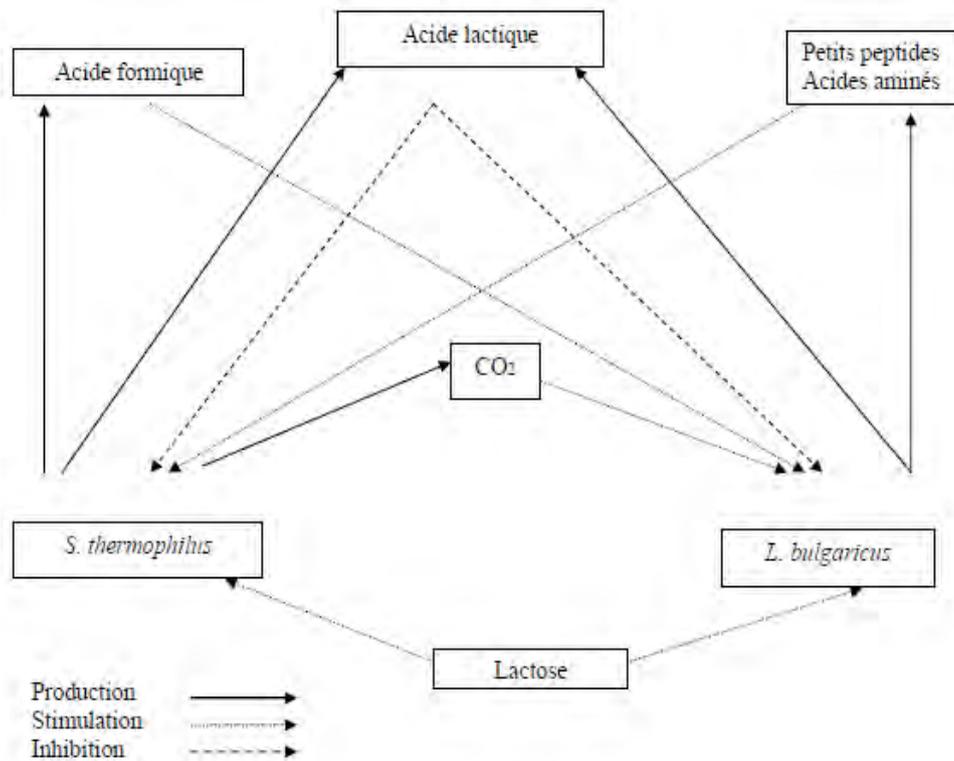


Figure 03: Proto-coopération entre *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* (Mahaut et al., 2000).

I.2. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques du yaourt

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Leur capacité à fermenter les hydrates de carbone et, à un moindre degré, de dégrader les protéines et les

lipides mène à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques et les exopolysaccharides. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés (Mozzi et al., 2010).

I.2.1. Aptitude acidifiante

La production d'acide lactique est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques en technologie laitière, car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et antimicrobien (Kuipers et al., 2000). Le processus d'acidification du yaourt dépend de l'activité symbiotique de *St. thermophilus* et *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. L'importance de l'acide lactique durant la fabrication du yaourt peut se résumer comme suit (Leory et al., 2002 ; Sinng Sudheer et al., 2006) :

- ✓ Il aide à déstabiliser les micelles de caséine, ce qui conduit à la formation du gel;
- ✓ Il donne au yaourt son gout distinct, comme il contribue à la saveur et l'aromatisation du yaourt ;
- ✓ Il intervient comme inhibiteur vis-à-vis des micro-organismes indésirable.

L'acidité du yaourt est communément exprimée en degré Dornic ($1^{\circ}\text{D} = 0.1\text{g d'acide lactique /L de lait}$). Elle se situe entre 100 et 130 $^{\circ}\text{D}$ (Loones, 1994).

Le développement de l'acidité est important non seulement pour la fermentation du lait, mais également nécessaire pour un arôme, une texture et une saveur bien-équilibrés de yaourt (Özer et Atasoy, 2002).

I.2.2. Aptitude protéolytique

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

Il est connu que l'activité protéolytique de *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* est plus élevée que celle du *St. thermophilus* (Gürsoy et al., 2010).

Quelques hydrolysats de protéine augmentent le taux d'acidification de yaourt, réduisent le temps de fermentation et augmentent la viabilité des deux bactéries dans le lait (**Oliveira et al., 2001 ; Lucas et al., 2004**).

I.2.3. Aptitude texturante

La texture et l'onctuosité constituent, pour le consommateur, des importants éléments d'appréciation de la qualité du yaourt. Certaines souches bactériennes produisent, à partir du glucose, des polysaccharides qui sont constitués de longues chaînes d'unités répétitives de sucres simples et /ou de dérivés de glucides plus ou moins ramifiées (**Ruas-Madiedo et al., 2001**).

Il est couramment admis que la production des exopolysaccharides est le résultat de l'action exercée par *St. thermophilus*, mais, *Lb. bulgaricus* possède une aptitude à produire des EPS composés de galactose, glucose, rhamnose, à des rapports 1/1/4 (**Tamime et Robinson, 1999**). L'utilisation de ces bactéries produisant les EPS augmente la résistance du coagulat de yaourt aux chocs physiques et thermiques, et joue un rôle important en réalisant la fermeté satisfaisante et la viscosité apparente du yaourt (**Ngoufack et al., 2004 ; Vaningelgem et al., 2004**). Ils ont l'avantage d'être « naturels », requis en faible concentration (de l'ordre de mg/L) et de pouvoir remplacer les agents stabilisants par leurs propriétés de modifier positivement la texture, la viscosité et la sensation des laits fermentés (**Marshall et Rawson, 1999**).

Plusieurs études portant sur l'effet des EPS sur les propriétés rhéologiques/physiques de produits laitiers fermentés de type yaourt tendent à démontrer que la concentration en EPS ne serait pas le facteur déterminant pour moduler ces propriétés (**De vuyst et al., 2003 ; Doleyres et al., 2005**). La fonctionnalité des EPS serait plutôt reliée à leurs caractéristiques structurales ainsi qu'à leurs interactions avec les autres constituants du milieu comme les protéines. Le poids moléculaire, la conformation (flexibilité et ramification) de la chaîne et la charge des EPS influenceraient les propriétés rhéologiques et physiques des produits laitiers fermentés de type yaourt (**Petry et al., 2003 ; Turgeon et Plesces, 2009**).

I.2.4. Aptitude aromatisante

Divers composés volatiles et aromatiques interviennent dans la saveur et l'appétence du yaourt. C'est principalement le lactose qui joue un rôle dans la formation de ces composés. Parmi ceux-ci, outre l'acide lactique qui confère au yaourt son goût acidulé, c'est l'acétaldéhyde qui a été identifié comme le plus important des composés carbonyliques qui contribuent à l'arôme typique du yaourt (Enel et al., 2011). Il provient en grande partie de la transformation de la thréonine. En outre, les deux bactéries du yaourt *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus* sont capable de produire l'acétaldéhyde mais à des proportions différentes, sa concentration optimale est estimée entre 17 et 41mg/L durant la fermentation du yaourt (Chaves et al., 2002 ; Bongers et al., 2004).

Le diacétyl contribue à donner un goût délicat dû à la transformation de l'acide citrique et, secondairement, du lactose par certaines souches de streptocoques. D'autres composés (acétone, acétoïne, butane-2-one, etc.) contribuent à l'équilibre et à la finesse de la saveur. Celle-ci résulte d'un choix avisé des souches, de leur capacité à produire dans un juste rapport les composés aromatiques et du maintien de ce rapport au cours de la conservation des levains et de la fabrication (FAO, 1995).

I.2.5. Aptitude antagonistique

Les composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques peuvent empêcher la croissance des bactéries pathogènes dans les produits fermentés. Ces composés incluent le peroxyde d'hydrogène, CO₂, le diacétyl, l'acétaldéhyde, les D-isomères des acides aminés et les bactériocines (Cintas et al., 2001 ; Akpınar et al., 2011).

La production d'acide lactique diminue le pH en créant un milieu défavorable au développement des microorganismes pathogènes (Aslim et al., 2004). Cet acide se trouve à l'équilibre entre ses formes dissociées et non dissociées, et l'ampleur de la dissociation dépend du pH. Au bas pH, la grande quantité d'acide lactique est sous la forme non dissociée qui est toxique pour beaucoup de bactéries, mycètes et levures. A pH 5.0 l'acide lactique est un inhibiteur des bactéries sporulées mais il est inefficace contre des levures et les moisissures (Woolford, 1975).

D'autre part, à une concentration de 10- 100 ppm, l'acétaldéhyde produit par *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* s'accumule dans le produit laitier, empêche la croissance de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *E. coli* (**Piard et Desmazeaud, 1991**).

Certaines souches de *Lb. bulgaricus* isolées de yaourt ont un potentiel antibactérien contre un certain nombre de micro-organismes pathogènes responsables de la détérioration des aliments particulièrement *Vibrio cholera* et *E. coli*, en raison de la production de bactériocine (**Tufail et al., 2011**).

I.2.6 Aptitude lipolytique

Les ferments lactiques possèdent des lipases et des estérases qui peuvent hydrolyser les triglycérides en acides gras. Ils peuvent produire certains acides gras volatils, (C₂ - C6), et contribue à la saveur des produits laitiers fermentés, cependant la lipolyse est généralement faible dans le yaourt et elle est donc non significative au terme du flaveur (**Béal et al., 2008**).

II.1. Définition et données sur le yaourt

Le mot yaourt (yoghourt ou yogourt) vient de « yoghurmark », mot turc signifiant « épaissir ». Selon la définition établie par la FAO (Food Agricultural Organisation) et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en 1977, le yaourt est un lait coagulé obtenu par la fermentation lactique due à deux ferments spécifiquesensemencés simultanément : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* qui sont contenus naturellement dans le lait, à l'exclusion de toute autre bactéries . Ces bactéries doivent se retrouver vivantes à la concentration de 10^7 /g de produit. Elles sont aussi thermophiles et dégradent le lactose en acide lactique à partir de 45°C dont la teneur doit être au moins 0,7 % lors de sa vente (Fredot, 2005 ; Vierling, 2008).

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

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

II.2. Les composants du yaourt

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

Cependant, la plupart des yaourts contiennent d'autres additifs tels que les matières sèches laitières non grasses (MSNG), pour augmenter le taux de matière sèche non gras du lait de 8.25% à 16% (CFR131, 2000a).

Les constituants non laitiers se composent des édulcorants, des stabilisateurs, des fruits et des colorants. Des édulcorants tels que le sirop de sucrose, de sucre inverti, de fructose, de

glucose ou de galactose sont ajoutés principalement pour des préférences du goût (**Tamime et Robinson, 1999**).

Des stabilisateurs tels que les gommés naturelles, les gommés naturelles modifiées ou les gommés synthétiques sont ajoutés pour améliorer et maintenir la fermeté et l'uniformité de gel, et améliorent également la perception dans la bouche. Les stabilisateurs typiques de yaourt incluent la carboxy-méthyle cellulose (CMC), la gomme de guar, la gomme de xanthane, les carraghénanes ou les pectines (**Soukoulis et al., 2007**). Les hydrocolloïdes stabilisent spécifiquement les structures de gel, augmentent la viscosité et forment un réseau avec les constituants de lait (**Teles et Flores, 2007**).

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

II.3. Technologie de fabrication du yaourt

Le schéma de la figure 04 résume les étapes de la fabrication du yaourt. Celle-ci peut subir des variantes de sorte que les étapes indiquées peuvent faire l'objet de modifications dans leur ordre comme dans leur nombre. Cette figure montre qu'il existe deux types de yaourts (**Lee et Lucey, 2010**):

- ✓ Le yaourt ferme ou étuvé, dont la fermentation se fait après conditionnement en pots;
- ✓ Le yaourt brassé, dont la fermentation se fait en cuve; le coagulum obtenu est alors dilacéré et brassé pour être rendu plus ou moins visqueux, puis conditionné en pots.

La technologie donnée ci-après concerne le yaourt au lait de vache; elle peut s'appliquer sans difficultés aux yaourts aux laits d'autres espèces utilisés seul ou en mélanges.

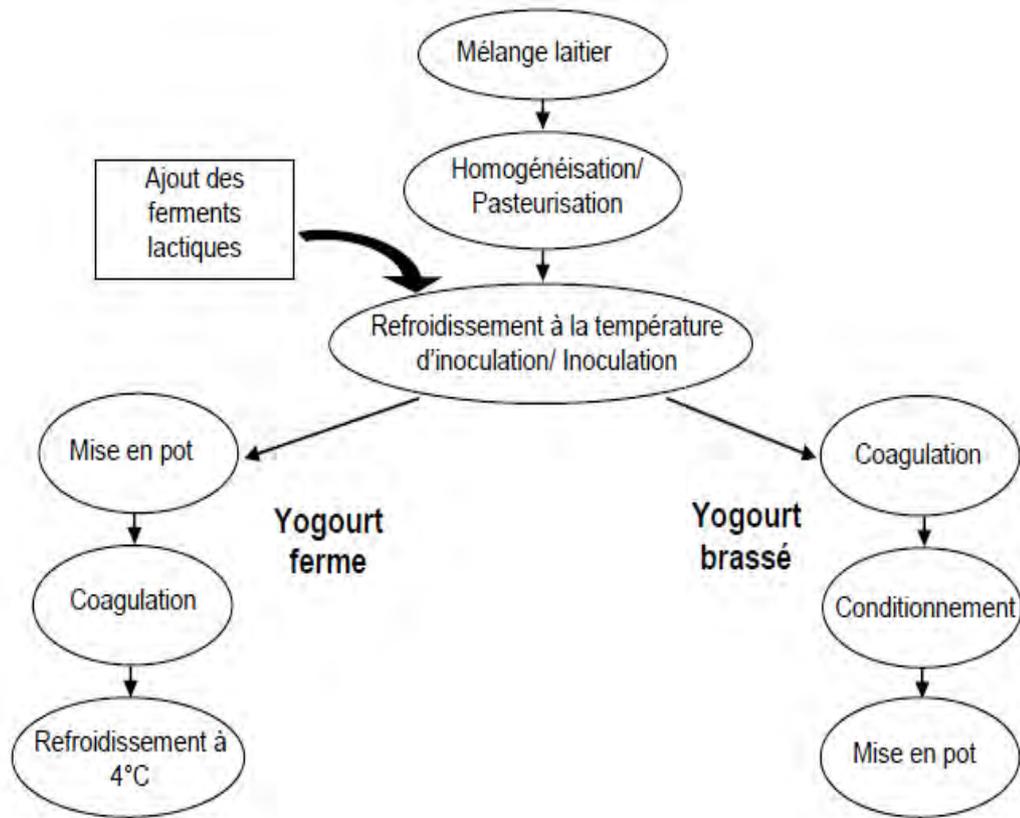


Figure 04: Schéma de la fabrication du yaourt (Gentès, 2011).

II.3.1. Préparation du lait

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

II.3.2. Standardisation du mélange

La consistance et la viscosité du yaourt sont pour une grande partie sous la dépendance de la matière sèche du lait. En effet, tous les nutriments jouent un rôle sur la qualité finale du yaourt (FAO, 1995 ; Lucey, 2004). Les protéines, de par leur coagulation et leur capacité de liaison avec l'eau, agissent sur la texture, particulièrement sur la viscosité, la consistance, l'élasticité et la fermeté. La graisse confère de l'onctuosité et la sensation de douceur à la bouche, masque

l'acidité et améliore la saveur (**Lamontagne, 2002**). Le lactose est le composé utilisé pour l'acidification et a un faible pouvoir sucrant, soit quatre fois plus faible que celui du sucre de table. Les minéraux, comme des bouillons, travaillent à la stabilisation du gel et les vitamines sont requise pour la croissance bactérienne (**Altan et al., 2008**).

La standardisation du mélange laitier permet non seulement de pallier aux variations de composition du lait mais aussi, à obtenir la composition désirée. Cette standardisation peut s'obtenir par l'ajout de concentrés et d'isolats de protéines sériques, de poudre de lait écrémé ou entier, de lactose et de la crème en fonction de la teneur désirée en protéines, solides totaux et matières grasses (**Tamime et Robinson, 1999**).

Selon le Code des principes FAO/ OMS, la teneur minimale en matière sèche laitière non grasse est de 8,2 % (en poids) quelle que soit la teneur en matière grasse (**norme n°A- 11 (a), 1975**) (**FAO, 1995**).

II.3.3. Homogénéisation

Ce traitement est pratiqué dans le cas des laits gras (10 à 25.10⁶ Pa à 60- 90°C), soit en phase montante de la pasteurisation, soit en phase descendante mais avec des risques de recontamination dans ce cas (**Jeantet, 2008**).

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

II.3.4. Traitement thermique

Le lait enrichi, éventuellement sucré, subi un traitement thermique. Le barème de traitement thermique le plus couramment utilisé est de 90- 95°C pendant 3 à 5 minutes (**Mahaut, 2000**). Cependant, une température élevée pendant un brève temps (100°C à 130°C pour 4 à 16 S) ou bien une ultra haute température (UHT) (140°C pour 4 à 16 s) sont parfois utilisés (**Sodini et al., 2004**). Ce traitement a de multiple effet sur la flore microbienne ainsi que sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles du lait. Tout d'abord, il assure l'innocuité du produit suite à la destruction des microorganismes pathogènes et indésirables (**Walstra, 2006**). Il crée des conditions favorables au développement des bactéries lactiques, et inactive des inhibiteurs de croissance telle que les lactopéroxydases et des enzymes telles que la lipase responsable de l'oxydation des lipides (**Walstra, 2006**). De même, il réduit les sulfures toxiques et entraine la production d'acide formique qui est un facteur de croissance pour *Lb. bulgaricus* (**Loones, 1994**). Le traitement thermique a également un effet sur la conformation tridimensionnelle des protéines, induisant la modification de leurs propriétés fonctionnelles. Il dénature la majorité des protéines du lactosérum (85%), la résultante est l'association de la caséine κ et de la β - lactoglobuline via un pont disulfure. Des liaisons entre les caséines et l' α -lactalbumine sont également engendrés (**Mahaut, 2000 ; Sava et al., 2005**).

Au niveau rhéologique, ces modifications se traduisent par une amélioration après fermentation de la fermeté des gels (**Jeantet et al., 2007**). De plus le traitement thermique entraine une production plus importante de l'acétaldéhyde, le composé responsable de l'arôme « yaourt » (**Ozer et Atasoy, 2002**).

Lorsque les laits ont été stockés au froid ou/et contiennent des substances à odeurs désagréables, il est recommandé de compléter le traitement thermique par leur désaération (**FAO, 1995**).

II.3.5. 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 (**Lee et Lucey, 2010**).

L'incubation se fait à l'aide d'un levain comprenant exclusivement une ou plusieurs souches de chacune des bactéries spécifiques du yaourt: *St. salivarius* ssp. *thermophilus*, et *Lb.*

delbrueckii ssp. *bulgaricus* qui sont inoculés entre 2 et 5% dans le mélange laitier afin d'atteindre une population initiale de l'ordre de 10^7 UFC/ ml avec un ratio de 1 :1 (**Clark et Plotka, 2004**). Ces deux espèces bactériennes vivent en symbiose et en synergie, elles dégradent le lactose en acide lactique, entraînant une baisse du pH et la gélification du milieu avec des modifications structurelles irréversibles. En outre, ces bactéries produisent des composés carbonylés volatiles (l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne, l'acétate d'éthyle) et des exopolysaccharides qui participent, respectivement, à l'élaboration de l'arôme et de la texture des yaourts (**Ott et al., 2000**).

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

Le temps de fermentation se situe entre 3 et 7 h jusqu'à l'obtention d'une acidité finale de 0,9 à 1,2% en équivalent d'acide lactique (**Clark et Plotka, 2004**).

II.3.6. Conditionnement et stockage

II.3.6.1 Yaourt ferme (dit aussi en pot ou étuvé)

Le laitensemencé est rapidement réparti en pots (en verre, en carton paraffiné, en matière plastique) d'une contenance habituelle de 12,5 cl. Dans le cas des yaourts sucrés, aromatisés, aux fruits, à la confiture, etc., l'apport des additifs se fait avant ou après le remplissage des pots (**FAO, 1995**).

Après le capsulage (aluminium, carton paraffiné), les pots sont placés dans une étuve (à air chaud) ou parfois au bain-marie pour permettre la fermentation. L'acidification dépend de la température et de la durée d'incubation. L'incubation dure environ de 2 à 3 heures. Les pots sont maintenus dans l'étuve jusqu'à l'obtention d'une acidité de 0,75 (au minimum) à 1 %

environ d'acide lactique, soit 75 à 100° Dornic. A ce moment, le caillé doit être ferme, lisse et sans exsudation de sérum (FAO, 1995).

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

II.3.6.2 Yaourt brassé

Le laitensemencé est maintenu en cuve ou en tank à la même température que dans le cas des pots (entre 42 et 46 °C) jusqu'à obtention de l'acidité voulue. Celle-ci est souvent un peu plus élevée que pour le yaourt ferme: de 1 à 1,2 % d'acide lactique, soit 100 à 120 °Dornic. On procède alors au découpage et au brassage du caillé par l'un des procédés ci-après: agitation mécanique à l'aide d'un brasseur à turbine ou à hélice; passage du gel à travers un tamis; homogénéisation à basse pression (FAO, 1995).

Le brassage terminé, le caillé est immédiatement et rapidement refroidi à une température inférieure à 10 °C. Le brassage du caillé au cours de la réfrigération améliore l'onctuosité du produit. Le yaourt est ensuite conditionné en pots et conservé à +2 / +4 °C. L'addition éventuelle d'arômes, de pulpes de fruits, etc., se fait au moment du remplissage des pots. L'addition du sucre peut se faire avant incubation, à condition de ne pas dépasser 6 % afin de ne pas ralentir la fermentation. Pour conserver au yaourt brassé sa consistance semi-liquide, le mélange d'additifs (fruits + sucre) ne doit pas dépasser 15 %. (FAO, 1995).

II.4. Conservation des yaourts

II.4.1. Conditions et durée légale de conservation

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

Plusieurs techniques sont utilisées pour garder et améliorer la qualité du yaourt à savoir la congélation, l'utilisation du gaz, l'addition des préservateurs et la stérilisation par la chaleur mais la réfrigération reste toujours la méthode la plus connue pour contrôler l'activité métabolique des ferments et leurs enzymes dans le yaourt au cours du stockage (**Adam et Mass, 1999**).

II.4.2. Qualité du yaourt au cours de la conservation

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

II.4.2.1. Qualité physico-chimique

a. Post-acidification

La post-acidification a un effet négatif sur la qualité du yaourt et diminue la durée de conservation. Elle est étroitement associée à l'activité métabolique persistante des lactobacilles pendant le stockage à 4° C (**Béal et al., 1999**).

Le pH influe la flaveur et la texture finale du produit et reflète donc la qualité du produit final. Si la valeur de post-acidification est très basse, nous aurons un yaourt très acide avec des problèmes de séparation d'eau (synérèse), et si elle est haute, la flaveur sera affectée en raison d'un manque d'acidité (**Tamime et Robinson, 1999**).

Lb. delbrueckii ssp. *bulgaricus* et *St. thermophilus* sont responsable de la post-acidification du yaourt pendant le stockage au froid (**Donkor et al., 2006**).

b. Synérèse

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

c. Viscosité

La viscosité du yaourt diminue progressivement pendant le stockage. Cette diminution est due à l'augmentation du temps de stockage (**Shakeel Hanif et al., 2012**). Elle se change en

fonction de ferment utilisé grâce à leurs protéases ce qui implique le rôle des microorganismes en affectant la viscosité de yaourt (Olivera et al., 1996).

II.4.2.2. Qualité microbiologique

La qualité microbiologique du lait et les produits laitiers est influencée par la flore initiale du lait cru, les conditions de la transformation, et la contamination après le traitement thermique. Les microorganismes les plus souvent évoqués sont les psychrotrophes Gram négatives, les coliformes, les levures et les moisissures. En outre, diverses bactéries telle que *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, les souches pathogènes d' *E. coli* et les souches entéro-toxinogènes de *Staphylococcus aureus* peuvent également être trouvées en lait et produits laitiers. Actuellement, la maîtrise de ces bactéries pathogènes nécessite la mise en place d'un système de contrôle et de surveillance rigoureux (Roginski et al., 2003).

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

II.4.2.3. Qualités organoleptiques

a. Fermeté

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

b. Arôme

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

Le yaourt doit être consommé à environ 10°C, au dessous de cette température, le profil de la flaveur n'est plus apprécié à cause du froid, il est rapporté que tous les composants volatils présent dans le yaourt diminuent au cours du stockage à moins 8°C, au dessus de 10°C le produit perd sa fraîcheur (Gafaar, 1992).

c. Texture

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

d. Goût

La perte du goût du yaourt est le résultat du développement de l'acidité, l'oxydation de graisse ou la protéolyse des protéines (Shakeel Hanif et al., 2012). Les activités protéolytiques des bactéries lactiques peuvent avoir quelques effets nuisibles sur le lait fermenté. La production des peptides amers est en grande partie attribuée à la protéolyse par *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* pendant le stockage (Gürsoy et al., 2010).

I.5. Le yaourt et ses biens faits

Lors de la transformation du lait en yaourt, certains avantages apparaissent (Bronner et Pansu, 1999 ; Roudant et Lefrancq, 2005 ; Vierling, 2008):

- ✓ La caséine est partiellement hydrolysée, ce qui améliore la digestibilité ;
- ✓ La production de certaines vitamines du groupe B par les bactéries lactiques, l'apport vitaminiq ue complémentaire pouvant être de 1 à 20% ;
- ✓ L'acidité du yaourt favorise l'absorption intestinale du calcium et du fer;
- ✓ Par son pH, l'acide lactique inhibe le développement de germes pathogènes et constitue une protection du yaourt lui-même mais aussi du tube digestif du consommateur ;
- ✓ Les bactéries du genre *Lactobacillus* sécrètent du peroxyde d'hydrogène antiseptique pouvant être efficace *in vivo* ;
- ✓ La flore du yaourt exerce un effet bénéfique sur certains mécanismes immunitaires de tube digestive ;
- ✓ *Streptococcus thermophilus* peut empêcher l'implantation de certaines bactéries pathogènes dans l'intestin, telles que les salmonelles et les colibacilles.

Certaines vitamines, tel l'acide folique, sont consommés partiellement par les ferments, d'autres sont synthétisées, ces effets étant fonction des souches bactériennes. La teneur en vitamines les plus fragiles, C et B1, est diminuée par le chauffage et la présence d'oxygène, mais le pH acide favorise leur conservation. Toutefois la composition minérale et vitaminique globale des yaourts est légèrement plus élevée que celle du lait du fait de l'enrichissement par le lait sec et de la concentration du lait subie lors du chauffage (**Vierling, 2008**).

III.1. Introduction

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt, y , et des variables, x_i .

Avec les plans d'expériences on obtient le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Pour cela, il faut suivre des règles mathématiques et adopter une démarche rigoureuse. Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur. La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle d'espace expérimental et celle de modélisation mathématique des grandeurs étudiées (Goupy, 2006).

III.2. Notions utilisées aux plans d'expériences

III.2.1. Espace expérimental

Un expérimentateur qui lance une étude s'intéresse à une grandeur qu'il mesure à chaque essai. Cette grandeur s'appelle la réponse, c'est la grandeur d'intérêt. La valeur de cette grandeur dépend de plusieurs facteurs, Chacun de ces facteurs peut être représenté par un axe gradué et orienté (figure 05). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux niveaux notés -1 et +1 (Goupy, 2006). L'espace expérimental, est donc l'espace coincé entre deux axes représentant deux facteurs différents

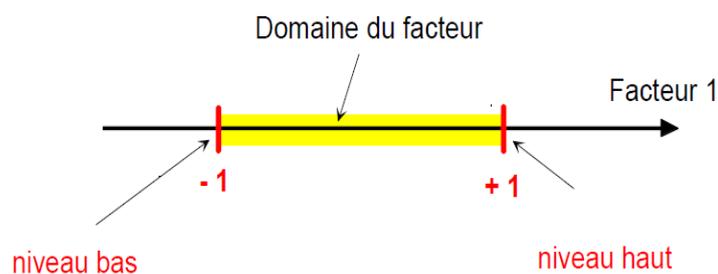


Figure 05 : Domaine de variation d'un facteur (Goupy, 2006).

III.2.2. Surface de réponse

A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse (figure 06).

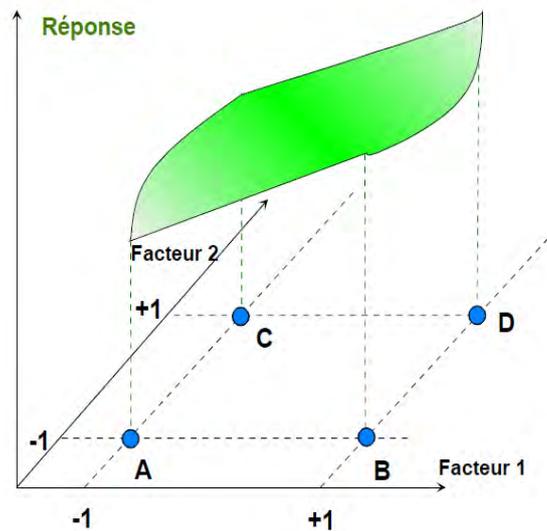


Figure 06: Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse (Goupy, 2006).

Cette surface de réponse est très importante puisque c'est elle qui représente le comportement de la réponse quand on fait varier les niveaux des facteurs. De sa connaissance on peut déduire les meilleurs ajustements des facteurs pour répondre à une question donnée. Les plans d'expérience permettent de trouver cette surface de réponse en effectuant un minimum d'essais et on obtenant une bonne précision sur sa localisation. La connaissance de cette surface permet de résoudre la plupart des problèmes qui se pose à l'expérimentateur (Goupy, 2005).

III.2.3. Notion de modélisation mathématique

III.2.3.1. Equation mathématique

En l'absence de toute information sur la fonction qui lie la réponse aux facteurs, on se donne a priori une loi d'évolution dont la formulation la plus générale est la suivante :

$$Y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)$$

Cette fonction est très générale et il est d'usage d'en prendre un développement limité de la série de **Taylor-Mac Laurin**, c'est-à-dire une approximation. Si les dérivées peuvent être considérées comme des constantes, le développement précédent prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_{ij} + \sum a_{ii} x_i^2 + \dots$$

Où :

- y est la grandeur à laquelle s'intéresse l'expérimentateur ; c'est la réponse.
- x_i représente un niveau du facteur « i ».
- x_j représente un niveau du facteur « j ».
- a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} sont les coefficients du polynôme (**Goupy et Creighton, 2006**).

III.2.3.2. Erreur

L'erreur est la variation inexplicable dans un ensemble d'observation. On distingue deux types d'erreurs: erreur aléatoire (Random error) et l'erreur de manque d'ajustement (Lack of Fit Error). L'erreur aléatoire, appelée aussi erreur expérimentale, est une erreur due à la variation naturelle dans un processus. L'erreur de manque d'ajustement est une erreur qui se produit lorsque l'analyse omet un ou plusieurs termes importants ou des facteurs du modèle mathématique (**Goupy et Creighton, 2006**).

III.2.3.3.p-value

Le p-value est la probabilité qu'un coefficient soit négligeable. On calcule cette p-value à partir du rapport du coefficient à son écart-type (t de Student). (**Goupy et Creighton, 2006**)

III.2.3.4. Coefficient de détermination R^2

Le R^2 est une mesure de la qualité du modèle. S'il est égal à 1, le modèle permet de retrouver la valeur des réponses mesurées. S'il est égal à 0, le modèle n'en dit pas plus que la moyenne des réponses. Dans la pratique, il est difficile d'indiquer la valeur d'un bon R^2 car les valeurs varient beaucoup d'une discipline à l'autre (**Goupy et Creighton, 2006**).

III.3. Types de plans d'expériences

Il existe plusieurs types de plans d'expériences qui permettent de s'adapter à la plupart des situations (**Goupy, 2006**) :

- ✓ Les plans factoriels complets ;
- ✓ Les plans factoriels fractionnaires ;
- ✓ Les plans de Plackett et Burman ;
- ✓ Les plans Taguchi ;
- ✓ Les plans pour surfaces de réponses ;
- ✓ Les plans de mélanges ;
- ✓ Les plans complètement randomisés ;
- ✓ Les plans des blocks randomisés ;
- ✓ Les plans optimaux ;
- ✓ Les plans pour simulations numériques ;
- ✓ Les plans booléens.

Le bon choix d'un plan expérimental maximise la quantité d'information qui peut être obtenue pour un effort expérimental donné. Le choix d'un plan d'expérience dépend des objectifs de l'expérience et du nombre de facteurs étudiés, selon les objectifs expérimentaux rencontrés (**Sado et Sado, 2000**).

III.3.1. Les plans pour surface de réponse

Les plans du second degré ou plans pour surfaces de réponse permettent d'établir des modèles mathématiques du second degré. Ces plans sont utiles à chaque fois que l'on se trouve près d'un maximum ou d'un minimum. Il existe plusieurs types de plans du second degré dont on s'intéresse au modèle de Box Behnken.

III.3.1.1. Le modèle Box-Behnken

Le modèle Box-Behnken est un modèle factoriel fractionnaire à trois niveaux développée par Box et Behnken (**Box et Behnken, 1960**). Le modèle peut être considéré comme une combinaison entre un modèle factoriel à deux niveaux et un modèle à blocs incomplets. Dans chaque bloc, certains facteurs sont soumis à toutes les combinaisons du modèle factoriel, tandis que les autres facteurs sont maintenus à leurs niveaux centraux.

Le Box-Behnken est un bon modèle pour la méthodologie nommée « surface de réponse », il permet (**Ferreira et al., 2007**):

- ✓ l'estimation des paramètres du modèle quadratique ;
- ✓ la détection des lacunes d'ajustement du modèle ;

✓ l'utilisation des blocs.

Le modèle Box-Behnken offre une alternative économique par rapport au modèle composite centrale, car le nombre des niveaux des facteurs est inférieur à celui de la composite centrale et ne contient pas des niveaux extrêmement hauts ou des niveaux extrêmement bas, cette approche a été largement utilisée dans les processus d'optimisation des conditions de fermentation, il a été aussi utilisé pour la production des enzymes, la production d'autres métabolites, la production de spores et la production de biomasse, (**Yu et al., 1997 ; Sunitha et al., 1998 ; Sadhukan et al., 1999 ; Hujanen et al., 2001 ; Park et al., 2002**).

II. Matériels et ***méthodes***

II.1. Matériel

II.1.1. Le Lait : Au cours de notre étude, nous avons utilisé deux types de lait :

- ✓ Le lait écrémé en poudre, fourni par l'unité laitière IGILAIT de Jijel, utilisé pour l'étude du pouvoir aromatisant et protéolytique des bactéries lactiques ;
- ✓ Le lait entier de label « NESPRAY », utilisé pour l'étude du pouvoir acidifiant, pouvoir aromatisant, mesure de la viscosité ainsi que pour l'essai de production du yaourt.

II.1.2. Les Ferments: Trois ferments thermophiles mixtes locaux codés FTM 1, FTM 2 et FTM 3 ont été utilisés. Ils nous ont été fournis par le laboratoire de biotechnologie, environnement et santé de l'université de Jijel. La composition des ferments thermophiles est la suivante :

- ✓ **Ferment thermophile mixte FTM 1:** *Streptococcus thermophilus* R15 (Raib traditionnel) et *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* BB5 (Beure de Brebis traditionnel) ;
- ✓ **Ferment thermophile mixte FTM 2:** *St. thermophilus* BT3 (Beure Traditionnel) et *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* BB5 (Beure de Brebis traditionnel);
- ✓ **Ferment thermophile mixte FTM 3:** *St. thermophilus* BB6 (Beurre de Brebis traditionnel) et *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* BB5 (Beurre de Brebis traditionnel).

Un ferment lactique thermophile commercial utilisé pour la fabrication du yaourt (ST-M6 CHR HANSEN) nous a été fourni par l'unité laitière IGILAIT, Jijel.

II.1.3. Les souches indicatrices : Il s'agit de huit souches indicatrices représentées par les espèces suivantes :

- Listeria monocytogenes* ATCC 25922 ;
- Klebsiella oxytoca* ATCC 25922 ;
- Escherichia coli* ATCC 25922 ;
- Bacillus subtilis* ATCC 21332 ;
- Staphylococcus aureus* ATCC25923 ;
- Salmonella* sp ;
- Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ;
- Acinetobacter baumannii* ATCC19606.

II.1.4. Les antibiotiques : Pour étudier le comportement des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques, dix disques (Institut Pasteur d'Alger) sont utilisés pour réaliser un antibiogramme sur milieu solide, il s'agit de Pénicilline G 6µg, Spiramycine 100µg, Chloramphénicol 30µg, Tobramycine 10µg, Lincomycine 15µg, Ciprofloxacine 5µg, Tétracycline 30µg, Amikacine 30µg, Colistine Sulfate 50µg, et Céfoxitine 30µg.

II.1.5. Les milieux de culture : Au cours de cette étude, nous avons utilisé ce qui suit:

- ✓ **Les géloses :** MRS (de Man-Rogosa et Sharp), milieu au triglycéride, gélose Mueller-Hinton, gélose hypersaccharosé, gélose AB, gélose nutritive, VRBL, OGA.
- ✓ **Les bouillons :** bouillon MRS, bouillon MRS additionné du lait écrémé, bouillon nutritif, eau peptonée exempte d'indole, eau peptonée alcaline, Giolitti Contonii
- ✓ **Autres milieux:** milieu MEVAG au triglycéride.

II.1.6. Les produits chimiques et réactifs : Les produits chimiques et réactifs utilisés au cours de cette étude sont les suivants:

- ✓ **Les colorants :** Violet de Gentiane, fuschine, cristal violet, phénolphtaléine à 1% ;
- ✓ **Les acides et bases :** La soude domnique N/9, l'acide sulfurique concentré (1N), NaOH (5N) ;
- ✓ **Les réactifs et Tampons:** Réactifs de Vogues Proskauer (VPI et VPII), TCA 12%, réactif de Kovacs, Tampon phosphate de sodium (50mM) ;
- ✓ **Alcool et autres produits chimiques :** Ethanol, lugol, sucres (glucose, saccharose), Trypsine, phénol à 80% , solution de permanganate de potassium (KMnO₄) 0.1N, sulfate de zinc, solution d'hydroxyde de barium à 0.3 M, sulfate de sodium, chlorure de mercure, chlorure de sodium, acétaldéhyde ;
- ✓ **Acides aminés et enzymes :** L- tyrosine, D-L arginine, glycine, tryptophane, phénylalanine, cystéine et L-proline, trypsine.

✓ **II.1.7. Appareillage :** L'appareillage utilisé est le suivant :

- ✓ Autoclave (Shiavax Electronic) ;
- ✓ Bain Marie (Gerhardt Bonn, Memmert) ;
- ✓ Balance (KERN EMB 600-2) (ANDGULF) et balance analytique (Kernals 220.4N) ;
- ✓ Centrifugeuse électrique (Hettich) ;
- ✓ Etuves (Memmert) ;

- ✓ Micropipettes (Microlit) ;
- ✓ Microscope optique (Motic) ;
- ✓ pH mètre (Hanna pH 211) (inolable) ;
- ✓ Congélateur (ProfiForst) ;
- ✓ Spectrophotomètre (Ultrospec 100 pro) (SHIMADZU);
- ✓ Vortex électrique (MS2 Minishaker, VWR VV3) ;
- ✓ Viscosimètre (HAAKE Viscotester 1plus).

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation des ferments thermophiles

II.2.1.1. Revivification, vérification de la viabilité des ferments et examen microscopique

Les ferments sont cultivés sur bouillon MRS et incubés à 42°C, le développement des bactéries se traduit par un trouble et une pastille blanche au fond des tubes.

La viabilité des souches est vérifiée sur gélose MRS. Les boîtes de Pétri contenant la gélose MRS préalablement coulée et solidifiée sont ensemencées par stries, l'incubation est faite à 42°C pendant 24h. La viabilité se traduit par l'apparition de petites colonies translucides, blanchâtre de petites tailles. Le ferment est considéré comme indemne de contaminants s'il n'y a aucune autres formes de colonies sur le même milieu (**Idoui et al., 2009**).

Chaque culture a été soumise à une observation microscopique. Cette observation directe permet d'examiner la morphologie et la structure des cellules afin de distinguer les coques des bacilles, vérifier la pureté d'un ferment et détecter une contamination éventuelle par des micro-organismes morphologiquement différents et /ou par des bactéries Gram-négatif et le mode de regroupement, même réaliser des comptages (**Béal et al., 2008**). La technique de coloration de Gram est citée dans *l'annexe III*.

II.2.1.2. Courbe de croissance des ferments lactiques

Chaque volume adéquat du bouillon MRS est ensemencé par un des ferments lactiques (FTM 1, FTM 2, FTM 3, ST-M6) à raison de 1% (des tubes de 3ml chacun). La densité optique est mesurée à 600nm après 0h, 2h, 4h, 20h, 24h d'incubation à 42°C.

II.2.1.3. Viabilité des ferments sur lait

La viabilité des ferments est déterminée en mesurant le nombre de cellules viables pendant le temps d'incubation en utilisant la cellule Malassez. Ce test est réalisé en même temps que la détermination de l'activité acidifiante sur lait entier « NESPRAY » après 0h, 2h, 4h, et 24h d'incubation à 42°C.

Pour se faire du lait est préparé à raison de 12% dans de l'eau distillée, répartis sur des flacons stériles puis stérilisé. Pour chaque ferment, trois doses (1%, 2% et 3%) sont utilisées pour ensemenecer le lait. La technique de la micro-dilution a été utilisée (10^{-8}) pour suivre le nombre de cellules au cours de la fermentation lactique.

Le nombre des cellules viables est déterminé selon l'équation suivante donnée par **Bonnefoy et al. (2002)**:

$$N = n_{\text{moy}} \cdot n \cdot 10^3 / V_{\text{tot}}$$

Où :

n_{moy} : nombre moyen des cellules par rectangle.

n : nombre de volumes unitaires contenus dans le volume total de la cellule correspondant aux « rectangle » ou « aux carrés » du quadrillage.

$V_{\text{tot}} = p \times s$: volume total de la cellule de comptage (mm^3).

N : nombre de microorganisme par ml.

II.2.2. Aptitudes technologiques des ferments thermophiles

II.2.2.1. Aptitude acidifiante

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acide lactique produit.

a. Détermination de l'acidité dornic

On commence par la préparation de lait entier à 12% dans des flacons de capacité de 250ml. Après stérilisation et refroidissement à la température d'ensemencement, chaque tube est ensemenecer par l'un des ferments à raison de 1%, 2% et 3%. Après incubation à 42°C, à un intervalle du temps 0h, 2h, 4h et 24h; 10ml du lait est prélevé puis titrer par la soude Dornic (N/9) en présence de 5 gouttes de phénolphtaléine, jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistant au moins 10 secondes (**Larpen, 1997**).

L'acidité est déterminée par la formule : Acidité (°D) = $V_{\text{NaOH}} \times 10$

Où :

V_{NaOH} : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait.

b. Mesure du pH

Le pH est déterminé par immersion de l'électrode du pH-mètre (HANNA pH 211) dans les échantillons à température ambiante après 0h, 2h, 4h et 24h d'incubation à 42°C du laitensemencé et lecture de la valeur affichée sur écran (**Al-Otaibi, 2009**). L'expérience est indépendamment répétée deux fois.

Le pH est déterminé à chaque fois qu'on procède au dosage de l'acide lactique.

II.2.2.2. Aptitude protéolytique

a. Sur bouillon nutritif

Des tubes contenant le bouillon nutritif additionnés de lait écrémé stérile à 12% (1v/10v) sontensemencés par les ferments, puis incubés à 42°C pendant 24h. Le pouvoir protéolytique se traduit par l'apparition d'un précipité blanc.

b. Sur milieu A/B

Après avoir coulé et solidifier le milieu A/B, des puits sont confectionnés, le fond de chaque puits est soudé par le même milieu. Après solidification complète, chaque puits reçoit 25µl d'une culture jeune d'un ferment et incubé à 42°C pendant 24h. Le caractère protéolytique est estimé par mesure des halos jaune autour de chaque puits.

En parallèle, la trypsine est utilisée comme témoin positif à des concentrations de 0.0002 g/ml, 0.0005 g/ml, 0.001g/ml, 0.01g/ml, 0.05g/ml et 0.1g /ml.

La protéolyse est révélée par des zones claires autour des puits. L'activité protéinasique est déterminée en mesurant le diamètre de ces zones obtenues. Elle est exprimée en unité trypsique/ml (**Roudj et al., 2009**).

c. Détermination des produits de l'activité protéolytique par HPLC

La technique décrite par **Marathe et Ghosh (2009)** a été appliquée avec quelques modifications: 0.5 ml de chaque culture bactérienne jeune est ajouté à 0.5 ml de lait écrémé à

12% et 1 ml de tampon phosphate de Na (50 mM, pH 7), puis, le mélange est incubée à 42°C pendant 4 h et 24 h. La réaction est stoppée par addition de TCA à 12 % (1 ml).

Après un repos de 10min à 25°C, une centrifugation est réalisée à 8000g/10 min, le surnageant est utilisé pour l'analyse par HPLC selon les conditions suivantes :

- phase mobile : méthanol ;
- Colonne : C18 ;
- T° : 40°C ;
- Débit : 9.99 à 1 ml/min ;
- Temps : 40 min.
- Longueur d'onde 254nm.

Il est a noté que des étalons d'acides aminés sont utilisés, à savoir : L- tyrosine, D-L arginine, glycine, tryptophane, phénylalanine, cystéine et L-proline.

II.2.2.3. Aptitude lipolytique

a. Sur gélose au triglycéride

La lipolyse est mise en évidence sur gélose aux triglycérides. Cette dernière est coulée et solidifiée. Des disques de papier Wattman stérile sont déposés en surface de cette gélose, puis chaque disque reçoit 10µl d'une culture jeune. Après une incubation à 37°C pendant deux jours, la lipolyse est révélée par une zone d'éclaircissement entourée d'un dépôt autour des disques (Guiraud, 2003).

b. Sur milieu MEVAG au triglycéride

Ce milieu est obtenu en ajoutant le triglycéride à raison de 1%. Après solidification, chaque milieu estensemencé par piqueur centrale et incubé pendant 2 jours à 37°C.

La lipolyse est révélée par un développement des bactéries autour de la piqueur centrale avec un virage du milieu au jaune.

II.2.2.4. Aptitude texturante

a. Détection des colonies larges et gluantes sur gélose hypersaccharosée

Les ferments à tester sontensemencés en stries sur gélose hypersaccharosée déjà coulée et solidifier. Après incubation à 42°C pendant 24h, la production des exopolysaccharides se manifeste par l'apparition de colonies larges et gluantes (Leveau et al., 1991).

b. Production des Exopolysaccharides sur bouillon MRS

Des tubes contenant chacun 5 ml de bouillon MRS sontensemencés par 0,5 ml de l'un des ferment lactiques, l'incubation est réalisée à 42°C pendant 24h. Les résultats sont positifs s'il y a apparition d'un dépôt épais au fond de tube ou sur les parois.

c. Quantification de la production des exopolysaccharides

La quantification des exopolysaccharides (EPS) est réalisée par la technique décrite par **Mozzi et al. (2001)** : pour chaque ferment, 100 ml du bouillon MRS est inoculé par la culture à tester à raison de 1%. Après une incubation pendant 24h puis 48h à 42°C, la culture est centrifugée à 6000 rpm pendant 20min. A un volume de surnageant, deux volumes de l'éthanol à 4°C sont ajoutés, le tout est incubé pendant une nuit à 4°C.

Les précipités sont récupérés par centrifugation à 6000 rpm pendant 5min et resuspendus dans 2ml d'eau distillée. Le mélange précipité-eau est filtré sur un millipore de 0.22 µm de porosité.

Ensuite, 40µl du phénol à 80% et 2ml de l'acide sulfurique concentré sont ajoutés à chaque 800µl du filtrat suivi d'une agitation au vortex. En parallèle un blanc est préparé en remplaçant l'échantillon avec de l'eau distillée.

La lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 490nm (DO₄₉₀), les résultats sont exprimés en grammes des EPS par litre (g/L).

Le taux de sucre est déterminé en se référant à une courbe d'étalonnage tracé avec du glucose.

d. Mesure et suivie de la viscosité

La viscosité est mesurée à température ambiante à l'aide d'un viscosimètre de type HAAKE Viscotester1plus, pendant 0h, 1h, 2h, 3h et 4h d'incubation à 42°C. Le lait utilisé est un lait entier stérilisé « NESPRAY » reconstitué à 12% etensemencé par le ferment thermophile mixte à raison de 3%.

Le mobile utilisé pour la détermination de la viscosité est le numéro 4.

Pour mesurer la viscosité, nous avons appliqué une force de mouvement au laitensemencé en mettant en rotation le mobile N°4. La résistance au mouvement de rotation du mobile est enregistrée puis convertie en unité viscosimétrique.

II.2.2.5. Aptitude aromatisante

a. Recherche d'acétoïne

Ce test est réalisé sur le lait écrémé à 10% et le lait entier pour avoir l'effet de la matière grasse. Après une phase d'incubation à 42°C/ 24heures et vérification de la coagulation, cinq gouttes de solution Vogues-Proskauer VPI et le même volume de la solution VPPI est ajouté à chaque tube, suivie d'une agitation intense. Après un délai de 10 minutes, une coloration rose traduit la formation d'acétyl-méthylcarbinol.

Cette substance se transforme en acétoïne sous l'action de la soude (VPPI) et se combine avec l' α - naphthol(VPI) en donnant un complexe de couleur rouge indique la présence d'arôme (Idoui et Karam, 2008).

b. Recherche de l'acétaldéhyde par UV-visible

La concentration d'acétaldéhyde est déterminée comme décrit par **Robinson et al. (1977)** ; 50 g de yaourt liquide (l'un fabriqué à base du lait écrémé à 12% et l'autre à base du lait entier à la même concentration d'EST,ensemencé chacun par l'un des ferments étudiés) est mélangé avec 100 ml d'eau distillée, 20 ml de sulfate de zinc à 5% et 20 ml d'hydroxyde de barium à 0.3 M. Ce mélange est agité et dilué à 250 ml avec de l'eau distillée. Cette solution est centrifugée à 2,000g/min pendant 5 minutes, 1 ml de surnageant clair est mélangé à 1 ml de la solution de la fuchsine (0.04% fuchsine en 2% d' H₂SO₄) et 1 ml d'une solution préparée en utilisant 0.0354 g de sulfate de sodium et 100 ml d'une solution contenant le chlorure de mercure (2.72 g) et le chlorure de sodium (1.17g) . Ce nouveau mélange est laissé à l'obscurité pendant 25 min.

La lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 560 nm, les résultats sont exprimés en ml d'acétaldéhyde par gramme du yaourt (ml/g).

Une solution d'acétaldéhyde est utilisée pour préparer une courbe d'étalonnage.

II.2.2.6. Aptitudes antagonistique et effets des surnageants

a. Qualification du pouvoir antagonistique

Ce test consiste à étudier l'activité inhibitrice des ferments étudiés vis-à-vis des souches indicatrices. Il s'agit de huit souches : *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella oxytoca* , *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* . La méthode des disques décrite par **Tadesse et**

al. (2004) a été appliquée : elle consiste à inonder en surface le milieu Mueller - Hinton par la souche indicatrice (DO_{660} varie entre 0.08 et 0.1). Après incubation pendant 30 min à 37°C, des disques stériles (de 5 mm de diamètre) sont déposés à la surface de la gélose. Chaque disque reçoit 10 μ l d'une culture jeune d'un ferment. Une fois les boîtes sont séchées à température ambiante, elles sont incubées à 4°C pendant 4h, par la suite incubées à 37°C pendant 24h. L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques.

Les diamètres des zones d'inhibition qui apparaissent autour des disques sont mesurés.

L'activité inhibitrice du surnageant natif et celui ajusté à pH 7 a été également évaluée par l'application de la technique de diffusion sur gélose décrite par **Barefoot et Klaenhammer (1983)**: Des cultures bactériennes jeunes (ferments) de 18h sont soumises à une centrifugation à 6000 rpm/10min, ensuite, les surnageants sont filtrés sur un millipore de 0.22 μ m. Les filtrats ainsi obtenus sont divisés en deux volumes dont le premier est dit surnageant natif, et le deuxième est ajusté à pH 7 avec du Na OH (5N). Les boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive, préalablement coulées et solidifiées sont inondées par les souches indicatrices (chaque inoculum est standardisé entre 0.08 et 0.1 à DO_{660}), puis des puits 6mm de diamètre sont confectionnés, la base de chaque puits est bouchée par la même gélose. Chaque puits a reçu 50 μ l de surnageant. Après incubation à 37°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés.

b. Quantification de la production des métabolites antimicrobiens

Chaque ferment est ensemencé dans 100ml de bouillon MRS additionné du lait écrémé afin de favoriser la production des métabolites, puis incubé pendant 48 heures à 37°C. Lorsque la masse cellulaire recherchée atteint 0.05 – 0.10 g, 10 ml de chaque culture jeune est ensemencée dans 100 ml de bouillon MRS additionné du lait écrémé (12 %) puis incubée 24 heures à 37°C sans agitation. Les cultures sont ensuite centrifugées à 3000rpm pendant 15 min ; les surnageants sont utilisés pour la quantification des métabolites antimicrobiens (**Ogunshe et al., 2011**):

- Détermination de la concentration en acide lactique

La production de l'acide lactique est déterminée selon la méthode décrite par le comité des spécifications du codex des produits chimiques alimentaires (**CSFCCCFP, 1972**). Les

surnageant obtenus sont titrés par la soude 0.1 M en présence de 1ml de phénolphaléine. L'acidité titrable est calculée comme le pourcentage de l'acide lactique en utilisant la formule suivante :

$$\text{Acidité titrable} = V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times \text{ME} \times 100 / V_{\text{échantillon}}$$

Où :

V : volume (ml) ;

N : normalité ;

ME : facteur d'équivalence et chaque millilitre de NaOH 1N est équivalent de 90.08 mg de l'acide lactique.

- Détermination de la production d'H₂O₂

L'H₂O₂ produit est déterminé selon l'AOAC (Horwitz, 1980) ; 25 ml de surnageant est transféré dans des fioles de 150 ml, puis 25 ml de l'acide sulfurique (H₂SO₄) est additionné, l'ensemble est titré par une solution de permanganate de potassium (KMnO₄) 0.1N jusqu'à la décoloration de l'échantillon. La production d'H₂O₂ est calculée selon la formule suivante:

$$\text{Production d' H}_2\text{O}_2 = [V_{\text{KMnO}_4} \times N_{\text{KMnO}_4} \times \text{ME} \times 100] / [V_{\text{H}_2\text{SO}_4} \times V_{\text{échantillon}}]$$

Où :

V : volume (ml) ;

N : normalité ;

ME : facteur d'équivalence et chaque millilitre de KMnO₄ (0.1N) est équivalent de 1.701 mg d'H₂O₂.

- Détermination de la production de diacétyle

La détermination de la concentration de diacétyle produit par chaque ferment est réalisée selon la méthode décrite par le comité des spécifications du codex des produits chimiques alimentaires (CSFCCCFP, 1972) ; 25 ml de chaque surnageant est transféré dans des fioles de 150 ml, puis, 7.5ml de la solution hydroxylamine à 1M est ajouté. Le même volume de cette solution est versé dans une autre fiole de 150 ml pour la titration résiduelle. Trois gouttes de bleu de bromophénol sont ajoutées à chaque fiole. La titration s'est effectuée par du HCl (0.1N) jusqu'à l'apparition d'une couleur jaune-verdâtre. La concentration de diacétyle est calculée en utilisant la formule suivante:

$$\text{Production de diacétyle} = V_a - V_s \times \text{ME} \times 100 / V_w$$

Où :

V_a : volume (ml) de HCl 0.1 N utilisé pour la titration ;
 V_s : volume (ml) de HCl 0.1 N utilisé pour la titration résiduelle ;
 V_w : volume (ml) de l'échantillon utilisé ;
N : normalité ;
ME : facteur d'équivalence de HCl au diacétyl : 21.52 mg.

II.2.2.7. Résistance aux antibiotiques

Pour réaliser ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide décrite par **Idoui et al. (2007)** est appliquée : chaque inoculum bactérien standardisé à 0.08 et 0.1 (DO_{660}), a servi pour inonder la surface de la gélose MRS, puis, l'excès de l'inoculum est récupéré par une micropipette. Les boîtes sont laissées sécher à température de laboratoire. Les disques antibiotiques sont par la suite déposés en surface de la gélose.

La résistance des ferments est testée contre dix antibiotiques à savoir Pénicilline G 6 μ g, Spiramycine 100 μ g, Chloramphénicol 30 μ g, Tobramycine 10 μ g, Lincomycine 15 μ g, Ciprofloxacine 5 μ g, Tétracycline 30 μ g, Amikacine 30 μ g, Colistine Sulfate 50 μ g, et Céfoxitine 30 μ g. Après incubation à 42°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés.

Par convention, les mêmes auteurs ont considéré que pour un diamètre inférieur à 15mm, la souche est résistante (R) et pour un diamètre supérieur ou égal à 15mm la souche est sensible (S).

II.2.3. Optimisation de la fermentation lactique par le modèle de Box Behnken

Le modèle Box-Behnken (**Box et Behnken, 1960**) est une classe des modèles rotatoires ou presque rotatoires du second ordre. Il est basé sur des modèles factoriels incomplets de trois niveaux. Le nombre des expériences (N) nécessaire pour le développement du modèle Box-Behnken est défini comme $N= 2k(k-1) + C0$, où, k est le nombre des facteurs et $C0$ est le nombre de points centraux.

Après l'identification des facteurs qui affectent la production d'acide lactique, le modèle de Box-Behnken est appliqué afin d'optimiser les principales variables. Ces facteurs sont représentés en trois niveaux codés par -1, 0 et +1 pour le minimum, moyenne et le maximum respectivement. Le Tableau 01 regroupe les facteurs utilisés ainsi que leurs niveaux.

Tableau 01: Les facteurs et leurs niveaux choisis pour l'optimisation

Variable	Code de variable	-1	0	+1
Température (°C)	X1	37.0	39.5	42.0
Extrait sec total (%)	X2	12.0	14.5	17.0
Taux d'ensemencement (%)	X3	3.0	6.0	9.0
St/Lb	X4	1.2/1	1.4/1.1	1.6/1.2

Afin de prédire le point optimal, une fonction polynomiale de second ordre a été élaborée. Elle permet d'étudier la relation entre les variables indépendantes et la réponse (la production d'acide lactique). La forme générale de l'équation polynomiale du second ordre est la suivante :

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Avec :

Y_i est la réponse ;

β_0 est la constante du modèle ;

X_i, X_j sont les variables indépendantes ;

β_i est le coefficient linéaire ;

β_{ij} est le coefficient d'interaction ;

β_{ii} est le coefficient quadratique.

L'analyse statistique du modèle est exécutée en analysant la variance (ANOVA). Cette analyse inclut le test de Fischer (signification du modèle globale), sa probabilité associée $p(F)$, le coefficient de corrélation R et le coefficient de détermination R^2 qui mesure la qualité d'ajustement du modèle de régression. Pour chaque variable, les modèles quadratiques sont représentés par les contours plot et les courbes de la surface de réponse (3D). Cette analyse est réalisée par le logiciel JMP 6 Discovery.

II.2.4 Fabrication du yaourt nature étuvé et évaluation de sa qualité

II.2.4.1. Fabrication du yaourt

La préparation de yaourt étuvé est réalisée à l'échelle de laboratoire en respectant le diagramme de fabrication d'un yaourt standard décrit par **Kadam et al. (2010)** avec une application des résultats de l'optimisation. La méthode de fabrication du yaourt nature étuvé est illustrée par la figure 07.

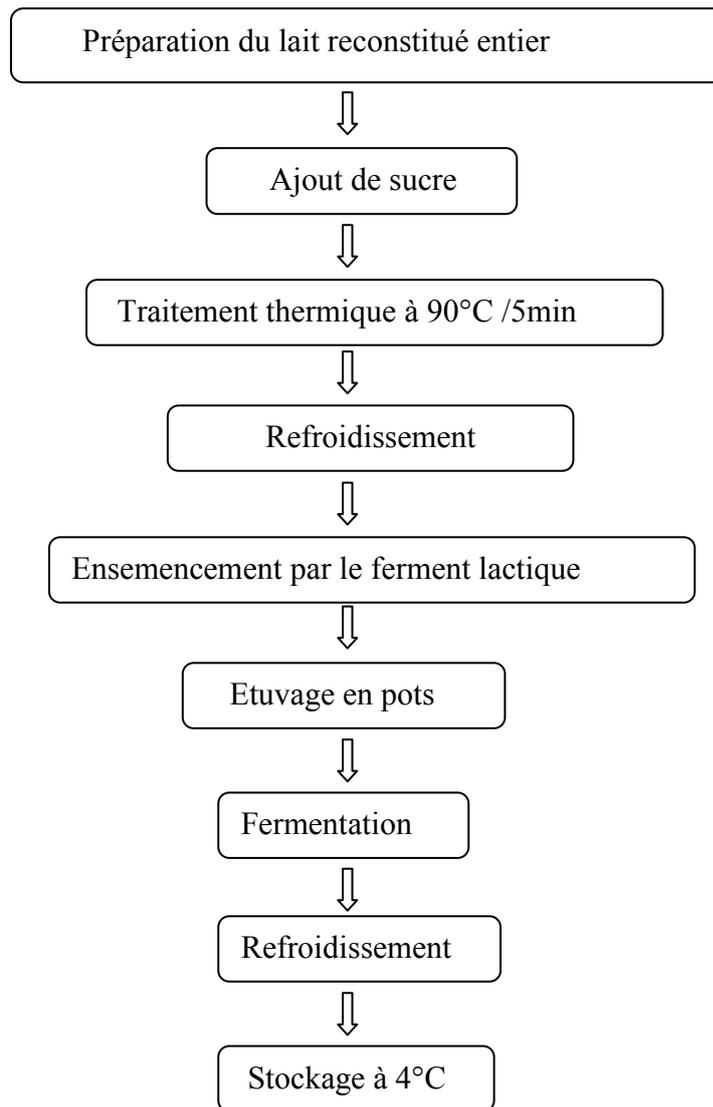


Figure 07: Diagramme de fabrication du yaourt nature étuvé (Kadam et al., 2010).

a. Préparation des cultures d’amorçage

Les cultures d’amorçage sont préparées par repiquage des cultures lactiques dans du lait entier stérile reconstitué à 14.5% pour le yaourt à base de ferment local et à 12% pour celui à base de ferment industriel , le premier incubé à 39°C et l’autre à 42°C pendant 6h jusqu’à la formation d’un gel.

b. Préparation du lait reconstitué et traitement thermique

Le lait utilisé est un lait entier de marque « NESPRAY », deux litre de lait sont préparés, un litre à 14.5 % et l’autre à 12% pour la fabrication de deux types de yaourt à base de ferment

local codé FTM 3 et à base de ferment industriel respectivement. Avant d'appliquer le traitement thermique à 90°C pendant 5 minutes une quantité de 5g du sucre est ajoutée à chaque échantillon de lait.

c. Ensemencement

Avant ensemencement, le lait reconstitué à 14.5% est refroidi à la température de 39°C, celui à 12% est refroidi à 42°C, ce sont les deux températures utilisées ultérieurement pour la fermentation. Le lait destiné à la fabrication de yaourt nature étuvé estensemencé avec le ferment local FTM 3 à raison de 9% et avec un rapport *St/Lb* de 1.37/1.1, l'autre estensemencé avec le ferment industriel ST-M6 à raison de 3%. Le mélange est conditionné dans des pots à 100 g de capacité (emballage de fabrication personnelle de pourtour (17,5 X 4) cm et un couvercle (6,3 X 6,3) cm (*Annexe VII*). Les deux produits sont étuvés pendant 6h à 39°C et 42°C.

d. Stockage des produits finis

Après 6 heures de fermentation, les deux types de yaourt sont refroidis puis conservés à 4°C pendant 15 jours.

II.2.4.2. Qualité du yaourt au cours de la conservation

a. Qualité physico-chimique

- Acidité, pH et synérèse

La post-acidification du yaourt entreposés à +4°C est suivie par la mesure du pH et de l'acidité pendant 15 jours de conservation.

Le volume du sérum trouvé à la surface du yaourt est mesuré durant 15 jours du stockage (**Koksoy et Kilic, 2004**).

- Détermination de la matière sèche

Pour la réalisation de cette manipulation, 10g de chaque échantillon est placé dans des creusets déjà séchés et tarés. Cette préparation est placée à 120°C. La matière sèche est déterminée par des pesées répétées jusqu'à avoir un poids constant. Le résultat est exprimé de la manière suivante (**Lecoq, 1965**):

$$MS (\%) = X/Y \times 100.$$

Où :

MS : matière sèche ;

X : poids de l'échantillon en gramme après étuvage ;

Y : poids de l'échantillon en gramme avant étuvage.

- **Détermination de la matière minérale**

Cette manipulation est réalisée de la même façon que pour la détermination de la matière sèche, sauf que l'incinération est réalisée dans un four à moufle réglé à 500°C. Le résultat est calculé de la manière suivante (**Lecoq, 1965**) :

$$\text{MM (\%)} = \text{X/Y} \times 100.$$

Où:

MM : matière minérale ;

X : poids de l'échantillon en gramme après étuvage ;

Y : poids de l'échantillon en gramme avant étuvage.

- **Calcul de la matière organique**

Elle est déterminée en se basant sur les résultats de la matière sèche et minérale en appliquant la formule suivante :

$$\text{MO (\%)} = \text{MS} - \text{MM}.$$

Où :

MO : matière organique ;

MS : matière sèche ;

MM: matière minérale.

b. La qualité microbiologique

➤ **Préparation des dilutions décimales**

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

➤ **Viabilité des bactéries lactiques**

Le nombre de cellules viables est calculé à partir de colonies appropriées obtenues après incubation sur milieu adéquat et exprimé en UFC/g. le premier dénombrement est effectué 24h après la fin de fermentation (analyse J1). Le taux de survie est calculé selon l'équation donnée par **Ustunol et Gandhi (2001)** :

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

➤ **Recherche et dénombrement de la flore de contamination**

Le contrôle microbiologique est réalisé selon les techniques décrites par **Guiraud (2003)** :

-Dénombrement des coliformes totaux et thermotolérants :Le dénombrement est réalisé sur gélose VRBL, par ensemencement en masse de 1ml de la dilution 10^{-3} pour les coliformes totaux suivi d'une incubation à 37°C pendant 24h et de la dilution 10^{-2} pour les coliformes thermotolérants suivi d'une incubation à 44°C pendant 24h. On compte toutes les colonies roses - rouges qui apparaissent après ce temps d'incubation.

- Dénombrement des levures et moisissures : Le dénombrement est effectué sur le milieu solide gélosé OGA préalablement coulé et solidifié. 1 ml de la dilution 10^{-3} est étalé en surface du milieu et les boîtes sont incubées pendant 3 à 5 jours à une température de 28°C. On compte toutes les colonies blanches sphériques et filamenteuses.

- Recherche de la flore indologène : La recherche de cette flore est réalisée par inoculation de 1ml de la dilution 10^{-3} dans le milieu eau peptonée exempte d'indole. Les tubes ensemencés sont incubés à 44°C pendant 24h. La production d'indole est révélée en ajoutant quelques gouttes du réactif de Kovacs par la formation d'un anneau rouge vif en surface.

- Recherche de *Staphylococcus aureus* : Le milieu Giolitti Contonii (9ml) est inoculé par 1g du yaourt puis incubé à 37°C pendant 24h. Après incubation et s'il y a un noircissement du milieu, la présence de *Staphylococcus aureus* est suspectée, on procède alors à un isolement sur gélose Baird Parker.

- Recherche de *Salmonella* : Un pré-enrichissement par ensemencement de 1g du yaourt dans 9ml du milieu eau peptonée alcaline a été réalisé. Après incubation à 37°C pendant 24h, la présence probable de salmonelle se traduit par un trouble du milieu. S'il y a le trouble, un isolement doit être pratiqué sur gélose Hecktoen.

c. Analyse sensorielle

Les tests sensoriels peuvent être divisés en deux catégories : affectifs et analytiques (**Meilgaard et al., 1999**). Les tests affectifs impliquent des consommateurs et leur perception d'acceptabilité. Les tests analytiques impliquent le recours à des panélistes formés dont les

réponses sont traitées comme des données instrumentales. La sélection des panélistes, leur formation et l'échelle d'évaluation adoptée sont des éléments clés de toute approche analytique descriptive.

Un groupe d'individus (généralement de 8 à 12) est utilisé pour l'analyse sensorielle descriptive afin d'avoir des résultats cohérents et représentatif (**Drake et al., 2003**).

La dégustation des deux yaourts étuvés nature préparés s'est déroulée dans une salle de laboratoire pédagogique de la faculté SNV, par un panel constitué de huit sujets (quatre femmes et quatre hommes âgés de 24 à 45 ans), ces sujets ont été sélectionnés d'après leur disponibilité et leur volonté à participer à ces essais ainsi que leur formation dans le domaine de la science alimentaire ou dans la biologie. Ces analyses sont effectuées le jour de la production (J1) et à la fin de la conservation du produit (J15).

Tous les échantillons sont retirés du réfrigérateur une heure avant l'analyse, chaque yaourt est présenté dans des pots de 50g et étiqueté avec un code de trois lettres YFL (yaourt au ferment local) et YFC (yaourt au ferment commercial)).

Les dégustateurs doivent individuellement évaluer chaque type du yaourt. Lorsqu'ils passent d'un échantillon à un autre, ils doivent se rincer la bouche avec de l'eau afin d'effacer le goût de l'échantillon précédent. Les fiches de dégustation sont reproduites en **annexe VIII**.

II.2.4.3. Analyse statistique des résultats

L'analyse des données expérimentales de l'étude de la qualité du yaourt au cours de la conservation est réalisée avec le logiciel XL STAT 2009. Les résultats obtenus sont soumis au test de Student (test d'égalité des espérances) ainsi qu'à l'analyse de variance (ANOVA : Analyse de Variance à un Facteur). A $p < 0,05$, la différence est considérée significative.

III. Résultats et ***discussion***

III.1. Etude des aptitudes technologiques

III.1.1. Confirmation de la viabilité et de la pureté des ferments thermophiles mixtes locaux

Les trois ferments locaux composés d'un rapport *Streptococcus/Lactobacillus* égale 1.2 /1 codés FTM 1, FTM 2 et FTM 3 cultivés sur le milieu MRS solide ont donné des colonies de couleur blanche crème et lisses avec un contour régulier. Dans ce contexte, il est important de noter que le ferment commercial codé ST-M6 utilisé ultérieurement comme référence, composé aussi d'un rapport *Streptococcus/Lactobacillus* similaire.

L'observation microscopique a montré que tous les ferments étudiés sont des ferments mixtes constitués d'une mixture de bacilles et de coques isolés ou en chaînettes. La coloration du Gram a montré que ces bactéries sont à Gram positif.

III.1.2. Croissance des ferments thermophiles mixtes sur bouillon MRS

Les résultats de la croissance des ferments thermophiles mixtes sur bouillon MRS pendant 24 h d'incubation sont illustrés par la figure 08.

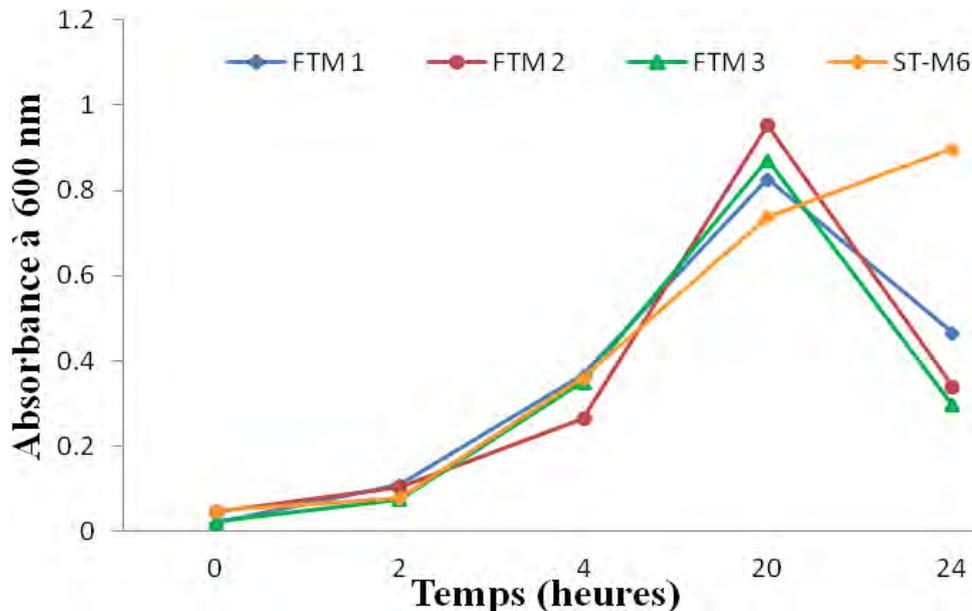


Figure 08: Croissance des ferments thermophiles mixtes sur bouillon MRS.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que nos ferments locaux et le ferment industriel suivent une cinétique de croissance semblable au cours des vingt premières heures d'incubation, cependant, après cette période d'incubation, la croissance de nos ferments a connu une chute remarquable comparativement à celle du ferment industriel.

III.1.3. Dénombrement des ferments thermophiles mixtes sur lait entier

Le point le plus important dans la fabrication du yaourt est de maintenir le nombre approprié des bactéries lactiques représentées par les genres *Lactobacillus* et *Streptococcus* et les caractéristiques de la flore microbienne (Oberg et Broadbent, 1993).

Les résultats du dénombrement des cellules viables des ferments thermophiles mixtes aux différents taux d'ensemencement sont illustrés par le tableau 02.

Tableau 02 : Nombre de cellules viables à différents taux d'ensemencement.

Nombre de ferments 10 ¹² cellules/ml	Taux d'ensemencement	Temps d'incubation (heures)			
		0	2	4	24
FTM 1	1%	0.03	0.242	0.776	0.466
FTM 2		0.046	0.19	1.006	0.3
FTM 3		0.046	1.216	3.772	0.766
ST-M6		4.7	16.7	12300	8666.6
FTM 1	2%	0.008	3.092	6.5	1.532
FTM 2		0.036	2.09	18.766	0.42
FTM 3		0.132	1.112	37.232	15
ST-M6		0.71	26.366	2100	13466.6
FTM 1	3%	0.026	3.776	28.066	2.866
FTM 2		0.146	2.81	35.432	7.766
FTM 3		0.382	4.22	411.66	65.66
ST-M6		0.912	32.5	2746.66	200000

L'analyse des résultats a montré que le nombre de cellules viables de tous les ferments thermophiles mixtes change au cours du temps d'incubation. Concernant nos ferments locaux, le nombre a augmenté progressivement durant les premières heures de croissance sur lait entier mais il a chuté au voisinage de 24 heures d'incubation. Cependant, le nombre de cellules viables du ferment industriel a augmenté progressivement jusqu'à la fin d'incubation.

Par comparaison entre les trois ferments locaux, nous avons constaté que le ferment FTM 3 montre la meilleure croissance sur lait entier donc une meilleure viabilité dont le nombre de cellules viables à 4 heures d'incubation avec un taux d'ensemencement respectif de 1%, 2% et 3% atteint 3.7×10^{12} , 3.7×10^{13} et 4.1×10^{14} cellules /ml.

Nous avons remarqué aussi que le nombre de cellules bactériennes viables varie proportionnellement avec le taux d'ensemencement où le nombre le plus élevé a été obtenu avec le taux d'ensemencement 3%. Nous avons constaté aussi une différence de viabilité avec le même pourcentage d'ensemencement, ce qui est reflété par un nombre de cellules viables différent.

Par ailleurs, le nombre de cellules viables du ferment commercial ST-M6 est largement supérieur à ceux de nos ferments, il atteint au bout de 4 heures d'incubation à 3% d'ensemencement 2.7×10^{15} cellules viables/ ml, cependant celui des ferments FTM 1, FTM 2 et FTM 3 et à même taux d'ensemencement atteint respectivement 2.8×10^{13} , 3.5×10^{13} et 4.1×10^{14} cellules viables/ml.

Il est à noter également qu'à 1% d'ensemencement, le nombre de cellules viables du ferment industriel est plus élevé que celui des ferments locaux à 3%, cette remarque nous a donné l'idée de jouer sur ce paramètre pour optimiser ultérieurement les caractéristiques de notre produit car selon **Birollo et al. (2000)**, les nombres optimaux et les proportions de bactéries de yaourt créent des caractéristiques thérapeutiques et influence l'acidité finale, la texture et les propriétés sensorielles du produit.

La diminution de la viabilité des bactéries après 24 heures d'incubation peut être le résultat de plusieurs facteurs, en effet, **Vali et al. (2006)** ont rapporté que la viabilité des bactéries du yaourt est affectée par le pH bas suite à la production d'acide lactique qui exerce une pression sur les cellules, les bactéries perdent leurs activités physiologiques entraînant ainsi une inhibition de la β - galactosidase et d'autres enzymes de la glycolyse. D'autre part, **Amrane (2001)** a rapporté que l'inhibition peut être due à l'épuisement de source carbonée.

D'autres chercheurs tels que **Somkuti et Steinberg (1997)** ont montré que le galactose est un facteur responsable de l'inhibition de la croissance de *St. thermophilus*. Ces résultats ont été confirmés par **Levander et Radstrom (2001)** qui ont montré que les souches de *St. thermophilus* sont considérées galactose (-) et elles ne peuvent fermenter le galactose.

III.1.4. Activité acidifiante

Le rôle principal de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* dans la fabrication du yaourt est d'acidifier le lait en produisant une grande quantité de l'acide lactique à partir de lactose.

L'activité acidifiante des trois ferments thermophiles mixtes locaux codés FTM 1, FTM 2 et FTM 3 a été étudiée à des taux d'ensemencement de 1%, 2% et 3% et elle a été aussi comparée à celle d'un ferment industriel codé ST-M6. Les résultats obtenus sont illustrés par les figures 09, 10, 11, 12 et 13.

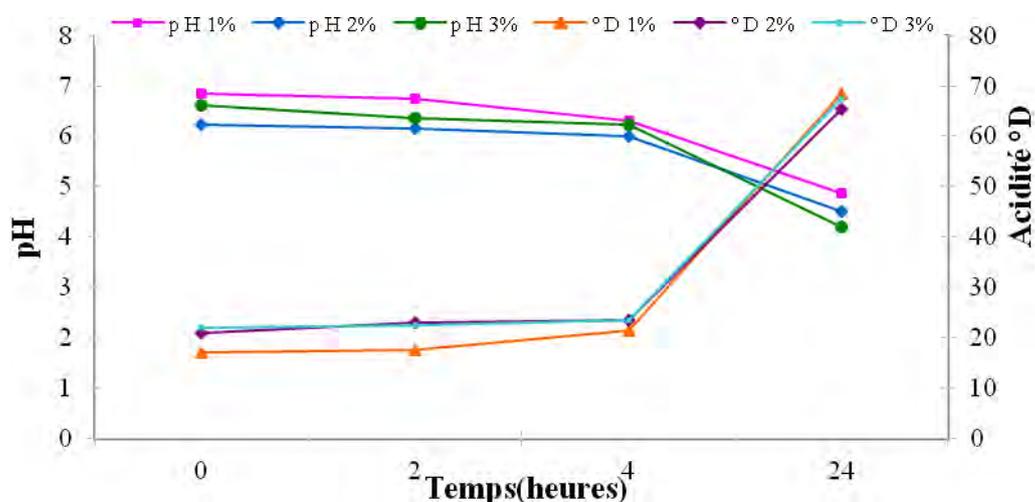


Figure 09: Evolution du pH et d'acidité à différents taux d'ensemencement par FTM 1.

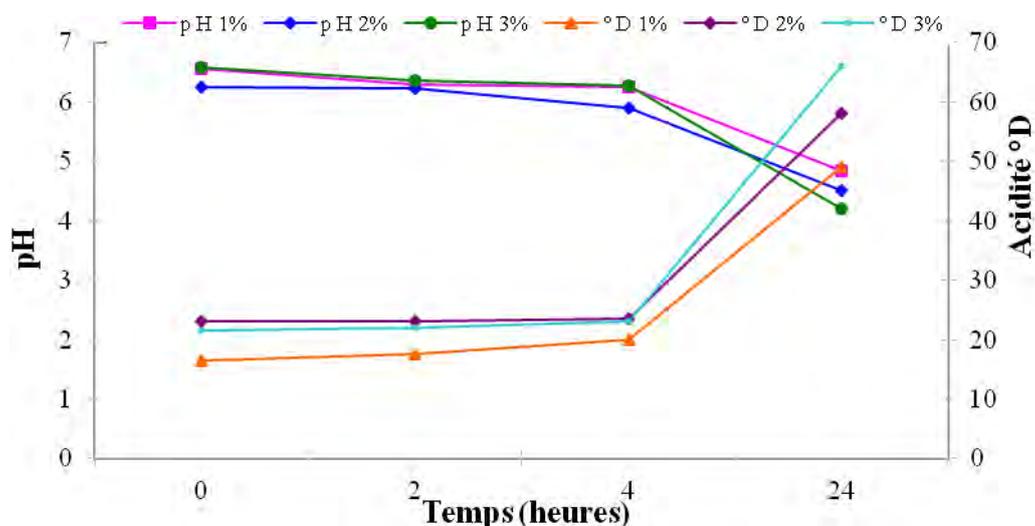


Figure 10: Evolution du pH et d'acidité à différents taux d'ensemencement par FTM 2.

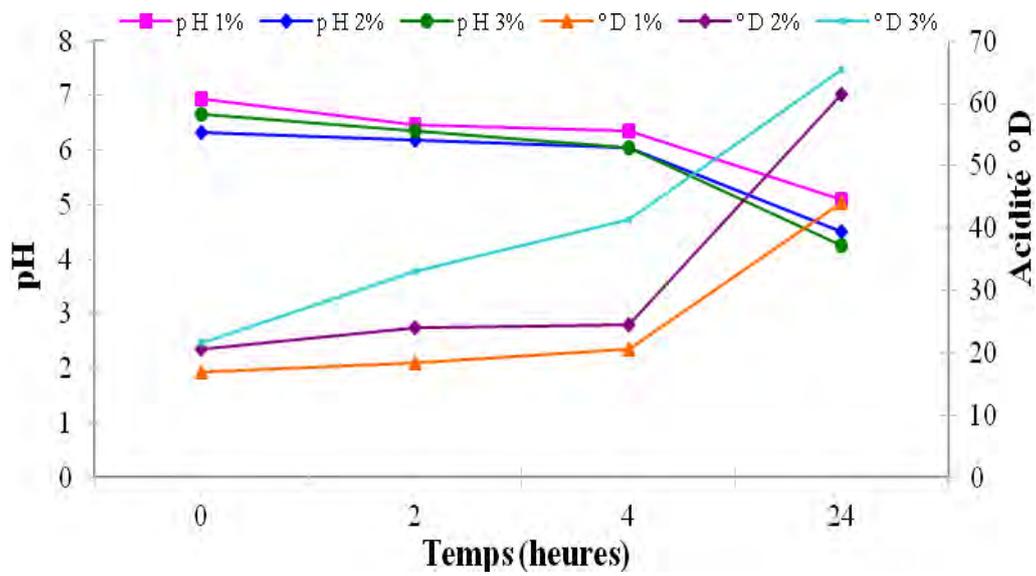


Figure 11: Evolution du pH et d'acidité à différents taux d'ensemencement par FTM 3.

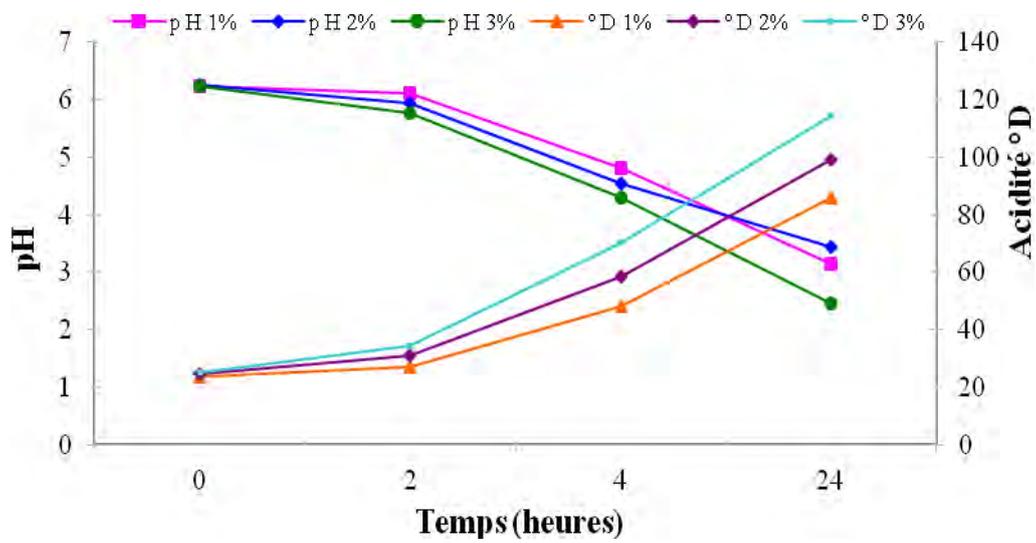


Figure 12: Evolution du pH et d'acidité à différents taux d'ensemencement par ST-M6.

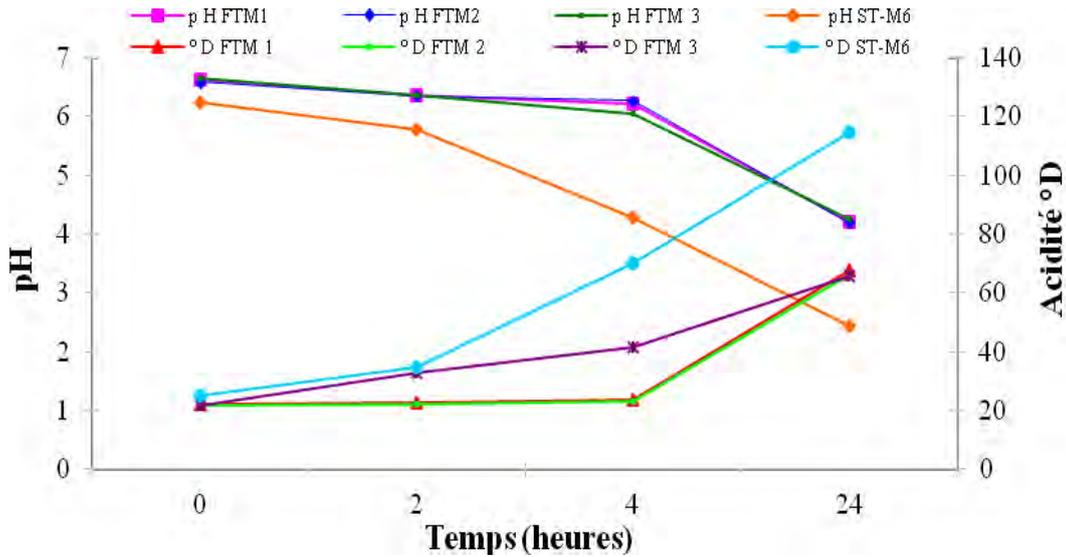


Figure 13: Evolution du pH et de l'acidité à 3% d'ensemencement.

Sur la base de ces résultats, il s'avère que tous les ferments lactiques possèdent un pouvoir acidifiant plus ou moins prononcé qui se traduit par l'abaissement du pH et l'augmentation de l'acidité.

D'après **Chamba (1990)**, une souche n'est acidifiante que si la diminution de pH égale au moins 0.5 unité en quatre heures pour les *St. thermophilus*. A cet égard, les ferments locaux étudiés sont considérés acidifiants.

Il est clair que les trois ferments locaux présentent des activités acidifiantes identiques mais faibles par rapport au ferment industriel qui est capable de former un gel à pH 4.29 au bout de 4 heures d'incubation.

L'analyse des résultats, nous laisse constater que la production de l'acide lactique et l'abaissement du pH est en corrélation avec le taux d'ensemencement, en effet, à un taux d'ensemencement de 3%, nous avons remarqué que la majorité des ferments mises au test démontrent un pouvoir acidifiant plus élevé comparativement à un seuil de 1% et 2% d'ensemencement.

Après 4heures d'incubation et à 3% d'ensemencement, la valeur du pH la plus basse est de 6.04 obtenue avec le laitensemencé par le ferment codé FTM 3 accompagné d'une production d'acide lactique de 4.15 g/L. Cependant avec les mêmes conditions, les ferments codés FTM 1 et FTM 2 produisent respectivement 2.35 et 2.3 g d'acide lactique/L de lait.

Il est intéressant de noter qu'après 24 heures d'incubation, le pH et l'acidité enregistrés avec les ferments locaux ont pris des valeurs proches, en effet, à 3% d'ensemencement, les valeurs du pH sont toutes au voisinage du pH4.2, en parallèle, les quantités d'acide lactique produites sont de 6.75, 6.60 et 6.55g/L pour FTM 1, FTM 2 et FTM 3 respectivement. En revanche, ces valeurs sont très éloignées de ceux obtenus avec le ferment industriel où nous avons enregistré un pH de 2.45 et une acidité de 11.45 g/L du produit (figure 12).

En comparant l'aptitude acidifiante de nos ferments à celle de ferment industriel, nous avons déduit que les ferments locaux utilisés à 3% d'ensemencement donnent les mêmes performances que ceux du ferment industriel utilisé à un taux d'ensemencement de 1% (figure 14).

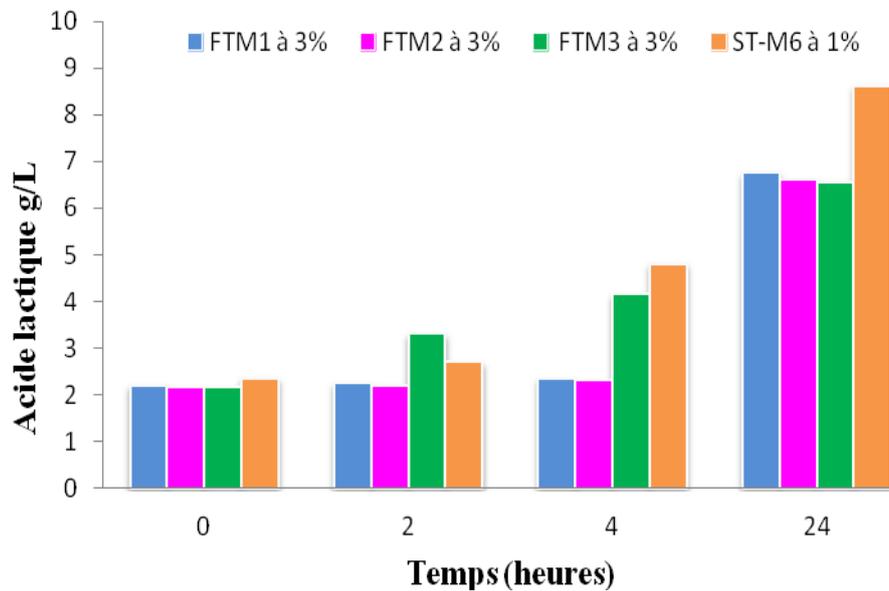


Figure 14: Production d'acide lactique par les ferments locaux (3%) et le ferment industriel (1%).

L'aspect des gels obtenus après 24 h d'incubation est illustré par la figure 15.



Figure 15: Aspect des gels formés après 24 heures d'incubation.

L'acide lactique est considéré comme le facteur déterminant le rapport entre *Streptococcus* et *Lactobacillus*. En effet, l'acidité du milieu inhibe la croissance de *St. thermophilus* alors que la croissance de *Lb. bulgaricus* ne s'arrête qu'autour de pH 4,4. Cependant, en fin de fermentation *St. thermophilus* dominant quasi systématiquement, elle est toujours le principal bénéficiaire de la proto-coopération dont un des effets est d'augmenter la biomasse finale par rapport aux monocultures (Courtin et al., 2002 ; Courtin et Rul, 2004).

D'après Gürsoy et al. (2010), le développement de l'acidité est important non seulement pour la fermentation du lait, mais également nécessaire pour un arôme, une texture et une saveur de yaourt bien-équilibrés.

D'après les résultats obtenus, le ferment thermophile mixte local codé FTM 3 est le plus performant en ce qui concerne la production de l'acide lactique.

III.1.5. Activité texturante

III.1.5.1. Recherche et quantification des EPS

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des EPS dans leur environnement comme le lait, ils jouent un rôle important pour la fermeté et la viscosité du yaourt, comme ils présentent des effets fonctionnels et bénéfiques pour la santé (Patricia et al., 2002; Welman et Maddox, 2003).

L'ensemble des résultats groupés dans le tableau 03 montre que nos ferments locaux sont capables de se développer sur milieu hypersaccharosé en formant des colonies à aspect plus ou moins gluants témoignant une production d'un agent épaississant, les exopolysaccharides (figure 17). La figure 16 confirme ce résultat où nous observons un précipité sur les parois des tubes.

En ce qui concerne le ferment industriel codé ST-M6, les résultats ont montré des colonies de forme normale sur gélose hypersaccharosé avec une faible précipitation sur la paroi de tube contenant le bouillon MRS. Cependant, la quantification des sucres a démontré une production considérable des EPS par ce ferment.

Tableau 03 : Production des exopolysaccharides par les ferments thermophiles mixtes.

Ferments	Observations	Evaluation	Quantité des EPS (mg/L)	
			24 h	48h
FTM 1	Colonies larges et gluantes	+	124	270
FTM 2	Colonies larges et gluantes	+	66	230
FTM 3	Colonies larges et gluantes	+	136	284
ST-M6	Colonies normales	-	114	248

D'après les résultats de la quantification des EPS, nous avons remarqué que la production de ces composés augmente avec le temps d'incubation, nous avons constaté également que la quantité la plus élevée est produite après 48h d'incubation qui est de l'ordre de 284 mg/L obtenue avec le ferment codé FTM 3, la plus faible est celle obtenue avec le ferment codé FTM 2 qui est de 230 mg/L.

Il est à noter que nos ferments, à l'exception de celui codé FTM 2 démontrent une production de quantités en EPS plus élevées comparativement à celle produite par le ferment industriel.

Aslim et al. (2006) ont rapporté que la production d'EPS par les deux bactéries qui composent le ferment, *Lactobacillus* et *Streptococcus* pendant leur croissance en lait étaient de 36 à 314 mg/L et de 24 à 140 mg/L respectivement. Par ailleurs, **Duboc et Mollet (2001)** ont rapporté que ces molécules sont généralement produites à des niveaux de 10 à 1000 mg/L. Ces faibles concentrations ne présentent pas un intérêt économique quoique elles sont considérées comme étant des agents texturants des laits fermentés (**Badel et Michaud, 2011**).

Broadbent et al. (2003) et **Vaningelgem et al. (2004b)** ont rapporté que la capacité des bactéries lactiques à produire les EPS dépend de la souche bactérienne, alors que la quantité

d'EPS produit est influencée par la composition du milieu (le rapport C/N), la phase et les conditions de la croissance (pH, température et temps d'incubation).

Petry et al. (2000) ont trouvé que la source d'hydrate de carbone (glucose ou le lactose) influence la production des EPS par *Lb. bulgaricus* CNRZ 1187 dans un milieu chimiquement défini. En outre, non seulement la nature de la source de carbone et parfois la combinaison de monosaccharides, mais également leur concentration peuvent avoir un effet stimulant sur la biosynthèse de EPS (**Degeest et De Vuyst, 2000**).

Degeest et De Vuyst (2000) ont montré que l'équilibre optimal entre le carbone et l'azote est absolument nécessaire pour atteindre un rendement élevé en EPS, ceci peut être expliqué par l'exigence des bactéries lactiques à une source d'azote pour la synthèse cellulaire, tandis que la source de carbone est principalement utilisée pour la génération d'énergie.

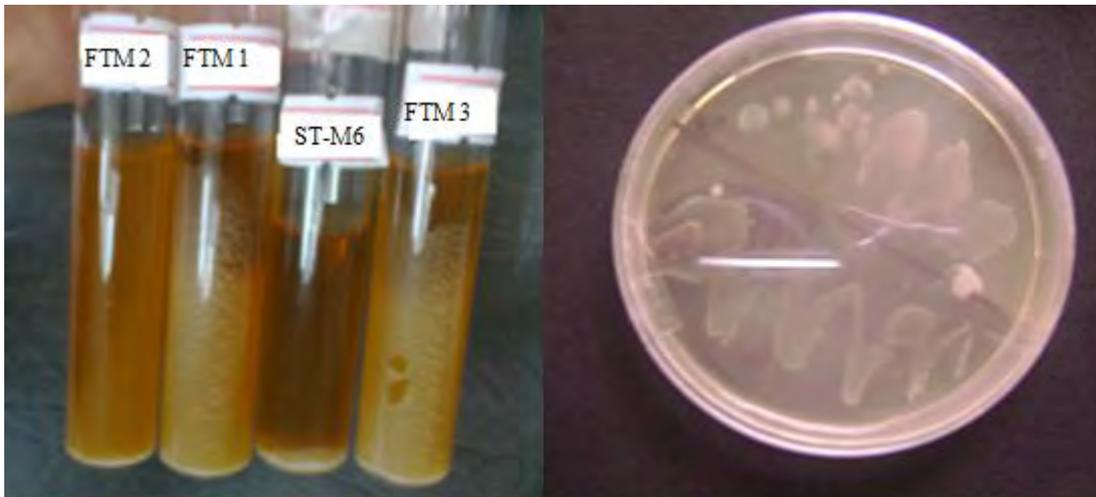


Figure 16 : Production des EPS sur bouillon MRS par les ferments lactiques. **Figure 17:** Aspect des colonies de FTM 3 sur gélose hyper-saccharosée.

Quelques chercheurs ont rapporté que certains yaourts produits par des bactéries lactiques productrices des EPS présentent une viscosité plus élevée et un moins degré de la synérèse comparée aux bactéries non productrice d'EPS (**Folkenberg et al., 2006**). En revanche, plusieurs études ont montré qu'aucune corrélation directe n'a été trouvée entre les quantités d'EPS produits et les propriétés rhéologiques des produits laitiers fermentés. En effet, les résultats de l'étude menée par **Purwandari et al. (2007)** ont montré qu'il y a une faible relation entre la concentration des EPS produits par *St. thermophilus* à différentes températures et la texture du produit fini.

Cependant, la rhéologie des produits laitiers fermentés dépend non seulement de la quantité des d'EPS présent, mais également de la structure et de la masse moléculaire du polymère et

l'état physique des protéines, en particulier les caséines (**Hassan et al., 2003 ; Petry et al., 2003**). En effet, beaucoup de chercheurs ont signalé que la formation et le développement des relations protéine-protéine est en partie empêchée par la formation excessive des filaments de polysaccharide attachés à la matrice de protéine et en réduisant de ce fait la fermeté du yaourt gélifiant (**Hassan et al., 2003**).

Marshall et Rawson (1999), ayant travaillé sur la production du yaourt, en utilisant des souches de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* avec et sans capacités de produire les exopolysaccharides ont prouvé que le niveau le plus bas d'EPS a été obtenu dans l'échantillon dans lequel des souches productrices des EPS ont été employées ensemble. D'autre part, **Bouzar et al. (1997)** ont montré que les cultures mixtes de souches non-visqueuses de *St. thermophilus* et différentes souches visqueuses de *Lb. bulgaricus* produisent les EPS à une vitesse plus rapide.

Les EPS jouent un rôle principal dans la production de produits laitiers fermentés, en particulier la production du yaourt (**Duboc et Mollet, 2001**). Ils contribuent de manière significative à la texture, la rhéologie, l'effet dans la bouche, la sensibilité gustative et la stabilité des produits finaux (**Welman et Maddox, 2003**).

Outre les propriétés technologiques, les EPS produits par les bactéries lactiques sont connus par leurs effets anti-inflammatoire, immuno-stimulateur, anti-tumorale et anti-ulcère et sont prétendus à abaisser le cholestérol sanguin et joue le rôle des prébiotiques (**Ruas-Madiedo et al., 2001; Vinderola et al., 2007; Salazar et al., 2008**).

En se basant sur les caractéristiques des EPS produits par les bactéries lactiques, ces molécules peuvent être employées en tant qu'additifs naturels dans la fabrication des produits alimentaires et peuvent devenir une alternative aux additifs d'origine chimique, végétal ou bien animal utilisés comme agents stabilisateur, épaississeur, gélifiant ou agents de liaison d'eau (**De Vuyst et Degeest, 1999**). Cependant l'implication de ces molécules à l'état pur n'a pas été encore étudiée et jusqu'à présent, les conclusions concernant leur rôle texturant sont indirectes (**Badel et Michaud, 2011**).

Enfin, il ressort que le ferment thermophile mixte local FTM 3 est doté d'une meilleure activité texturante.

III.1.5.2. Mesure et suivi de la viscosité

L'évolution de la viscosité des échantillons du laitensemencé par les ferments mixtes thermophiles pendant les quatre premières heures d'incubation est illustrée par la figure 18.

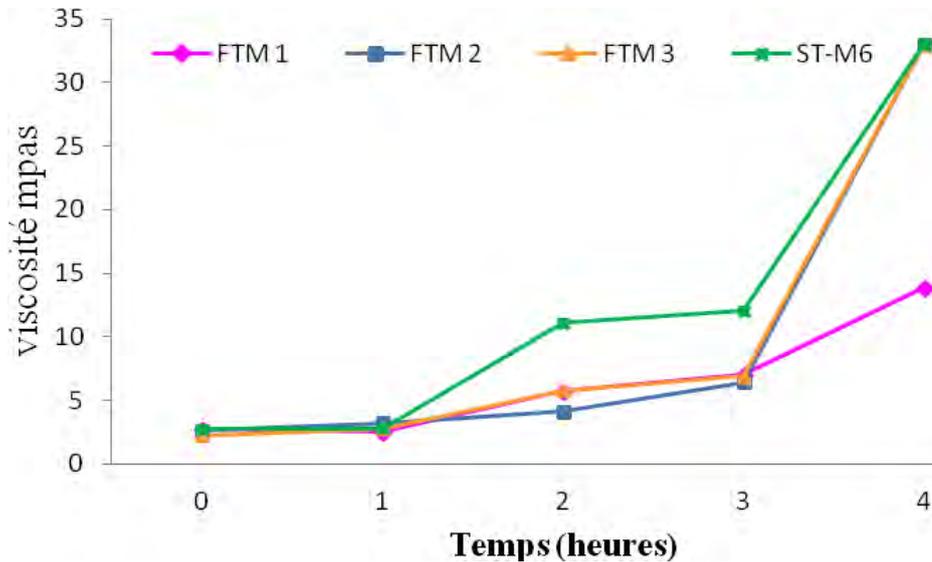


Figure 18 : Evolution de la viscosité pendant les premières 4heures d'incubation.

D'après les résultats obtenus, il ressort que l'évolution de la viscosité au cours de la croissance des ferments testés sur le lait entier démontre une similitude entre les ferments locaux pendant les trois premières heures d'incubation. Cependant, après 4 heures d'incubation, il est clair que la valeur de la viscosité du laitensemencé par le ferment FTM 1 est nettement inférieure (13.85 mpas) à celle des laitsensemencés par FTM 2 et FTM 3 dont les valeurs obtenues dépassent 33 mpas.

La viscosité du laitensemencé par le ferment industriel évolue d'une manière différente à celle des laitsensemencés par les ferments locaux où nous avons estimé une nette différence pendant la deuxième et la troisième heure d'incubation.

Il est à signaler qu'à viscosité élevée, le viscosimètre utilisé au cours de cette étude ne peut donner que la valeur 33 mpas, c'est pourquoi nous avons enregistré cette valeur à 4heures concernant FTM 2, FTM 3 et ST-M6.

Selon **Aslim et al. (2006)**, l'augmentation de la viscosité peut être liée aux changements des propriétés physiques des protéines du lait dues à la diminution du pH. D'autre part, **Andrew et al. (2011)**, ont corrélé cette augmentation à la masse moléculaire et la rigidité des EPS, cependant, l'incorporation de ces polymères dans les produits laitiers n'améliore pas la

stabilité et la viscosité de ces derniers. **Bouzar et al. (1997)** ont montré aussi que le yaourt qui contient le taux le plus élevé des EPS présente la plus faible viscosité.

Lors de la préparation des cultures mixtes pour la fabrication du yaourt, l'addition de deux souches visqueuses peut ne pas avoir un effet désiré pour le consommateur. En effet, **Marshall et Rawson (1999)** ont trouvé que la combinaison d'une souche de *St. thermophilus* non-visqueuse avec celle visqueuse de *Lb. bulgaricus* a un plus grand effet sur la viscosité du yaourt que lorsqu'ils ont combiné deux souches visqueuses.

Ces résultats ne permettent pas de décider sur le meilleur ferment à cause des limites de mesure du viscosimètre utilisé (valeurs inférieures à 33mpas), mais ces résultats ont montré que les deux ferments FTM 2 et FTM 3 sont les meilleurs.

III.1.6.Activité protéolytique

III.1.6.1.Qualification de la protéolyse

Dans les procédés de fermentation de lait, le système protéolytique des bactéries lactiques joue un rôle principal parce qu'il permet à ces bactéries de se développer, s'assurant de ce fait une fermentation réussie. D'après les observations des figures 19 et 20, il apparaît clairement que les ferments lactiques étudiés sont dotés d'un fort pouvoir protéolytique qui se manifeste par un dépôt blanc sur bouillon nutritif additionné du lait écrémé et par l'apparition d'un halo jaune autour des puits sur milieu AB.

Les différentes concentrations de la trypsine que nous avons utilisée ont montré une activité protéolytique élucidée par des zones de protéolyse autour des puits sur la gélose AB.

Les résultats de l'activité protéolytique des ferments lactiques mixtes et ceux de l'activité trypsique sur milieu AB sont résumés dans le tableau 04.

Tableau 04: Résultats de la protéolyse des ferments thermophiles mixtes et l'activité trypsique sur milieu AB.

Ferments	Observation	Diamètre (mm)
FTM 1	Halo jaune et croissance	23.5
FTM 2	Halo jaune et croissance	21.5
FTM 3	Halo jaune et croissance	22.5
ST-M6	Halo jaune et croissance	14.5
Trypsine (mg)		
0.2	Halo Clair	07
0.5	Halo Clair	07
1.0	Halo Clair	09
10	Halo Clair	14
50	Halo Clair	18
100	Halo Clair	21

Vuillemand (1986) a rapporté que la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre 5 et 15 mm. Par comparaison à cette donnée bibliographique, tous les ferments sont considérés protéolytiques dont les diamètres des zones de protéolyse varient entre 14.5 et 23.5mm.

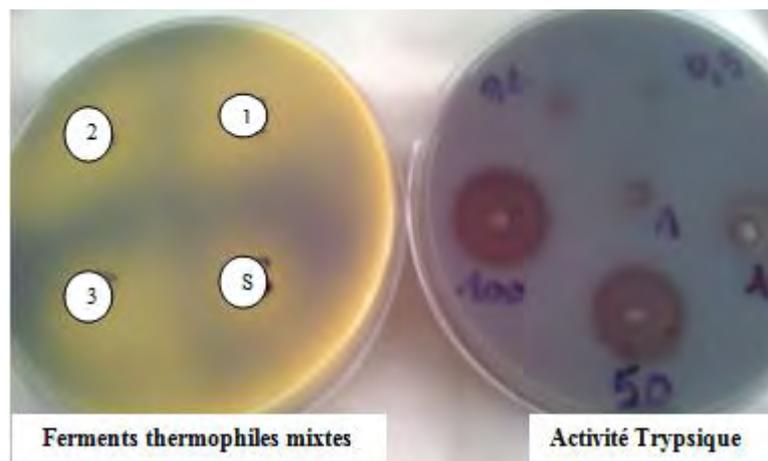


Figure 19: Activité protéolytique des ferments et activité trypsique sur milieu AB.

Il est à noter que l'activité protéolytique des ferments locaux est comparable mais supérieure à celle du ferment industriel, mais il faut signaler que le ferment local FTM 1 possède un pouvoir plus élevé qui s'est traduit par un diamètre de protéolyse de 23.5 mm.

Lorsque nous avons comparé les diamètres de zones de protéolyse des ferments lactiques à ceux de l'activité de l'enzyme pure, la trypsine, nous avons conclu que nos ferments locaux présentent des activités protéinasiqes supérieur à 0.1U trypsique. Par ailleurs, le ferment commercial montre une activité protéolytique cernée entre 0.01 et 0.05U trypsique.

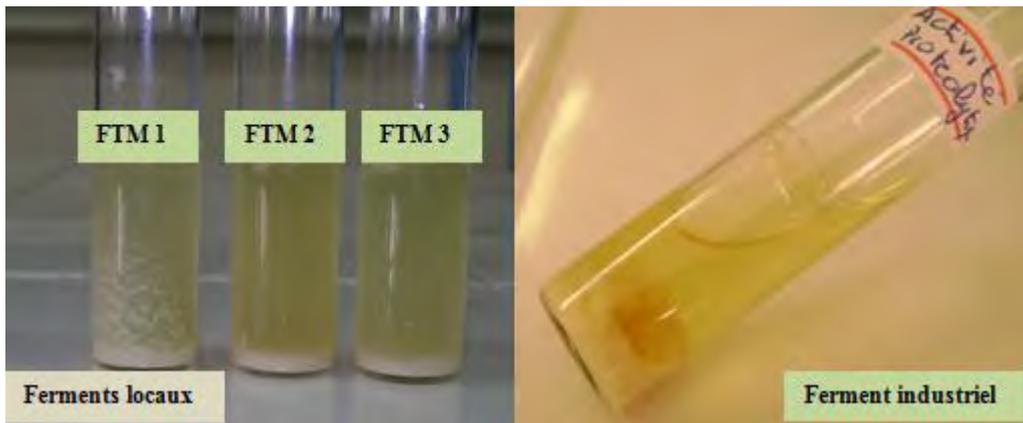


Figure 20: Activité protéolytique sur bouillon nutritif additionné du lait écrémé.

Les bactéries lactiques possèdent un système protéolytique complexe qui assure leur croissance dans des milieux à faibles concentrations en acides aminés libres et oligopeptides comme le lait (**Vasiljevic et al., 2005**). En effet, le système protéolytique de ces bactéries se compose d'une protéinase associée à l'enveloppe cellulaire, des systèmes spécifiques de transport de peptide et d'acide aminé et plusieurs peptidases cytoplasmiques (**Moulay et al., 2006**).

Dans le yaourt, la protéolyse ne détermine pas les propriétés organoleptiques, mais elle est un important facteur pour le choix des souches pour la fabrication du fromage. D'autre part, L'activité protéolytique est considérablement impliquée dans la nutrition et les interactions des bactéries du yaourt, puisque ces bactéries ne peuvent pas synthétiser les acides aminés essentiels, par conséquent, ils exigent une source exogène d'azote et utilisent les peptides et les protéines durant leur croissance par des systèmes enzymatiques plus ou moins complexes (**Zourari et al., 1992**).

Par ailleurs, **Özer et Atasoy (2002)**, ont rapporté que les activités protéolytiques des bactéries lactiques peuvent avoir quelques effets nuisibles sur le lait fermenté. En yaourt, la production des peptides amers est en grande partie attribuée à la protéolyse par l'espèce *Lb. bulgaricus*

pendant le stockage. Cependant, d'après **Shahbal et al. (1991)**, la plupart des souches de *St. thermophilus*, contrairement à *Lb. bulgaricus*, ne possèdent pas de protéase extracellulaire capable de dégrader les caséines du lait. Par contre, elle est capable d'hydrolyser la majorité des protéines de lactosérum à savoir la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine (**El-Zahar et al., 2003**).

Pour conclure, tous nos ferments thermophiles mixtes locaux présentent des activités protéinolytiques supérieures à 0.1U trypsique, mais celui codé FTM 1 donne le diamètre de protéolyse le plus élevé.

III.1.6.2. Recherche des produits de la dégradation des protéines du lait (HPLC)

Les figures 21, 22, 23 et 24 représentent les chromatogrammes obtenus après 4 h et 24 h d'incubation à 42°C du lait écrémé à 12%ensemencé par les ferments thermophiles mixtes. Il s'agit de la recherche par HPLC des produits de dégradation des protéines du lait (acides aminés). L'identification des pics générés a été effectuée par comparaison du temps des rétentions correspondant à ceux des acides aminés étalons analysés dans les mêmes conditions (*Annexe IV*).

Sur le chromatogramme de ferment FTM1, il apparaît deux principaux pics après 4 h d'incubation qui correspondent à la L-proline et la glycine. Après 24 h d'incubation, trois pics apparaissent dont le premier est la L-proline qui apparaît après un temps de rétention de 1.98 min, le deuxième est probablement la glycine et comparativement au chromatogramme de ferment FTM 3, nous pouvons déduire que le dernier pic est un dérivé de la glycine.

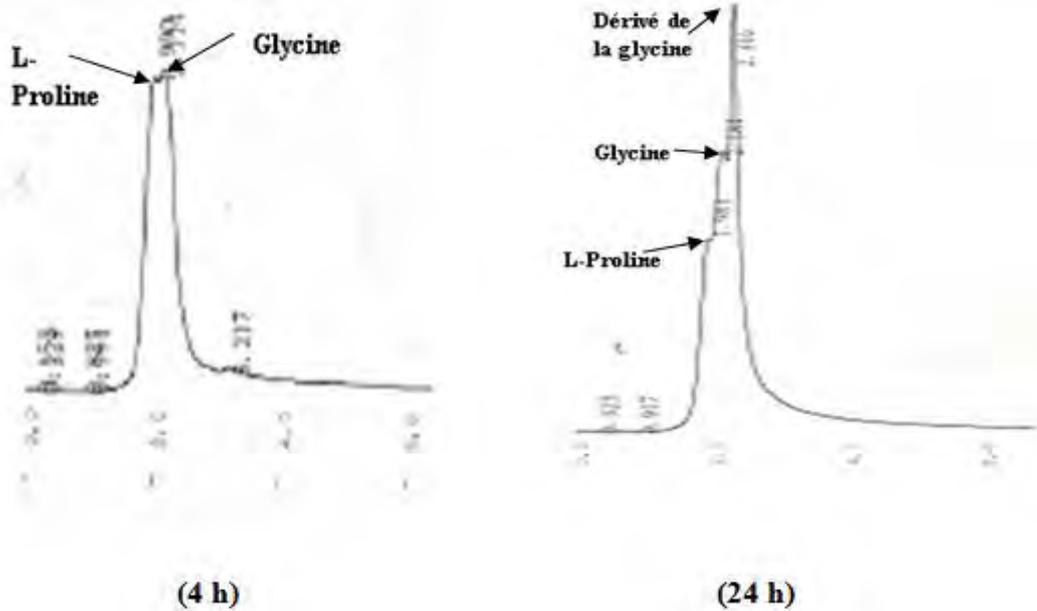


Figure 21: Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h par l'action de ferment FTM 1 sur le lait écrémé à 12%.

En ce qui concerne le chromatogramme du ferment FTM 2, il n'apparaît qu'un seul pic que ce soit après 4h ou 24 h d'incubation après 2.23 min et 2.28 min respectivement. Malheureusement, nous n'avons pas arrivé à identifier l'acide aminé correspond à ces deux pics.

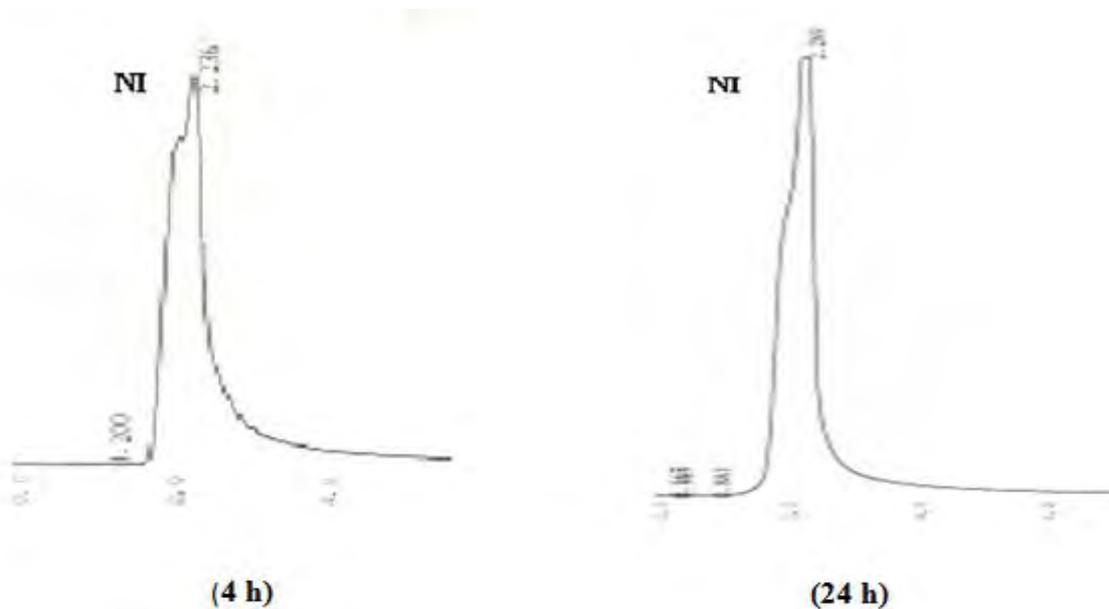


Figure 22: Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h de l'action de ferment FTM 2 sur le lait écrémé à 12%.

Le chromatogramme de ferment FTM 3 montre que l'action de ce dernier sur le lait engendre l'apparition de deux types des acides aminés après 4h aussi bien qu'après 24h d'incubation, le premier pic correspond à la L-proline (1.95 min et 1.98min), l'autre correspond à la glycine (2.11min) et /ou à un de ses produits de dégradation (2.36 min après 24h).

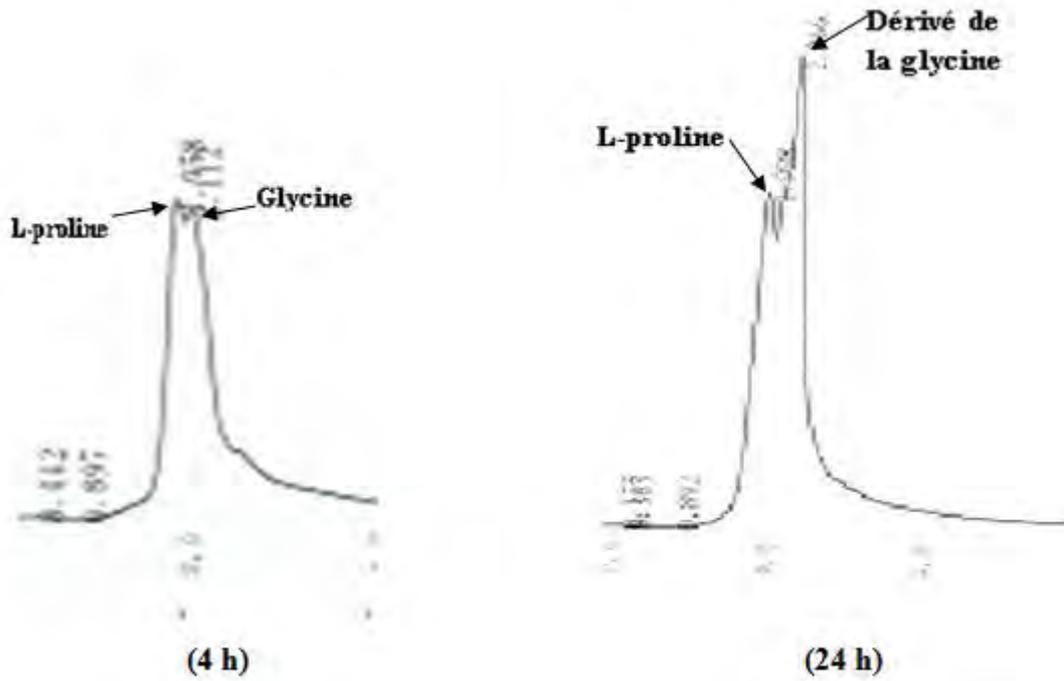


Figure 23: Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h de l'action de ferment FTM 3 sur le lait écrémé à 12%.

L'action du ferment industriel ST-M6 engendre l'apparition des mêmes acides aminés que ceux obtenus par nos ferments thermophiles locaux FTM 1 et FTM 3, après 4h, la L-proline apparaît après un temps de rétention de 1.94 min, la glycine après un temps de rétention de 2.13min, le pic qui a apparu après un temps de rétention de 2.31 min correspond probablement à un dérivé de la glycine. Après 24h d'incubation, les mêmes pics correspondants aux mêmes acides aminés ont été trouvés.

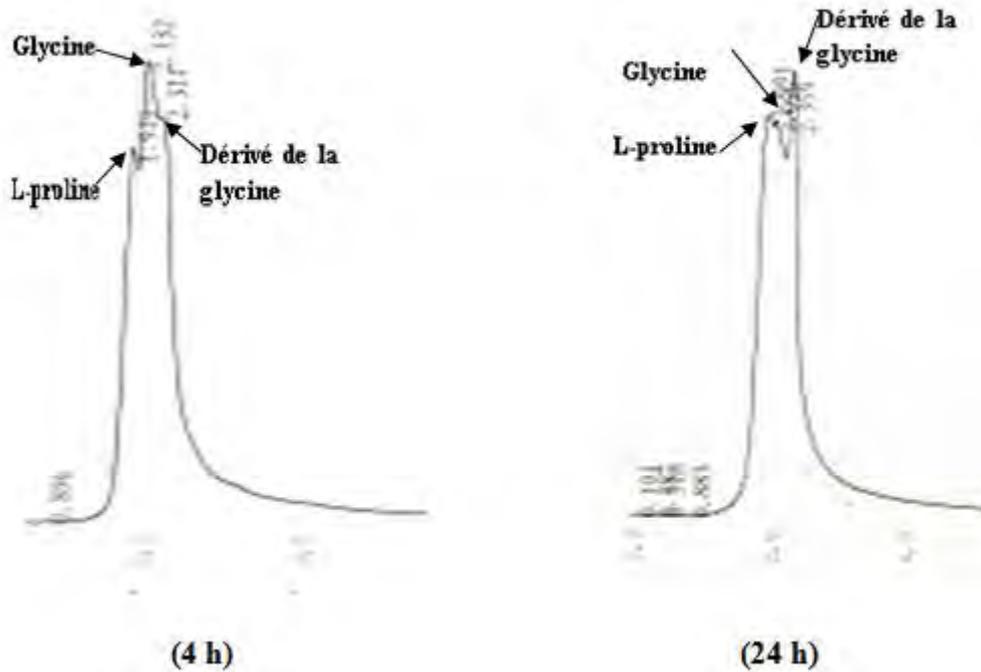


Figure 24: Analyse par HPLC des acides aminés obtenus après 4 h et 24 h de l'action de ferment ST-M6 sur le lait écrémé à 12%.

D'une manière générale, l'activité enzymatique des ferments FTM 1, FTM 3 et ST-M6 est identique qui conduit à la libération de la L-proline et la glycine, tandis que le ferment FTM2 possède une activité différente qui se manifeste par l'apparition d'un acide aminé qu'on n'arrive pas à identifier à cause de manque des acides aminés étalons. Cela dit que le site d'attaque de la caséine du lait par les complexes enzymatiques protéolytiques est différent.

Le catabolisme des acides aminés joue un rôle important pour fournir les précurseurs de la biosynthèse des acides aminés, les nucléotides et les vitamines, et la production d'un grand nombre de substances clés pour la production des composés aromatiques (Iyer et al., 2010).

D'après Ogawa (2000), l'acétaldéhyde est l'un des produits essentiels du catabolisme des acides aminés. En plus du métabolisme de lactose, l'acétaldéhyde peut être produit par la conversion de plusieurs acides aminés par l'intermédiaire de pyruvate. En ce qui concerne *St. thermophilus*, la thréonine peut être directement converti en acétaldéhyde et la glycine par l'activité de la thréonine aldolase (Chaves et al., 2002).

III.1.7. Activité lipolytique

Le tableau 05 regroupe les résultats de la lipolyse sur milieu aux Triglycérides (TG) et sur milieu MEVAG additionné de triglycérides. La figure 25 confirme ces résultats.

Tableau 05: Résultat de l'activité lipolytique des ferments lactiques.

Ferments	Observation sur Milieu au TG	Observation sur milieu MEVAG	Evaluation du test
FTM 1	Croissances avec Dépôt blanc	croissance avec virage au jaune	+
FTM2	Croissance avec Dépôt blanc	croissance avec virage au jaune	+
FTM 3	Croissance avec Dépôt blanc	croissance avec virage au jaune	+
ST-M6	Croissance sans Dépôt	pas de croissance milieu rouge	-

En analysant les résultats de ce tableau, il apparait que nos ferments locaux sont dotés d'un pouvoir lipolytique qui se traduit par un dépôt blanc des acides gras accompagné d'une croissance des bactéries autour des disques sur milieu aux TG, cette observation est absente avec le ferment industriel qui semble être démunis de cette activité. Ces résultats ont été confirmés sur milieu MEVAG aux triglycérides où nous avons observé un virage du milieu au jaune et une croissance sous forme d'un trouble au tour du piqueur centrale pour les ferments locaux, cependant , le ferment industriel n'a pas pu croitre sur ce milieu qui est reste rouge.

Selon **Béal et al. (2008)**, les propriétés lipolytique sont généralement faible chez les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés plus lipolytique que *St. thermophilus* et les lactobacilles.

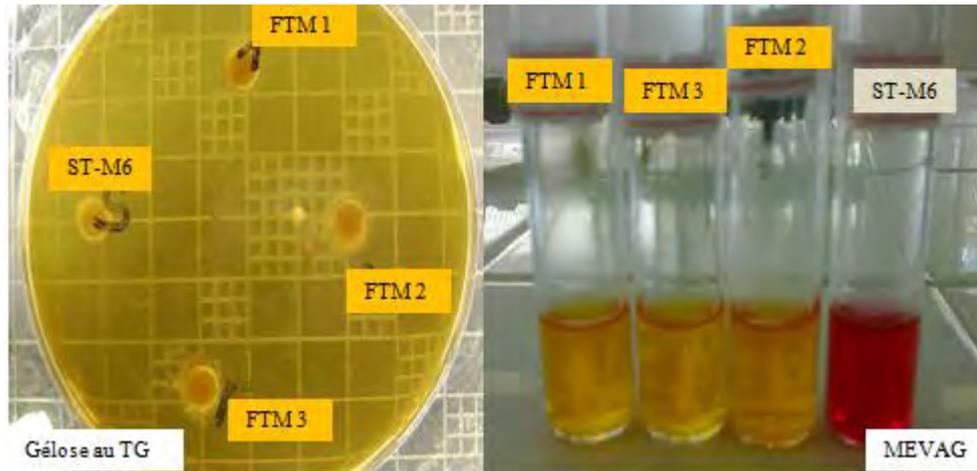


Figure 25: Activité lipolytique des ferments lactiques.

El Soda et al. (1986) ont montré que *Lb. bulgaricus* possède des estérases intracellulaires actif sur *ortho-* et *para nitrophenyl* qui sont des dérivés des acides gras à chaîne courte, en outre, **Kalantzopoulos et al. (1990)** ont aussi détecté l'activité de l'estérase-1 et de l'estérase-2 chez les deux bactéries de yaourt. Cependant, Les travaux de **Fernandez et al. (2000)**, ont montré que l'activité estérasique n'était pas nécessaire à la croissance des bactéries lactiques ni dans un milieu synthétique, ni dans du lait écrémé ou entier.

III.1.8. Activité aromatisante

Un ensemble des composés aromatiques ont été isolés des yaourts naturels. Le premier est l'acide lactique qui est responsable de la saveur typique du yaourt. L'acétaldéhyde, l'éthanol, l'acétone, le diacétyl et le 2-butanone ont été également identifiés. Cependant, l'acétaldéhyde est considéré comme le composé responsable de l'arôme du yaourt (**Chaves et al., 2002**).

III.1.8.1. Recherche d'acétoïne par VPI et VP11

Les résultats de la recherche d'acétoïne par VPI et VP11 sont illustrés par la figure 26. Il apparaît que le test de la production d'acétoïne s'est avéré négatif avec tous les ferments mixtes y compris le ferment industriel soit en utilisant le lait entier ou bien écrémé.

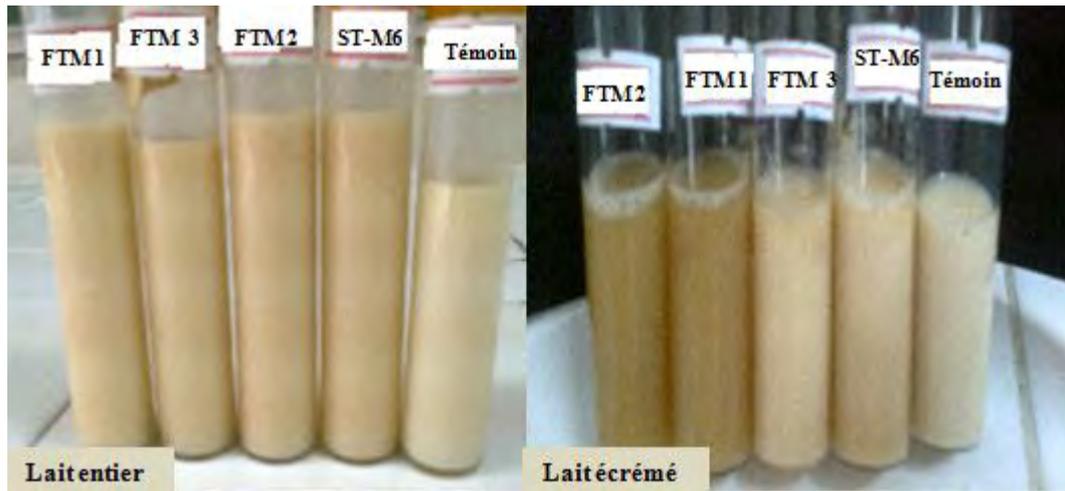


Figure 26: Résultats de la recherche de l'acétoïne (VPI, VPPI).

III.1.8.2. Recherche et quantification d'acétaldéhyde

L'acétaldéhyde est l'un des principaux composés aromatiques des produits laitiers fermentés tel que le yaourt (Ott et al., 2000 ; Chaves et al., 2002). Les résultats illustrés par la figure 27 indiquent clairement que les quatre ferments thermophiles mixtes produisent l'acétaldéhyde mais en différentes concentrations, il ressort aussi que les concentrations d'acétaldéhyde produit dans le lait entier sont plus élevées que celles produit dans le lait écrémé, ces résultats peuvent être dû à la nature de la source de carbone et sa concentration dans le lait, en effet, Bennama et al. (2012) ont rapporté que les quantités d'acétaldéhyde produites sont proportionnelles à la concentration de source de carbone. Chaves et al. (2002) et Bennama et al.(2011) ont trouvé également que le taux élevé d'acétaldéhyde a été obtenue lorsque la L-thréonine a été additionné dans le milieu de culture.

D'autre part, Ott et al. (2000) ont rapporté que la production d'acétaldéhyde en lait dépend des ferments utilisés, en effet, ces auteurs ont rapporté que *Lb. bulgaricus* est le plus fort producteur d'acétaldéhyde que *St. thermophilus*, ils ont également prouvé que le glucose est le principal précurseur d'acétaldéhyde en lait fermenté avec *St. thermophilus*. Ils ont confirmé aussi que la production principale d'acétaldéhyde a été liée à la voie glycolytique.

Özer et Atasoy (2002) ont montré que la supplémentation en acides aminés, l'hydrolyse de lactose et le traitement thermique ont un effet significatif sur la production d'acétaldéhyde par les ferments du yaourt.

Bongers et al. (2004) ont signalé que les souches lactiques non productrices des EPS produisent des quantités élevées d'acétaldéhyde (37mg/L), en revanche, les souches visqueuses produisent des quantités plus faibles (27.6 et 10.4 mg/L).

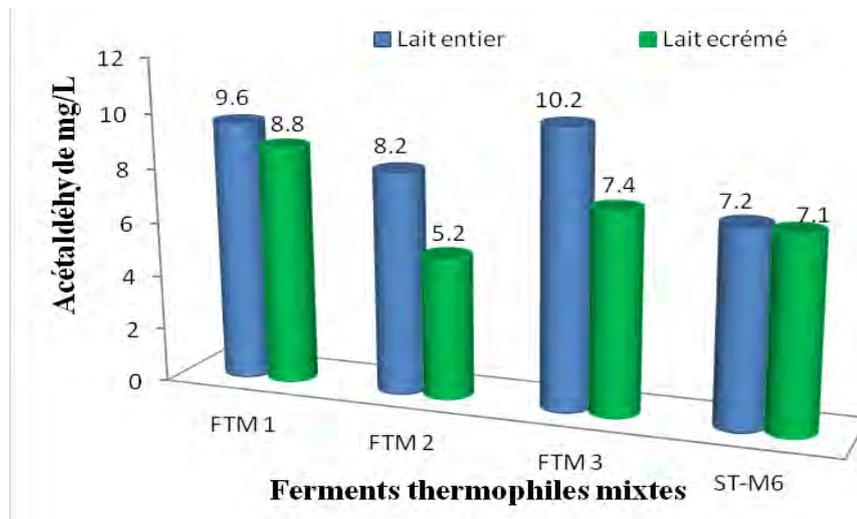


Figure 27: Production d'acétaldéhyde par les ferments thermophiles mixtes.

Il apparaît nettement d'après les résultats obtenus que le ferment local codé FTM 3 soit le meilleur producteur d'acétaldéhyde dont sa concentration atteint 10.2 mg/L, tandis que le ferment industriel (ST-M6) produit la plus faible quantité en lait entier (7.2 mg/L).

Nos résultats sont en accord avec ceux d'**Ott et al. (2000)** et **Chaves et al. (2002)** qui ont rapporté que la quantité d'acétaldéhyde secrétée dans le yaourt variée de 5 à 21mg/L. cette concentration relativement élevée est due au faible utilisation de ce métabolite par les bactéries du yaourt à cause de l'absence de l'enzyme principale pour la conversion d'acétaldéhyde en éthanol « la déshydrogénase d'alcool » (**Lees et Jago, 1976**).

Bien qu'une étude ne soit disponible sur la relation entre la concentration en acétaldéhyde et la préférence des consommateurs, il semblerait qu'une concentration supérieure à 10 mg/L soit souhaitable (**Monnet et al., 2008**).

Selon **Radke-Mitchell et Sandine (1984)**, l'équilibre entre *Lactobacillus* et *Streptococcus* est critique pour le développement de saveur du yaourt, Quand les streptocoques prédominent, une sensation douce avec un plus plein d'arôme de diacétyl et de l'acétaldéhyde, tandis qu'une prédominance des lactobacilles donne une saveur brusquement acide et un bon arôme du yaourt.

Smit et al. (2005) ont rapporté que l'acétaldéhyde est le plus fort composant qui participe à l'arôme typique du yaourt. Par contre, **Ott et al. (2000)** ont souligné que l'intensité

aromatique du yaourt dépendait davantage de son pH que de sa concentration en composés volatiles.

Dans le secteur des produits laitiers où la saveur est considéré comme la clé des propriétés des produits fermentés, de nouvelles bactéries lactiques identifiées comme GRAS (*Generally Recognized As Safe*) productrices de substances aromatiques ont constitué un axe de recherche très important (**Bennama et al., 2011**).

En dépend des résultats obtenus, il ressort que le ferment thermophile mixte FTM 3 soit le meilleur producteur d'acétaldéhyde sur lait entier.

III.1.9.Activité antagonistique

III.1.9.1. Effet de ferments thermophiles mixtes

L'activité antimicrobienne des ferments lactiques a été testée sur une gamme de souches à savoir *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.

Ce test permet de mettre en évidence les caractéristiques que possèdent certaines souches de bactéries lactiques à simuler ou inhiber d'autres souches une fois mises en contact. Les résultats relatifs à ce test sont présentés dans le tableau 06.

Tableau 06: Activité antibactérienne des ferments thermophiles sur les souches indicatrices.

Souches indicatrices	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
	FTM 1	FTM 2	FTM 3	ST-M6
<i>E.coli</i>	03	08	02	11
<i>K. oxytoca</i>	16	10	07	05
<i>B. subtilis</i>	26	30	28	13
<i>S. aureus</i>	13	12	13	06
<i>L. monocytogenes</i>	11	09	09	15
<i>Salmonella</i> sp	15	12	19	08
<i>P. Aeruginosa</i>	12	12	11	06
<i>A. baumannii</i>	07	10	04	13

Il est clair d'après les résultats obtenus que les trois ferments locaux et le ferment industriel exercent une activité inhibitrice plus ou moins prononcée sur les souches indicatrices testées. La présence de zones d'inhibition est le résultat d'un antagonisme exercé par les bactéries lactiques envers les souches pathogènes. Les diamètres des zones d'inhibition étaient compris entre 03mm et 26 mm pour le ferment FTM 1, entre 08 mm et 30 mm pour le ferment FTM 2, 02mm et 28 mm pour le ferment FTM 3 et enfin entre 05mm et 15 mm pour le ferment ST-M6.

D'une manière générale, l'ensemble des ferments mixtes étudiés ne présentent pas le même spectre d'action vis-à-vis des souches indicatrices où nous avons remarqué que nos ferments sont dotés d'un pouvoir antagoniste plus important que celui de ferment commercial.

L'effet inhibiteur des ferments locaux a été plus prononcé sur *B. subtilis*, les zones d'inhibitions sont claires avec des bordures bien distinctes (figure 28), les diamètres des zones d'inhibition étaient de 26, 30 et 28 mm pour FTM 1, FTM2 et FTM 3 respectivement. En revanche, nous avons constaté que *E. coli* était la souche la plus résistante à l'effet inhibiteur de ces ferments.

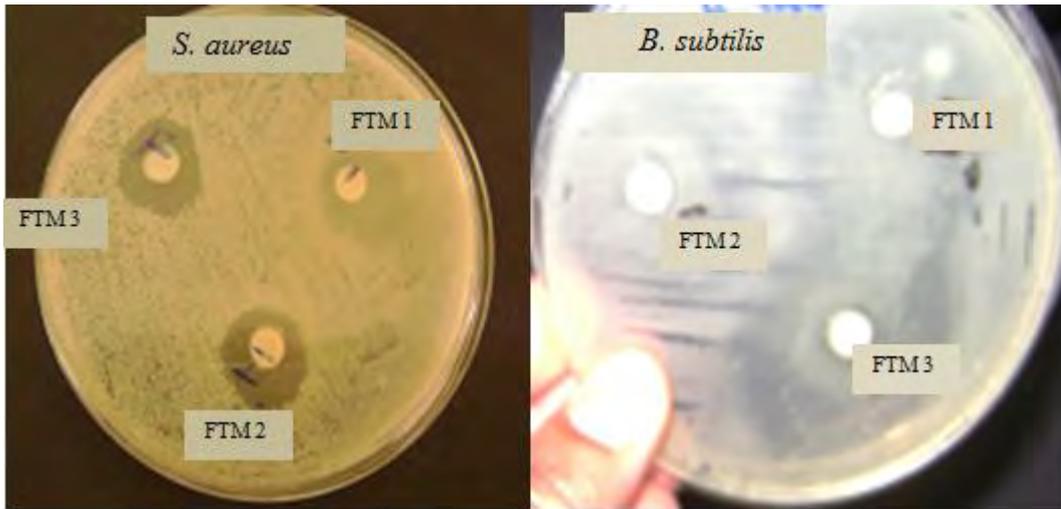


Figure 28: Activité inhibitrice des ferments lactiques locaux.

Sur la base des résultats obtenus, il s'avère que nos ferments locaux ont un effet modéré sur *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *P. aeruginosa* par rapport aux autres souches indicatrices. Des travaux similaires ont été réalisés par plusieurs auteurs, en effet, **Nurhajati et al. (2008)** ont rapporté que *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus* empêchent la croissance de *S. aureus* avec des zones d'inhibition de 3 millimètres, de ce fait et par comparaison à cette donnée, nos ferments sont considérés comme étant des inhibiteurs potentiels de cette souche avec des diamètres de zone d'inhibitions compris entre 12 et 13 mm.

Dans une étude similaire réalisée par **Yesillik et al. (2011)** sur un yaourt fabriqué à la maison, la zone maximum d'inhibition après 24 h d'incubation a été enregistrée contre *Salmonella typhimurium* (31 mm) suivi par *S. aureus* (28.6 mm), ils ont obtenu aussi un diamètre de 21.9 mm vis-à-vis *E.coli* et un diamètre de 16.3 mm contre *P. aeruginosa*.

Le ferment FTM 3 manifeste un effet antagonistique plus prononcé vis-à-vis de *Salmonella* sp que les autres ferments par un diamètre d'inhibition de 19mm, d'autre part, il présente la plus faible activité contre *A. baumannii*.

Comparativement aux ferments FTM 2 et FTM 3, le ferment FTM 1 montre un fort antagonisme vis-à-vis de *K. oxytoca* qui se manifeste par un diamètre d'inhibition de 16mm.

Les résultats de l'activité antagonistique du ferment industriel ST-M6 sont révélés incomparables à ceux des ferments locaux où nous avons observé que l'effet le plus marqué a été enregistré contre *L. monocytogenes* avec un diamètre d'inhibition de 15mm.

Il s'avère que *K. oxytoca*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont les souches les moins sensibles à l'activité inhibitrice du ferment ST-M6 (05, 06 et 06 mm respectivement). Ce dernier présente une activité inhibitrice modérée vis-à-vis d'*E.coli*, *B. subtilis*, *Salmonella* sp et *A. baumannii*.

Les résultats obtenus par **Yesillik et al. (2011)**, sont meilleurs aux nos résultats, ils ont enregistré des diamètres de 23mm, 24mm, 20.4mm et 18.2mm vis-à-vis *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E.coli* respectivement.

Mezaini et al. (2009) ont rapporté que parmi les vingt souches de bactéries lactiques isolés d'un lait Algérien et examinés pour leur activité antagonique vis-à-vis de *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *B. cereus* *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermitidis*, *E. coli* et *Salmonella typhimurium*, *St. thermophilus* T2 a montré un spectre d'inhibition large vis-à-vis de toutes les bactéries indicatrices gram positives à l'exception de *S. aureus*. En outre, cette souche n'a montré aucune activité inhibitrice contre *E. coli* et *S. typhimurium*.

Dans l'étude réalisée par **Akpinar et al. (2011)**, certaines souches de *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus* isolées des yaourts produits à la maison ont montré une activité antimicrobienne vis-à-vis de certains micro-organismes pathogènes des aliments à savoir *L. monocytogenes*, *E. coli*, *K. pneumonie* et *P. fluorescens*.

Les bactéries lactiques exercent une forte activité antagonistique contre plusieurs micro-organismes, y compris ceux de la détérioration des aliments et des microbes pathogènes. En outre, l'effet antimicrobien de quelques souches permet de prolonger la durée de conservation des aliments (**Haller, 2001; O'Sullivan et al., 2002**). Cet effet est principalement dû à la production des acides organiques (acide lactique) et également à la production des composés antimicrobiens comprenant le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, l'acétaldéhyde, les D-isomères des acides aminés et les bactériocines (**Cintas et al., 2001**).

Callaway et al. (2008) et **Garcia et al. (2010)** ont rapporté que les bactéries bénéfiques, principalement les bactéries lactiques et les bifidobactériés peuvent être une stratégie utile et efficace pour empêcher ou réduire l'incidence des microbes pathogènes, de ce fait améliorer l'innocuité des aliments et protéger la santé du consommateur.

Les isolats bactériens contenant les agents antimicrobiens ont été utilisés comme alternative aux antibiotiques pour le traitement des maladies gastro-intestinales (**Soomro et al., 2002; Akpinar et al., 2011**).

Il est intéressant de noter que l'antagonisme observé dans notre étude est le résultat d'une symbiose entre *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*, donc l'une de ces deux espèces peut exercer un effet inhibiteur plus marqué que celui de l'autre, de ce fait, les résultats trouvés par **Yuksekdag et Beyatli (2003)** ont montré que l'effet antimicrobien de *Lactobacillus* a été plus élevé que celui de *Streptococcus*. Cet effet est dû non seulement à la production d'acide lactique et du peroxyde d'hydrogène, mais également à d'autres composés antimicrobiens comme les bactériocines.

Dans ce contexte, il est intéressant de noter que l'association de deux types de bactéries peut renforcer leurs propriétés d'inhibition contre les bactéries indicatrices. **Nurhajati et al. (2008)** ont rapporté aussi que l'interaction symbiotique entre les deux types de bactéries de yaourt peut produire plus d'acide organique et divers bactériocines qu'une seule souche.

D'après les résultats de cette étude, nous ne pouvons pas déterminer la plus forte activité inhibitrice, car le spectre d'activité de nos ferments thermophiles mixtes locaux varie d'une souche indicatrice à l'autre, cependant, d'une manière générale, ces ferments présentent un spectre d'activité meilleur que celui de ferment commercial.

III.1.9.2. Effet de surnageant natif

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus après l'étude de l'effet des surnageants natifs sur les souches indicatrices sont groupés dans le tableau 07.

Tableau 07: Activité inhibitrice des surnageants natifs.

Souches indicatrices	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
	FTM 1	FTM 2	FTM 3	ST-M6
<i>E.coli</i>	08	05	05	00
<i>K. oxytoca</i>	06	05	06	08
<i>B. subtilis</i>	11	06	07	06
<i>S. aureus</i>	13	08	14	19
<i>L. monocytogenes</i>	16	12	05	13
<i>Salmonella sp</i>	05	09	00	00
<i>P. Aeruginosa</i>	10	14	10	11
<i>A. baumannii</i>	07	08	06	07

D'une manière générale, l'activité antibactérienne des surnageants natifs des ferments lactiques étudiés n'était pas semblable à l'encontre de la collection des souches cibles, en effet, les diamètres des zones d'inhibition étaient compris entre 00 et 19 mm.

Il apparait que les surnageants des deux ferments FTM 1 et FTM 2 inhibent la croissance de toutes les souches indicatrices; alors que, le surnageant du ferment FTM 3 n'arrive pas à

inhiber *Salmonella* sp, de même, le surnageant de la culture du ferment ST-M6 n'arrive pas à inhiber la croissance de la même souche ainsi qu'*E.coli*.

Il est intéressant de signaler que *S. aureus* a montré une nette sensibilité aux surnageants des différentes cultures et particulièrement celui du ferment industriel. Cette inhibition est illustrée par la figure 29.

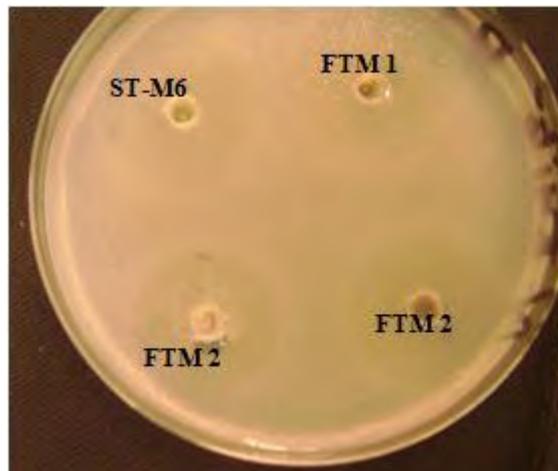


Figure 29: Activité inhibitrice de surnageants natifs des ferments lactiques sur *S. aureus*.

Les bactéries lactiques sont utilisées dans les processus de la fermentation des aliments qui les acidifié en produisant l'acide lactique et acétique. La protection des aliments contre la détérioration des micro-organismes pathogènes par ces bactéries lactiques est liés à leur activité antagonique (Parvez et al., 2006).

D'après Kuipers et al. (2000), l'effet antimicrobien des bactéries lactiques est principalement dû à la production d'acide lactique et organique, ce qui diminue le pH du milieu de croissance. Milcent et Carrere (2001) et Madzingaidzo et al. (2002) ont rapporté que l'effet inhibiteur de l'acide lactique sur la croissance des cellules est plus fort que son effet fermentaire.

III.1.9.3. Effet de surnageant neutre

Pour éliminer l'effet inhibiteur des acides organiques, les surnageants ont été neutralisés à pH 7. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 08.

Tableau 08: Activité inhibitrice des surnageants neutres.

Souches indicatrices	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
	FTM 1	FTM 2	FTM 3	ST-M6
<i>E.coli</i>	00	05	00	00
<i>K. oxytoca</i>	00	00	00	00
<i>B. subtilis</i>	07	05	05	00
<i>S. aureus</i>	06	06	05	06
<i>L. monocytogenes</i>	09	05	07	06
<i>Salmonella sp</i>	05	09	09	00
<i>P. Aeruginosa</i>	08	13	10	09
<i>A. baumannii</i>	00	05	00	00

Sur la base de ces résultats, nous avons remarqué que tous les surnageants étudiés présentent une faible activité inhibitrice qui se manifeste dans la plupart du temps par l'apparition de zones d'inhibition de diamètres compris entre 5 et 9mm et une perte totale de leurs effets vis-à-vis de certaines souches.

Il est à noter que *K. oxytoca* n'était pas inhibée par les surnageants de tous les ferments lactiques y compris celui du ferment industriel. Ces surnageants n'arrivent pas à inhiber aussi la croissance d'*E.coli* et la souche d'*A. baumannii* à l'exception de celui de FTM 2 qui montre une faible activité inhibitrice vis-à-vis de ces deux souches et qui s'est traduit par l'apparition de zone d'inhibition de diamètre de 5mm.

Il est à signaler que la totalité d'activité du surnageant du ferment ST-M6 a été perdu sauf envers *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *P. aeruginosa* qui a été apparue la souche présentant la plus forte résistance aux surnageants étudiés.

L'apparition de l'activité antagonistique, après élimination de l'effet de l'acide lactique, confirme l'existence d'autres substances antibactériennes telles que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et les bactériocines, par ailleurs, l'absence de cette activité confirme que l'inhibiteur majeur est l'acide lactique produit par les ferments étudiés.

Les bactéries lactiques produisent une gamme de substances à savoir l'acétaldéhyde, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, le dioxyde de carbone, les polysaccharides et les bactériocines qui ont un rôle antimicrobien (**Rodrigues et al., 2003**).

De nombreuses études ont suggéré que certaines bactéries lactiques peuvent contrôler la croissance de quelques microorganismes pathogènes comme *L. monocytogenes* dans des produits alimentaires (**Tantillo et al., 2002; Mataragas et al., 2003**).

Récemment, l'utilisation des métabolites des bactéries lactiques en tant que conservateurs biologiques des matériaux d'emballage des aliments a été entreprise (**Scannell et al., 2000 ; Pirttijärvi et al., 2001**). En effet, selon **Galvez et al. (2010) et Garcia et al. (2010)**, la conservation biologique des aliments se rapporte à la prolongation de la durée de stockage et à l'amélioration de leur qualité microbiologique en employant deux approches différentes à savoir l'inoculation de la matrice des aliments avec des micro-organismes cibles définis en tant que cultures protectrices par la production des molécules inhibitrices et/ou par leurs effet compétitif vis-à-vis des bactéries pathogènes de détérioration et l'utilisation des métabolites microbiens sous une forme pure, en particulier les bactériocines.

III.1.9.4. Quantification de la production des métabolites antimicrobiens

a. Détermination de la concentration en acide lactique

La figure 30 illustre les concentrations d'acide lactique (%) produit par les différents ferments après une durée d'incubation de trois jours . La figure 31 indique le virage de la couleur confirmant la présence d'acide lactique.

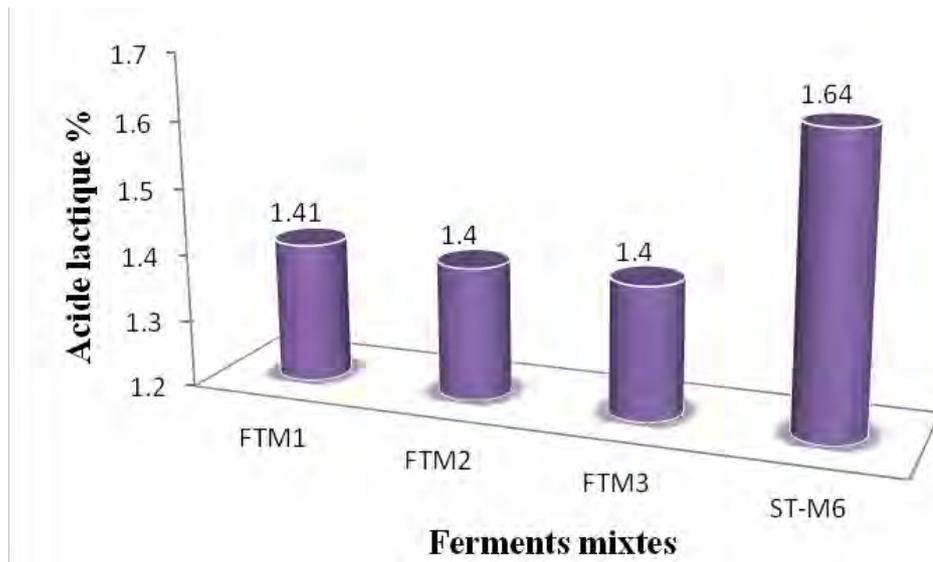


Figure 30: Production d'acide lactique par les ferments thermophiles mixtes.

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que tous les ferments locaux produisent les mêmes quantités d'acide lactique qui sont de 1.4%, par ailleurs, celle de ferment industriel est plus élevée (1.64%).

Durant la fermentation des produits laitiers, les lactobacilles métabolisent le lactose en acide lactique. Cette production d'acide, abaisse le pH et crée un milieu acide qui est défavorable pour le développement des microorganismes pathogènes (Aslim et al., 2004).

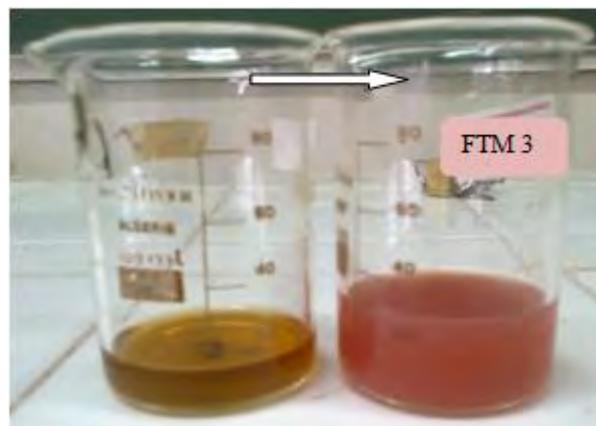


Figure 31: Quantification d'acide lactique produit par le ferment FTM 3.

Charlier et al. (2009) et Lee Marc et al. (2009) ont rapporté que l'inhibition de *S. aureus* par les bactéries lactiques est liée aux plusieurs facteurs antagoniques comprenant la diminution du pH suite à la production d'acide lactique, la concurrence pour l'aliment, la production

d' H_2O_2 et la production et l'accumulation des substances anti-staphylococciques telles que les bactériocines.

b. Détermination de la concentration de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Les résultats de la recherche et la quantification de peroxyde d'hydrogène sont récapitulés dans la figure 32.

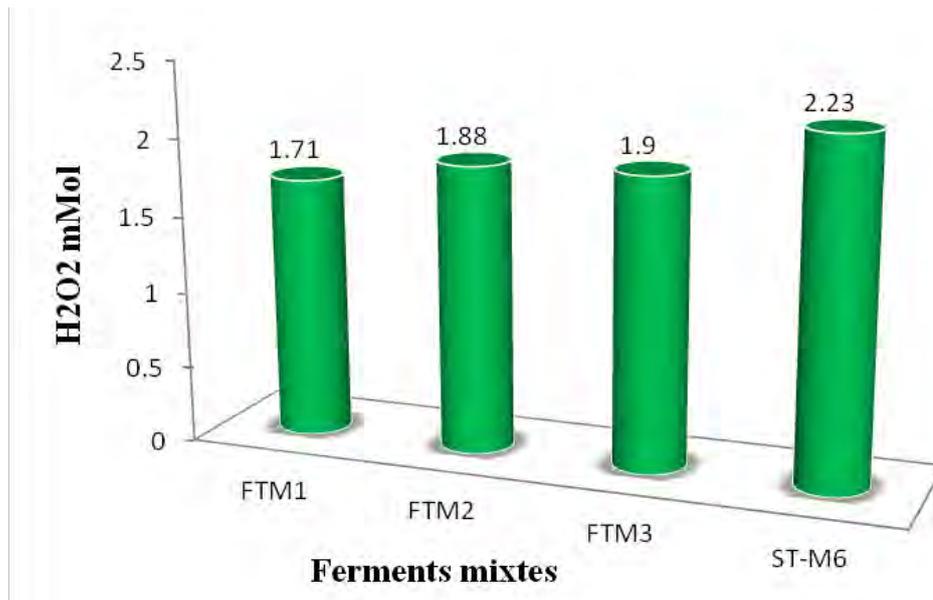


Figure 32: Production de peroxyde d'hydrogène par les ferments thermophiles mixtes.

D'après la figure 32, il ressort que tous les ferments étudiés produisent des quantités remarquables en peroxyde d'hydrogène où la quantité la plus élevée a été enregistrée avec le ferment industriel qui est de l'ordre de 2.23 mMol. Les ferments locaux ont produit des quantités plus faibles dont la plus importante a été enregistrée avec le ferment FTM 3 (1.9mMol). La figure 33 illustre la mise en évidence de la présence d' H_2O_2 et sa quantification.

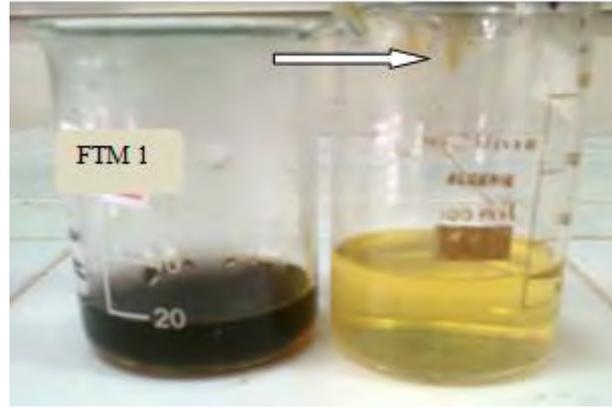


Figure 33: Quantification du peroxyde d'hydrogène produit par le ferment FTM 1.

En plus des acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et les bactériocines peuvent aussi jouer un rôle inhibiteur vis-à-vis des microorganismes pathogènes (**Zhu et al., 2000**).

Le peroxyde d'hydrogène est produit par les bactéries lactiques en présence de l'oxygène par l'action de la flavoprotéine oxydase ou par le nicotinamide adénine di-nucléotide peroxydase (NADH). Il inhibe les bactéries sensibles par l'oxydation des matériaux cellulaires et la destruction des structures moléculaires des protéines (**Zalan et al., 2005 ; Ammor et al., 2006**).

Les lactobacilles ont la capacité de produire le peroxyde d'hydrogène pendant la croissance par différents mécanismes ce qui est déjà démontré par **Daeschel (1989)**, cette substance s'accumule dans le milieu de croissance à cause de l'absence des catalase chez ce genre bactérien (**Kandler et Weiss, 1986**).

Actuellement, les consommateurs s'inquiètent quant à l'utilisation des produits chimiques synthétiques comme conservateurs et antibactériens et leurs conséquences sur la santé (**Soomro et al., 2002**). Le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques peut être très utile pour la conservation et la prévention de l'altération des aliments causée par les microorganismes pathogènes (**Adesokan et al., 2010**). Néanmoins, le potentiel de bioconservation des produits par les bactéries lactiques peut être limité par la nature oxydative de cette molécule, en effet les radicaux libres produit ont un grand impact sur la qualité sensorielle en causant le rancissement de la matière grasse et la décoloration des aliments (**Devlieghere et al., 2004**).

c. Détermination de la concentration en Diacétyle produit par les ferments lactiques

Les résultats obtenus se sont avérés négatifs, cela peut s'expliquer par l'absence de diacétyle dans nos échantillons ou par la présence de faibles concentrations qui ne peuvent être déterminés par la méthode choisie (choix de la méthode).

III.1.10. Résistances aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques peut être définie comme la capacité des bactéries et d'autres micro-organismes à résister à un antibiotique auquel elles étaient une fois sensible (**Levy et Marshall, 2004**).

L'ensemble des résultats de l'antibiogramme des ferments lactiques mixtes aux dix antibiotiques sont groupés dans le tableau 09.

D'une façon générale, les ferments lactiques étudiés ont montré un comportement différent à l'égard des antibiotiques testés, cependant, nous avons constaté une sensibilité totale à sept antibiotiques à savoir, Spiramycine, Chloramphénicol, Lincomycine, Ciprofloxacine, Tétracycline, Amikacine et céfoxitine.

Les ferments lactiques ont montré une résistance à trois antibiotiques, les ferments locaux montrent une résistance à la Colistine sulfate, celui commercial résiste à la Tobramycine et à la Pénicilline G.

Il faut signaler que cette résistance et sensibilité trouvées dans notre étude, peuvent être liées à la concentration de chaque antibiotique d'où la nécessité de tester plusieurs concentrations pour confirmer les résultats.

Sur la figure 34 sont apparues clairement les zones d'inhibition de ferment thermophile mixte local FTM 1 par Lincomycine, Chloramphénicol, Tobramycine, Spiramycine et Tétracycline.

Tableau 09: Résultats de l'antibiogramme de ferments thermophiles mixtes.

Antibiotiques	Ferments thermophiles mixtes			
	FTM 1	FTM 2	FTM 3	ST-M6
<i>PG 6</i>	S	S	S	R
<i>Sp 100</i>	S	S	S	S
<i>C 30</i>	S	S	S	S
<i>Tob 10</i>	S	S	S	R
<i>L 15</i>	S	S	S	S
<i>Cip 5</i>	S	S	S	S
<i>T 30</i>	S	S	S	S
<i>A 30</i>	S	S	S	S
CS 50	R	R	R	S
Fox 30	S	S	S	S

PG 10 : Pénicilline G 6 µg, *Sp100* : Spiramycine 100µg, *C 30* : Chloramphénicol 30µg, *Tob 10* : Tobramycine 10µg, *L 15* : Lincomycine 15µg, *Cip 5* : Ciprofloxacine 5 µg, *T 30* : Tétracycline 30µg, *A 30* : Amikacine 30µg, *CS 50* : Colistine Sulfate 50µg, et *Fox 30* : Céfoxitine 30µg. (R): résistant ; (S): Sensible.

Dans une étude menée par **Temmerman et al. (2002)**, où un total de 55 produits probiotiques Européens a été évalué en ce qui concerne la résistance aux antibiotiques des isolats bactériens récupérés de ces produits, la résistance aux antibiotiques a été détectée contre la kanamycine (79% des isolats), vancomycine (65%), tétracycline (26%), pénicilline G (23%), érythromycine (16%) et chloramphénicol (11%). Parmi ces isolats bactériens, *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* ont montré une résistance à la Pénicilline G, le chloramphénicol et la Tétracycline.

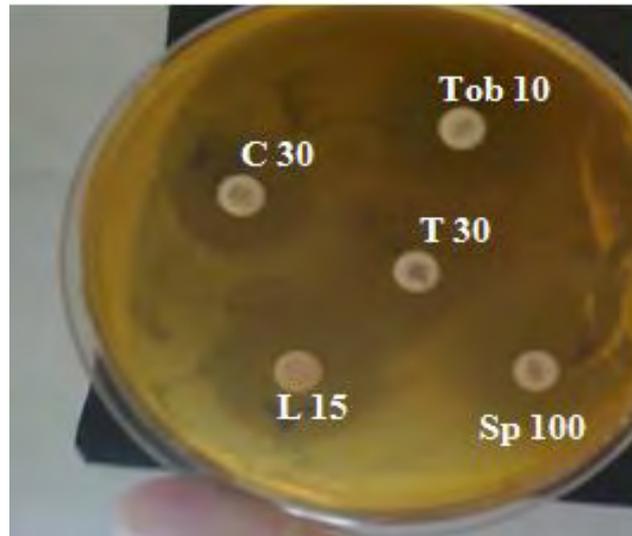


Figure 34: Antibiogramme de ferment FTM 1.

La résistance des bactéries lactiques aux antibiotiques ne présente aucun danger. Cependant, cette résistance peut constituer un véritable risque lorsqu'elle est transférée à des espèces bactériennes pathogènes qui peuvent compliquer le traitement d'une maladie ou d'une infection (**Bernardeau et al., 2008**).

Les deux espèces bactériennes utilisées dans la fabrication du yaourt ne révèlent pas la même résistance aux antibiotiques. **Kyriacou et al. (2008)** ont montré que *Lactobacillus* ssp n'étaient pas résistants contre la tétracycline, le chloramphénicol ou la rifampicine, d'autre part, **Ammor et al. (2007)** ont montré que *St. thermophilus* est habituellement sensible au chloramphénicol, tétracycline, érythromycine, céphalothine quinupristine/dalfopristine et ciprofloxacine. En revanche, il montre une résistance moyenne à élevée aux aminoglycosides (gentamicine, kanamycine, et streptomycine), triméthoprim et sulfadiazine.

En conclusion, et d'après les résultats obtenus lors de l'étude des aptitudes technologiques des trois ferments locaux testés, il est clair que le ferment codé FTM 3 soit le meilleur, ce dernier peut être choisi pour une optimisation de la production de l'acide lactique et par suite la production d'un yaourt.

III.2. Optimisation de la production d'acide lactique par le modèle de Box Behnken

Le modèle de Box-Behnken est important pour la détermination des interactions entre les différents facteurs étudiés ainsi que la détermination de leurs concentrations optimales. Ce modèle est très utile dans différents domaines, en effet, **Hou et al. (2011)** ont réalisé une optimisation des conditions de la production de polygalacturonase par *Bacillus licheniformis* en utilisant ce modèle. D'autre part, **Narkprasom et al. (2013)** ont utilisé ce plan d'expérience pour l'optimisation de la production de sucre réducteur à partir d'hydrolyse acide de bagasse de canne à sucre.

III.2.1. Constitution de la matrice d'expérience

Dans notre étude, le modèle de **Box Behnken** a été appliqué pour l'optimisation de la production d'acide lactique par un ferment thermophile mixte local codé FTM 3 dont la détermination des interactions entre les quatre facteurs à savoir la température, l'extrait sec totale, le taux d'ensemencement et le rapport *St/Lb*, nous a permis d'obtenir une matrice composée de 27 expériences. Les résultats obtenus après 4 heures d'incubation ont été analysés par l'analyse de régression et le tableau 10 montre les conditions expérimentales ainsi que la concentration d'acide lactique mesurée et celle prédite pour chaque expérience.

En analysant les résultats de ce tableau, il ressort que les concentrations d'acide lactique obtenues variées de 3.4 g/L à 6.9 g/L, la plus faible concentration a été observée lorsque nous avons utilisé 12% d'extrait sec total et 3% de culture bactérienne avec un rapport *St/Lb* de 1.4/1.1 et une durée d'incubation de 4 h à 39.5°C. D'autre part, la concentration de 6.9g/L a été obtenue avec un extrait sec total de 14.5%, un taux d'ensemencement de lait de 9% et un rapport *St/Lb* égal à 1.6/1.2, à la même température et au même temps d'incubation.

Tableau 10: Matrice expérimentale du modèle factoriel Box-Behnken représentant l'effet de température, extrait sec total, taux d'ensemencement et rapport *St/Lb* sur la production d'acide lactique.

Essais	X1	X2	X3	X4	Concentration en acide lactique g/L	
					Mesurée	Prévue
1	-	-	0	0	5.8	5.37
2	-	+	0	0	5.7	5.84
3	+	-	0	0	5.6	4.97
4	+	+	0	0	5.7	5.64
5	0	0	-	-	5.1	4.72
6	0	0	-	+	5.2	4.54
7	0	0	+	-	6.5	6.67
8	0	0	+	+	6.9	6.79
9	-	0	0	-	5.6	5.77
10	-	0	0	+	6.0	5.99
11	+	0	0	-	5.3	5.72
12	+	0	0	+	5.2	5.44
13	0	-	-	0	3.4	3.92
14	0	-	+	0	5.7	6.32
15	0	+	-	0	5.0	4.79
16	0	+	+	0	6.7	6.59
17	-	0	-	0	3.7	4.08
18	-	0	+	0	6.6	6.33
19	+	0	-	0	3.6	3.93
20	+	0	+	0	6.2	5.88
21	0	-	0	-	6.7	6.41
22	0	-	0	+	5.0	5.18
23	0	+	0	-	5.9	5.78
24	0	+	0	+	6.6	6.95
25	0	0	0	0	6.1	6.10
26	0	0	0	0	6.1	6.10
27	0	0	0	0	6.1	6.10

III.2.2 Analyse par le logiciel

L'analyse de régression a été réalisée par le logiciel JMP 6 Discovery. Les coefficients de régression ainsi que les valeurs de probabilité correspondantes (P) sont donnés dans le tableau 11. À partir de ces valeurs, on peut conclure que le coefficient linéaire (TE), les coefficients quadratiques ($T^\circ \times T^\circ$, TE x TE) et le coefficient d'interaction (EST x St/Lb) sont significatifs ($P < 0.05$). En effet, l'équation (1) montre que la concentration d'acide lactique est influencée par les interactions entre les variables indépendantes du premier ordre (TE), (EST x St/Lb) et du second ordre polynomial ($T^\circ \times T^\circ$) et (TE x TE).

$$Y = 6.1 - 0,15 X_1 + 0.283 X_2 + 1.05 X_3 - 0.016 X_4 - 0.495 X_1^2 - 0.145 X_2^2 - 0.545 X_3^2 + 0.129 X_4^2 + 0.05 X_1 X_2 - 0.075 X_1 X_3 - 0.125 X_1 X_4 - 0.15 X_2 X_3 + 0.6 X_2 X_4 + 0.075 X_3 X_4 \dots \dots \dots (1)$$

Y est la réponse, X_1, X_2, X_3 et X_4 sont des variables indépendantes.

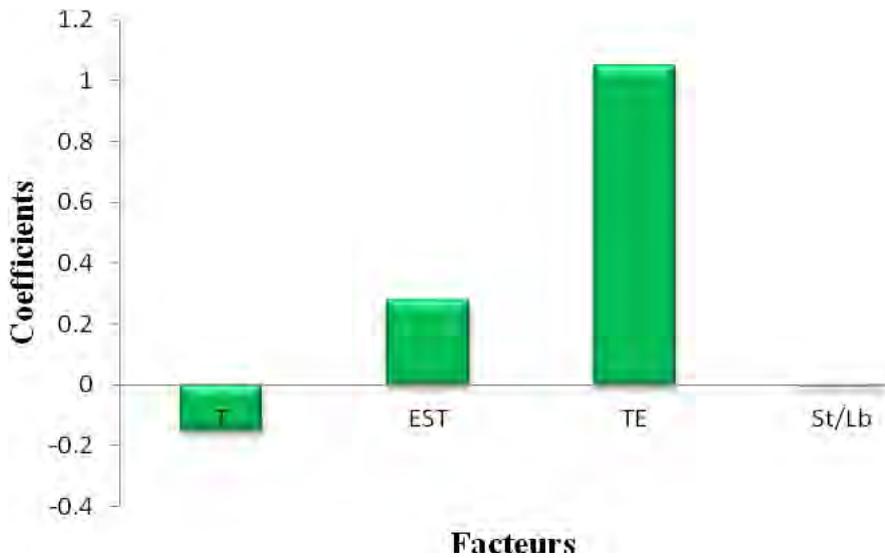


Figure 35: Effet de quatre facteurs sur la production d'acide lactique.

La figure ci-dessus montre l'effet de chaque facteur sur la production d'acide lactique où nous avons remarqué que le taux d'ensemencement a l'effet le plus significatif sur la réponse tandis que la température affecte négativement cette réponse.

La valeur du coefficient de détermination (R^2) montre la bonne concordance entre les données expérimentales et celles prévues pour toute la régression. Dans cette étude, la valeur du R^2 est

0.87, indiqué que le modèle de réponse a pu expliquer 87 % des variations totales, et par conséquent, il reste 13% des variations qui ne sont pas expliqués par ce modèle.

Tableau 11 : Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle Box-Behnken.

Elément	Coefficient	Erreur standard	t-Ration	P
Constant	6.1	0.282925	21.56	<.0001***
T°(37,42)	-0.15	0.141462	-1.06	0.3099
EST(12,17)	0.2833333	0.141462	2.00	0.0683
TE(3,9)	1.05	0.141462	7.42	<.0001***
St/Lb (1.2,1.333)	-0.016667	0.141462	-0.12	0.9082
T°*EST	0.05	0.24502	0.20	0.8417
T°*TE	-0.075	0.24502	-0.31	0.7648
EST*TE	-0.15	0.24502	-0.61	0.5518
T°*St/Lb	-0.125	0.24502	-0.51	0.6192
EST*St/Lb	0.6	0.24502	2.45	0.0307*
TE*St/Lb	0.075	0.24502	0.31	0.7648
T°*T°	-0.495833	0.212193	-2.34	0.0376*
EST*EST	-0.145833	0.212193	-0.69	0.5050
TE*TE	-0.545833	0.212193	-2.57	0.0244*
St/Lb*St/Lb	0.1291667	0.212193	0.61	0.5541

(*) Effet significatif ($P < 0.05$). (**) Effet hautement significatif ($P < 0.01$). (***) Effet très hautement significatif ($P < 0.001$).

L'adéquation du modèle était vérifiée en employant l'analyse de la variance (ANOVA) qui a été appliquée en utilisant la valeur statistique du Fischer et les résultats trouvés sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12: Analyse de la variance.

Source	DDL	Σ carrés	Carrés moyens	<i>F</i>	<i>Prob > F</i>
Modèle corrigé de la moyenne	14	19.274630	1.37676	5.7332	0.0022
Résidus	12	2.881667	0.24014		
Réponses mesurées corrigées de la moyenne	26	22.156297			

Cette analyse confirme que le modèle prend bien en charge la presque totalité de l'explication des réponses mesurées. En effet, la valeur de la probabilité *P* a été calculée afin de déterminer l'effet significatif de chaque paramètre, plus cette valeur est petite, plus le coefficient du paramètre est significatif, elle suggère également que chaque deux paramètres sont sensiblement différents de zéro au niveau de confiance. Par conséquent, elle peut agir en tant que limitant des facteurs et une petite variation changera la réponse (**Murthy et al., 2000**). Dans notre cas la valeur de *P* du modèle est de 0.002 ce qui confirme le bon choix du modèle.

Le modèle de régression développé peut être représenté par les surfaces de réponse et le contour plot pour comprendre l'interaction des quatre variables et pour déterminer le niveau optimal de chaque variable pour optimiser la réponse. Les surfaces de réponse avec les contours plot montrent l'interaction de deux variables indépendantes quand une autre variable est fixée à zéro. Les figures 36, 37, 38, 39, 40 et 41 représentent les surfaces de réponse et les contours plot établies pour la concentration d'acide lactique.

Pour les contours plots, les parties hachurées correspondent à des réponses trop élevées ou trop faibles. La détermination correcte de la concentration d'acide lactique est obtenue pour des points situés dans la zone blanche.

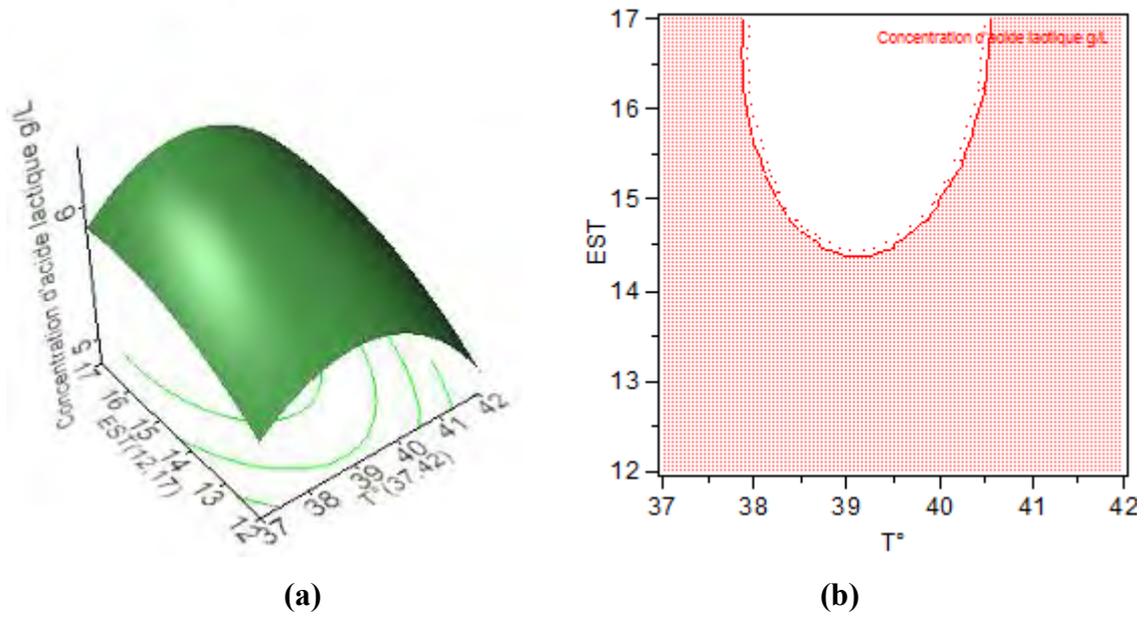


Figure 36: Correlation entre T° et EST sur la concentration d'acide lactique (g/L).

(a):Surface de réponse (b): contour plot.

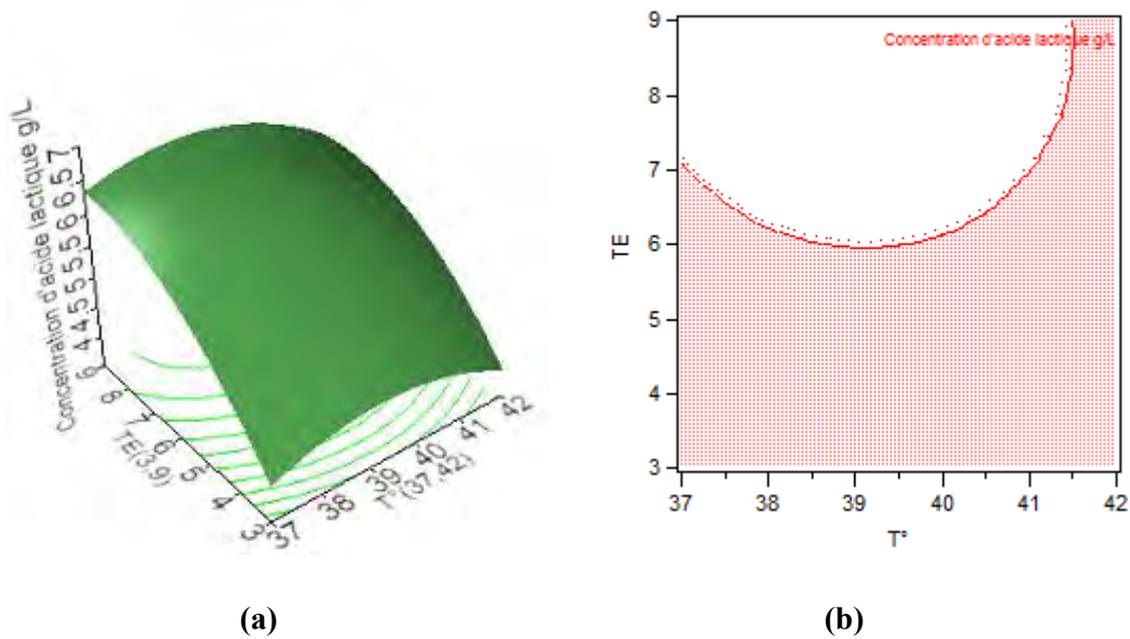


Figure 37: Correlation entre T° et TE sur la concentration d'acide lactique (g/L).

(a):Surface de réponse (b): contour plot.

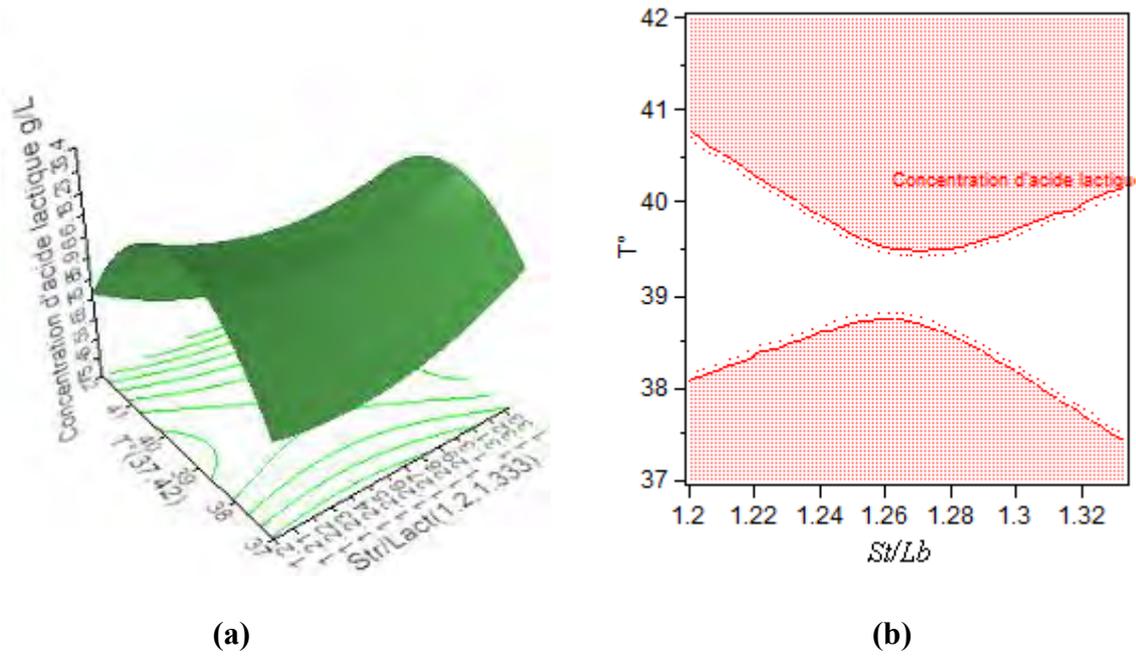


Figure 38: Correlation entre T° et St/Lb sur la concentration d'acide lactique (g/L).

(a):Surface de réponse (b): contour plot.

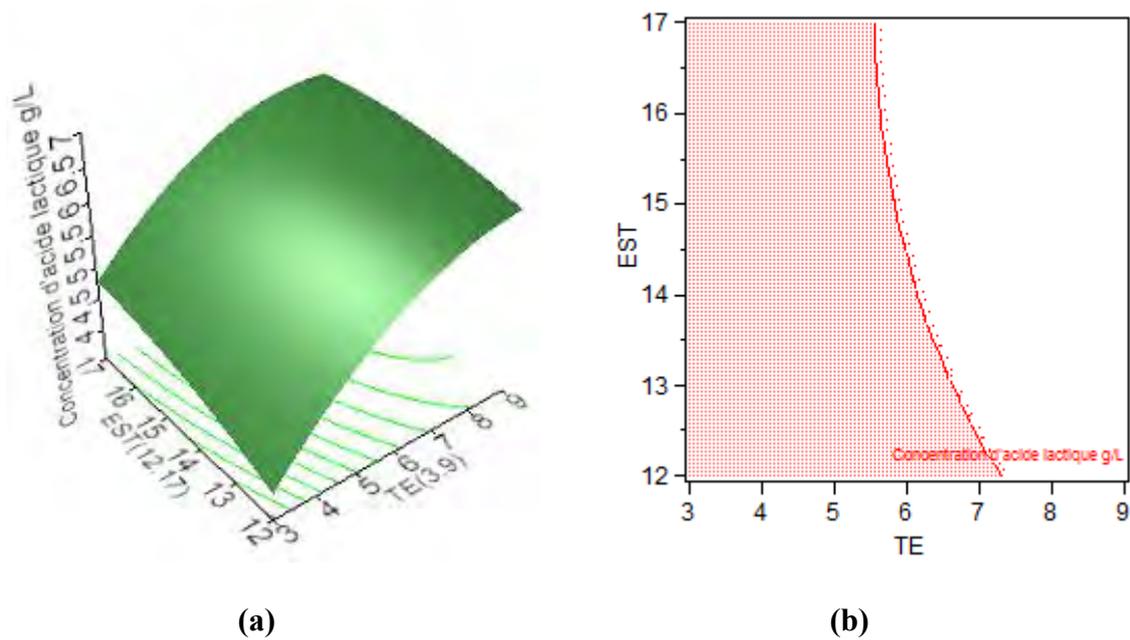


Figure 39: Correlation entre EST et TE sur la concentration d'acide lactique (g/L).

(a):Surface de réponse (b): contour plot.

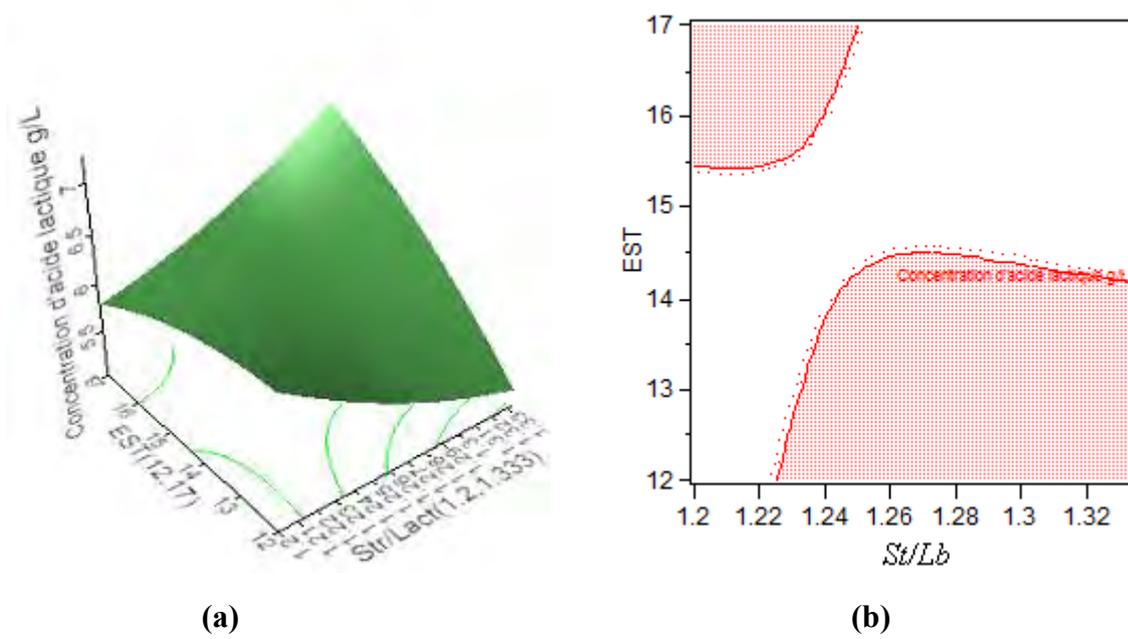


Figure 40: Correlation entre EST et St/Lb sur la concentration d'acide lactique (g/L).

(a):Surface de réponse (b): contour plot.

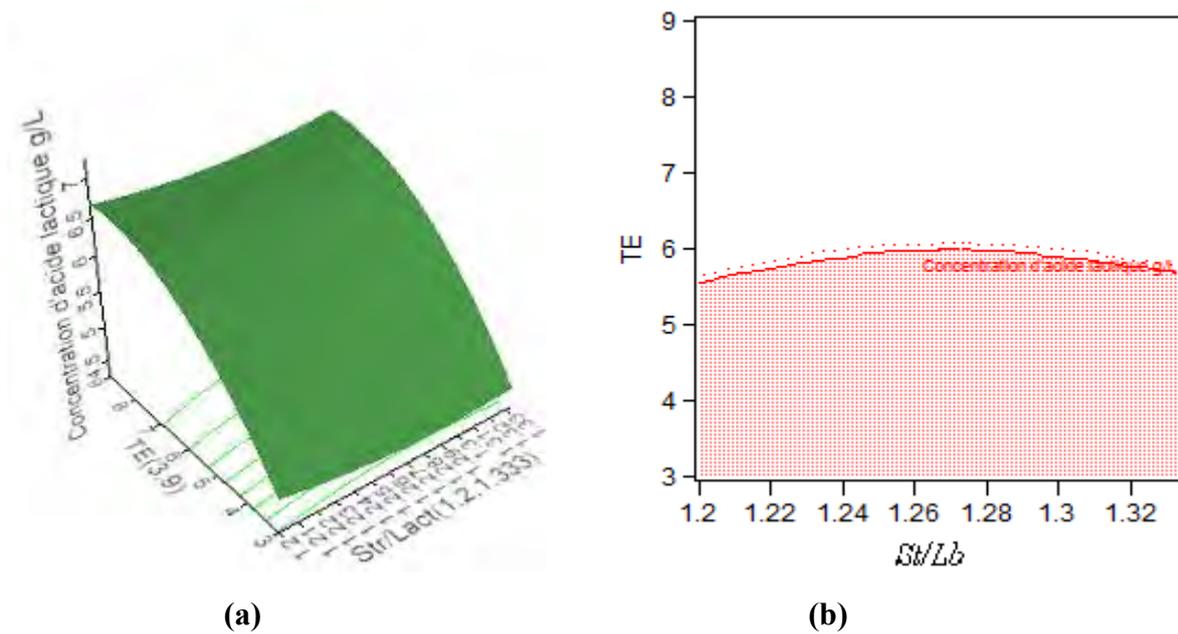


Figure 41: Correlation entre TE et St/Lb sur la concentration d'acide lactique (g/L).

(a):Surface de réponse (b): contour plot.

En analysant ces figures, il ressort que les facteurs étudiés influent d'une manière différente sur la production d'acide lactique par les ferments; la figure 36 montre clairement que la

quantité d'acide lactique produite augmente avec l'augmentation de la valeur de l'extrait sec total, la figure 37 montre aussi que le taux d'ensemencement a un effet positif sur la réponse, d'autre part l'effet du rapport *St/Lb* est commenté faible par rapport aux effets des autres facteurs (figure 38), par contre, l'effet de la température est nettement différent et la production d'acide lactique augmente progressivement avec la température jusqu'à 39°- 40°C puis elle commence à diminuer.

III.2.3. Optimisation du modèle

Les valeurs optimales des différents facteurs ont été obtenues après la résolution de l'équation (1) en utilisant le logiciel JMP 6 Discovery. Les conditions optimales de la production d'acide lactique estimées par l'équation du modèle sont groupées dans le tableau 13.

Tableau 13: Conditions optimales de la production d'acide lactique.

Variables	Valeurs critiques
T° (37- 42°C)	39°C
EST (12 -17%)	14.5%
TE (3 -9%)	9%
<i>St/Lb</i> (1.2/1 -1.6/1.2)	1.37/1.1

La concentration théorique d'acide lactique prévue sous ces conditions est de 6.61 g/L.

III.2.4. Validation du modèle

Afin de vérifier la validité du modèle, les conditions théoriques optimales ont été appliquées. La concentration d'acide lactique obtenue sous ces conditions après 4 heures d'incubation est de 6.2g/L, c'est approximativement 94% de la valeur prévue. Ces résultats obtenus confirment la validité du modèle de Box-Behnken. Ils montrent aussi que l'équation du modèle est satisfaisante et fiable.

Il a été rapporté que la concentration d'acide lactique dans le yaourt étuvé doit atteindre 7.5 à 10 g/L (FAO, 1995), c'est pour cette raison que nous avons prolongé le temps d'incubation jusqu'à 6 h pour obtenir une concentration de 7.8g d'acide lactique /L de lait.

III.3. Fabrication du yaourt nature étuvé et évaluation de sa qualité

III.3.1. Fabrication du yaourt nature étuvé

La mise en œuvre et la commercialisation d'un nouveau ferment nécessite, de nombreux essais à l'échelle industrielle. La performance d'un ferment est estimée par la réalisation de fabrication, tout d'abord en laboratoire ou par micro fabrication, sur de faibles quantités de matières premières.

Lorsque le ferment semble satisfaisant, il est ensuite testé à l'échelle pilote, avec des quantités plus importantes de matières premières et un procédé plus proche d'une production industrielle. Les caractéristiques des produits finis ainsi fabriqués sont alors évaluées et comparées avec celles d'un même produit témoin, préparé avec un ferment de référence (Luquet et Corrieu, 2005).

Deux échantillons de yaourt nature étuvé ont été fabriqués dont l'un à base de lait entier à 28% de matière grasse, sucré à raison de 0.5% et en utilisant le ferment thermophile mixte local (FTM 3), l'autre avec les mêmes composantes mais le ferment est industriel, commercialisé (ST-M6). Un label « *Magilait* », a été attribué au yaourt nature fabriqué, de même un emballage qui comporte toutes les indications réglementaires y compris un code à barre a été choisi (Annexe VII et figure 42).



Figure 42: Aspect des emballages des deux yaourts fabriqués.

III.3.2. Qualité des yaourts au cours de la conservation

III.3.2.1. Qualité physico chimique

a. La post-acidification

Les valeurs du pH et de l'acidité enregistrés pour les deux types de yaourt au cours de la conservation sont illustrées par la figure 43.

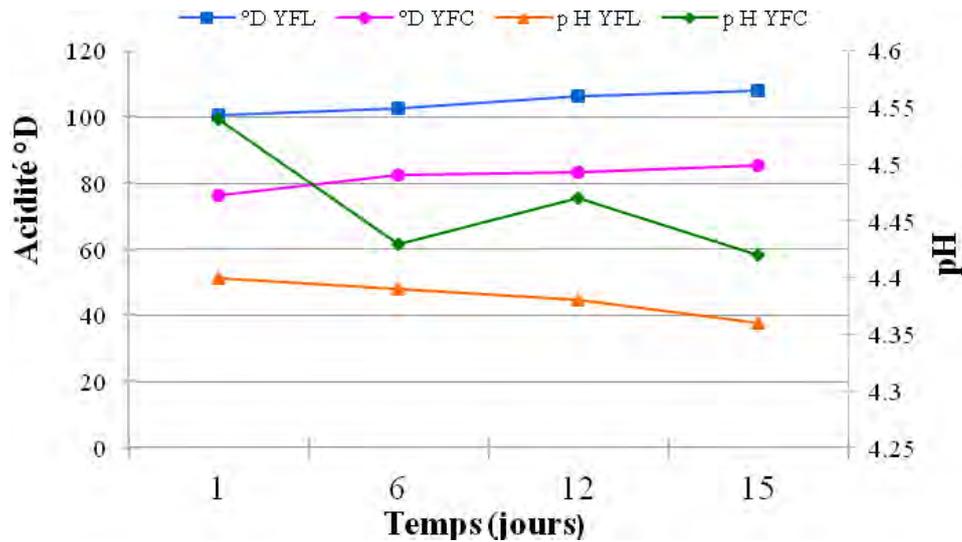


Figure 43: Evolution du pH et de l'acidité dornic.

D'une manière générale, la valeur du pH du yaourt au ferment local (YFL) a été plus faible que celle du yaourt au ferment commercial (YFC), elle a été de 4.40 contre 4.54 pour YFC au début de la conservation, ces deux valeurs diminuent après les 15 jours de conservation pour atteindre une valeur de 4.36 pour le premier yaourt et 4.42 pour l'autre. D'autre part, l'acidité augmente pendant toute la période du contrôle, au premier jour du stockage, la teneur en acide lactique du yaourt à base de ferment local était 10 g /L, celle du yaourt à base du ferment industriel était de 7.65g/L. Après 15 jours de conservation au froid, nous avons enregistré des valeurs d'acidité de 108°D et 85.5°D pour YFL et YFC respectivement.

Les résultats du test de Student ont montré que la différence observée entre les valeurs du pH des yaourts YFL et YFC est très significative ($P = 0.001 < 0.05$). Tandis que ceux du test ANOVA ont montré que cette différence n'est pas significative durant toute la période de stockage. Concernant l'acidité, la différence entre YFL et YFC est très hautement significative ($P < 0.0001$), elle est aussi significative pendant la période du stockage ($P = 0.007 < 0.05$ pour YFC et $P = 0.024 < 0.05$ pour YFL).

Lors d'une étude concernant l'évaluation physicochimique et sensoriel de certains yaourts commercialisés au Nigéria, les valeurs du pH obtenus sont inférieures aux nôtres, elles varient de pH 3.70 à pH 4.33 (**Olugbuyiro et Oseh, 2011**).

Le changement du pH du yaourt pendant le stockage a été rapporté dans plusieurs études. En effet **Dave et Shah (1997a)** ont constaté que généralement, le pH du yaourt diminue avec l'augmentation du nombre des cellules de ferment, ces mêmes auteurs (**1997b**) ont rapporté que le pH des yaourts a diminué après 5 semaines de conservation à 4.16 - 4.40 alors qu'il était à 4.33 et 4.64 au premier jour de conservation.

D'après **Donkor et al. (2006)** pendant le stockage du yaourt au froid, *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* et *St. thermophilus* sont responsables de la production d'acide lactique suite à la fermentation du lactose résiduel.

Selon **Tamime et Robinson (2007)**, l'effet tampon des protéines et d'autres composants comme le phosphate et le citrate cause une augmentation de l'acidité titrable des produits laitiers.

D'après **Enel et al. (2011)** l'acide lactique trouvé principalement dans le sérum séparé, est un composé essentiel qui affecte l'arôme et la saveur caractéristique du yaourt.

Selon **Irkin et Eren (2008)**, L'utilisation des ferments avec une faible proportion de *Lb. bulgaricus* permet d'obtenir un yaourt avec une faible acidité et avec un moindre risque de post-acidification.

b. La synérèse

La synérèse, est définie comme étant la séparation du lactosérum du yaourt sans application d'une force extérieure, en particulier pendant le stockage (**Peng et al., 2009**).

Le sérum de séparation qui se forme dans un produit laitier fermenté est dû à l'agrégation et à la sédimentation des particules de caséine durant le stockage. L'utilisation des stabilisateurs s'avère nécessaire pour prévenir la synérèse surtout pour les boissons à base de lait fermenté (**Towler, 1998**).

La figure 44 montre les changements du taux de la synérèse mesurée durant quinze jours de conservation au froid, le yaourt YFL avec 14.5% d'extrait sec total a montré le niveau de synérèse le plus faible. Au premier jour de stockage, un volume de 0.38 ml de lactosérum /100g de yaourt YFL a été mesuré contre 0.47 ml/100g du yaourt YFC.

Le taux de la synérèse des deux yaourts augmente jusqu'à 0.72ml/100g et 1.06ml/100g pour YFL et YFC respectivement après douze jours de conservation, cependant, nous avons noté

une diminution remarquable du volume de lactosérum séparé aux quinzies jours, avec 0.29 ml/100g du yaourt YFL et 0.81ml/100g du yaourt YFC.

L'analyse statistique des résultats a montré que le volume de lactosérum séparé n'évolue pas d'une manière significative au cours de la conservation (ANOVA $P= 0.21$ pour YFL et 0.10 pour YFC) ainsi qu'entre les deux produits (test Student, $P =0.06 > 0.05$).

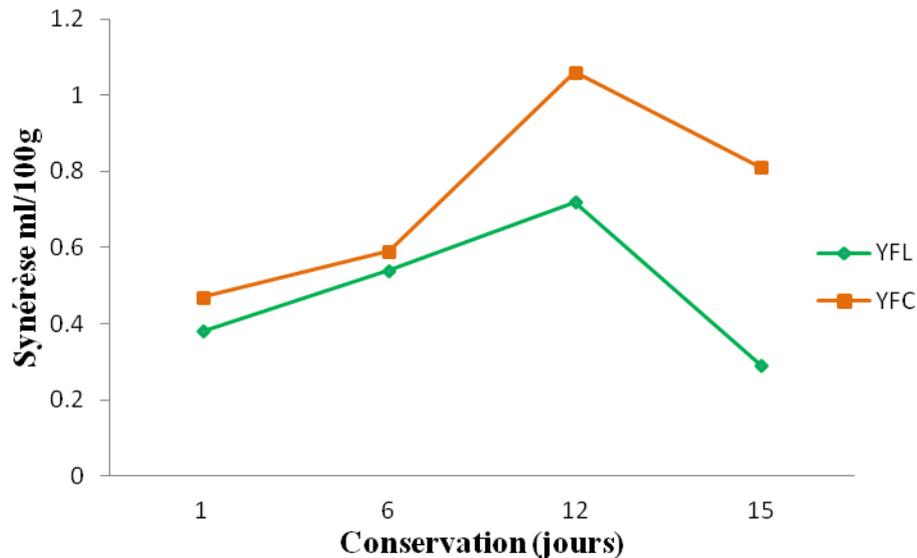


Figure 44 : Evolution de la synérèse pendant la conservation.

Dans une étude réalisée par **Olson et Aryana (2008)**, le sérum évacué pendant les deux premières semaines de stockage atteint 23.5 -24.5 ml/100g du yaourt, ces résultats sont largement supérieurs à ceux trouvés dans notre étude.

Les résultats obtenus peuvent s'expliquer selon **Vignola (2002)** de façon qu'une faible teneur en solides totaux puisse causer une synérèse qui se manifeste par une séparation entre le sérum et la structure solide, causant une accumulation de liquide à la surface du gel. Pour donner une consistance et une viscosité valable au yaourt en évitant la synérèse, le mélange doit être contenir assez de solide totaux (pour un yaourt ferme on parle, d'entre 14 et 15%, pour un yaourt brassée d'entre 11.5% et 12%).

D'autre part, La synérèse fournit une indication de la non-homogénéité dans le gel du yaourt, ainsi, une séparation plus élevée de lactosérum est liée à l'instabilité du gel qui est également liée au pH du yaourt (**Lucey et Singh, 1998**). En effet, lors de l'homogénéisation du lait, les caséines et les protéines de lactosérum forment une nouvelle couche extérieure sur la surface des globules gras, qui augmente le nombre de groupements participant à la structure du yaourt (**Walstra, 1998**).

Récemment, l'utilisation de l'ultra-haut homogénéisation de pression 200 à 300 MPa a été étudiée pour la production du yaourt. Ce type d'homogénéisation augmente la fermeté de yaourt et la capacité de rétention d'eau (Serra et al., 2008 ; 2009 a, b).

Selon Lucey (2001), la séparation du lactosérum résulte du réarrangement excessif des molécules constituant le réseau protéique, elle est aussi affectée par les différents paramètres rhéologiques.

Lee et Lucey (2004) ont rapporté que la quantité de lactosérum séparé diminuée avec l'augmentation du taux d'inoculation, les résultats obtenus dans notre étude peuvent s'expliquer par ce qui est rapportés par ces deux auteurs.

c. Evolution des taux de la matière sèche, organique et minérale

En analysant les figures 45, 46 et 47, il ressort que les matières sèche, organique et minérale des deux types du yaourt présentent une diminution progressive durant les 15 jours du stockage à 4°C.

Au premier jour de conservation, la valeur de la matière sèche était de 15% pour la yaourt à base de ferment local (YFL) et de 12.7% pour celui à base de ferment industriel (YFC), ensuite, ces valeurs chutent progressivement au cours de la conservation jusqu'à 13.9% et 11.9% pour YFL et YFC respectivement, d'où la perte la plus élevée a été enregistrée pour le yaourt YFL.

Il est important de rappeler que le taux d'extrait sec total des laits utilisés était différent, 14.5% pour YFL et 12% pour l'autre.

D'après l'arrêté interministériel du 16 *Jumada Ethania* 1419 correspondant au 7 octobre 1998 relatif aux spécifications techniques des yaourts et aux modalités de leur mise à la consommation, la teneur minimale en matière sèche laitière non grasse du yaourt doit être égale à 8,2 % masse par masse.

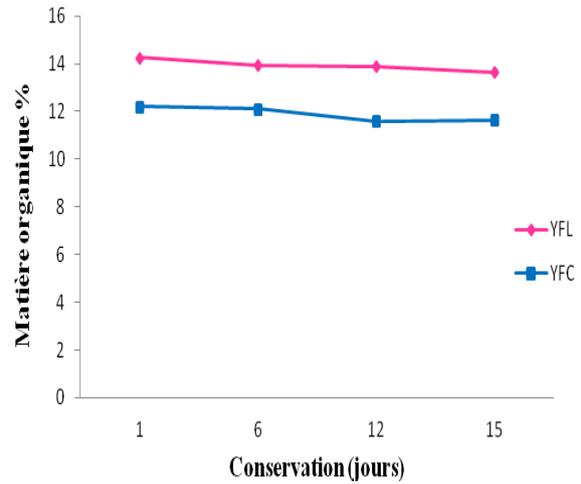
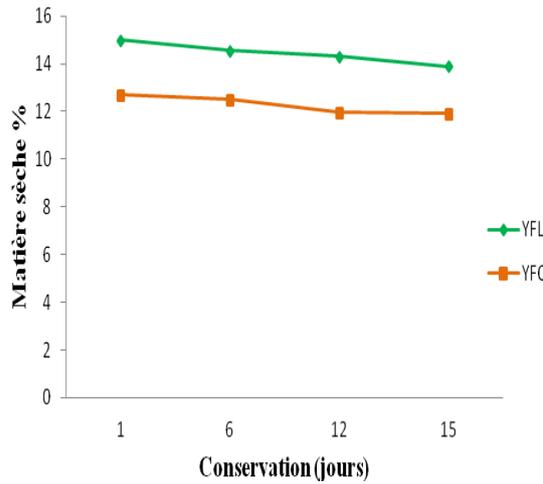


Figure 45 : Evolution de la matière sèche.

Figure 46 : Evolution de la matière organique.

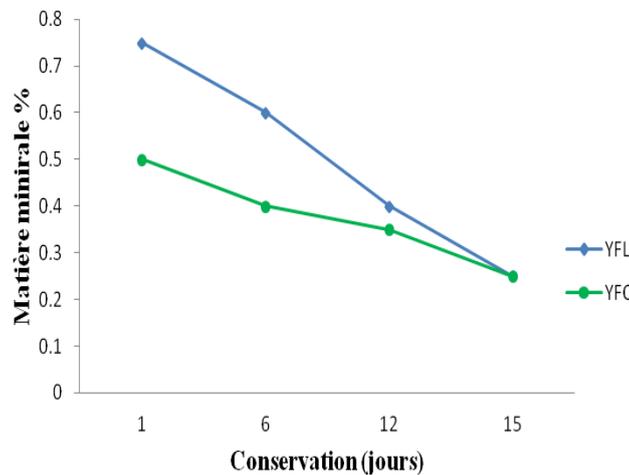


Figure 47: Evolution de la matière minérale.

Le taux des minéraux a connu aussi une diminution remarquable qui a été plus élevée dans le yaourt YFL de l'ordre de 0.5% tandis que la perte dans le yaourt codé YFC a été de l'ordre de 0.25%, de ce fait ; on peut dire que la durée de conservation et l'activité de ferment provoquent des pertes en cendre du produit fini. Nos résultats sont nettement inférieure à ceux trouvés par **Ozer et al. (1998)** qui sont compris entre 0.98 et 1.30% pour des yaourts fabriqués à base d'un lait concentré par ultrafiltration. En outre, **Chibane (2007)** a trouvé des teneurs en cendres de 0.71% pour le yaourt nature.

De même, la matière organique a diminué après les 15 jours de conservation, elle chute de 14.25% à 13.65% pour YFL et de 12.2% à 11.65% pour YFC.

Concernant le yaourt YFL, les résultats du test ANOVA ont montré que le taux de matières sèche, organique et minérale diminue d'une manière significative pendant la période de

conservation ($P < 0.0001$, $P = 0.03$, $P = 0.03$ respectivement), tandis que, ceux du yaourt YFC n'ont montré aucune évolution significative ($P = 0.2$, $P = 0.5$ et $P = 0.5$ respectivement). D'autre part, les résultats du test Student ont montré une différence très hautement significative ($P < 0.0001$) entre les deux yaourts en ce qui concerne les matières sèche et organique, en revanche aucune différence significative n'a été obtenue avec les résultats de la matière minérale ($P = 0.38 > 0.05$).

III.3.2.2. Qualité microbiologique

a. Viabilité des ferments lactiques

Les résultats du dénombrement des flores lactiques des deux yaourts sont résumés dans le tableau 14, la viabilité de ces ferments est représentée par la figure 48.

Tableau 14 : Evolution du nombre de germes viables du ferment au cours du stockage.

Jours de conservation	Nombre de cellules viables UFC/g	
	YFL	YFC
J1	2.82×10^{10}	1.32×10^{10}
J6	2.32×10^{10}	0.87×10^{10}
J12	1.91×10^{10}	0.81×10^{10}
J15	1.75×10^{10}	0.69×10^{10}

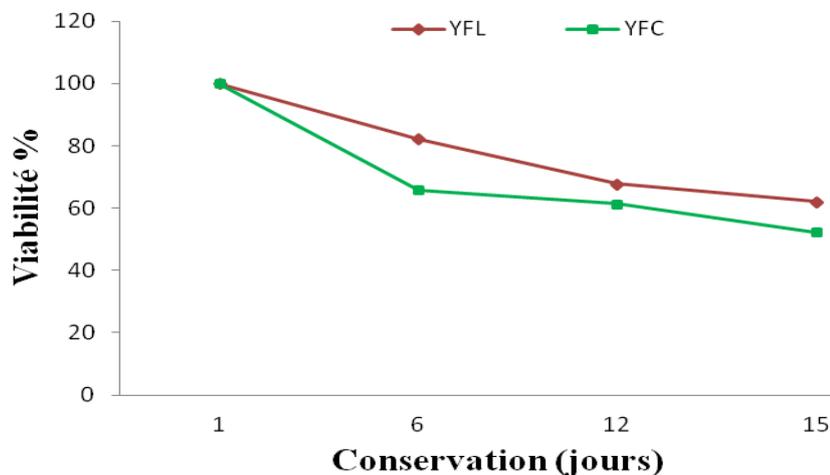


Figure 48: Viabilité des ferments lactiques utilisés dans la fabrication des yaourts.

D'après ces résultats, il apparaît que le nombre de cellules viables de ferment local FTM 3 dans le yaourt YFL soit nettement supérieure à celui de ferment industriel ST-M6, d'où nous avons enregistré un nombre de 2.82×10^{10} UFC /g par rapport à 1.32×10^{10} UFC/g au premier jour de la conservation, il ressort aussi que le nombre de cellules viables dans les deux yaourts a diminué pendant la durée de conservation pour atteindre 1.75×10^{10} UFC/g et 0.69×10^{10} UFC/g pour YFL et YFC respectivement. Ces différences de nombre de cellules viables entre les deux types du yaourt peuvent être dues au taux d'ensemencement qui était 3% pour le yaourt YFC et 9% pour le yaourt YFL, il se peut également qu'il soit lié au rapport *St/Lb* car il était de 1.2/1 pour le premier yaourt et 1.37/1.1 pour l'autre.

Les résultats du test ANOVA ont montré que la différence entre la viabilité des ferments FTM 3 et ST-M6 est significative durant toute la période de stockage à 4°C ($P = 0,006 < 0,05$ et $0.003 < 0.05$ respectivement), par contre, les résultats du test de Student n'ont montré aucune différence significative entre la viabilité de ces deux ferments ($P = 0.06 > 0.05$).

La diminution de nombre des cellules viables lors du stockage à 4°C peut s'expliquer selon plusieurs auteurs, **Lankaputhra et al. (1996b)** ont démontré que l'acidité, le pH et le peroxyde d'hydrogène ont un effet pendant la fabrication et le stockage de yaourt, **Akalin et al. (2004)** et **Kailasapathy (2006)** ont également constaté qu'un léger déclin dans le pH pendant le stockage était peu susceptible d'affecter la viabilité. D'autres facteurs, tels que la température de stockage, et les différentes concentrations d'acide lactique, sont présumés des facteurs qui affectent la viabilité des microorganismes du yaourt. **Vinderola et al. (2000)** ont rapporté que la concentration élevée des sucres peut affecter la viabilité des lactobacilles.

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

Cependant, il a été rapporté que la teneur en matière grasse du lait affecte la viabilité des ferments. En effet, les résultats de l'étude menée par **Birollo et al. (2000)** ont montré que les yaourts à base du lait écrémé ont présenté un nombre de cellules viables plus élevés que celui des yaourts entiers.

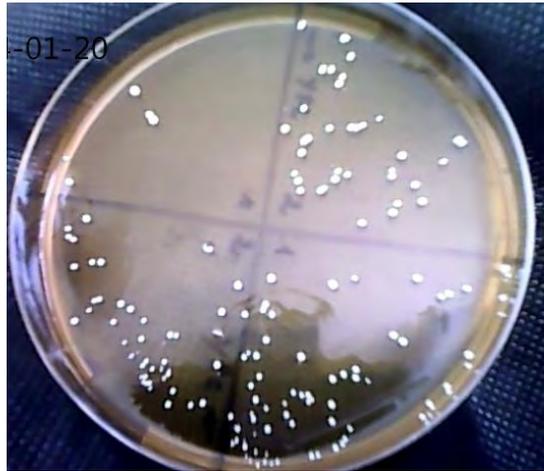


Figure 49 : Ferments lactiques au premier jour de conservation.

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

Récemment, des concentrations dans la gamme de 10^8 - 10^9 UFC/g de produit, à la fin de sa durée de conservation, ont été recommandées pour compenser la perte de viabilité qui a lieu lors du passage dans le tract gastro-intestinal (**Versalovic et Wilson, 2008**). Ces souches devraient être viables sans se multiplier pour ne pas provoquer d'effet indésirable sur le goût ou l'arôme du produit ni augmenter l'acidité (**Mattila-Sandholm et al., 2002**).

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

Des études ont prouvé que les bactéries de yaourt (*St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*) sont capables de maintenir leur viabilité dans ce produit pendant toute la durée de conservation (**Akalin et al., 2004**).

b. Recherche et dénombrement de la flore de contamination

Les résultats de la recherche et le dénombrement des contaminants dans les deux types de yaourt durant la période de conservation sont récapitulés dans le tableau 15 :

Tableau 15: Evaluation de la qualité microbiologique pendant la conservation.

Flores	Produits	Jours de conservation				Norme
		J1	J6	J12	J15	Algérienne
CT	YFL	00	00	00	00	10 /g
	YFC	00	00	00	00	
CTT	YFL	00	00	00	00	1/g
	YFC	00	00	00	00	
Salmonella	YFL	Abs	Abs	Abs	Abs	Absence /25g
	YFC	Abs	Abs	Abs	Abs	
Staphylococcus aureus	YFL	00	00	00	00	10/g
	YFC	00	00	00	00	
La flore indologène	YFL	00	00	00	00	/
	YFC	00	00	00	00	
Levures	YFL	00	00	00	00	<10²/g
	YFC	00	00	00	00	
Moisissures	YFL	Abs	Abs	Abs	Abs	Absence/g
	YCF	Abs	Abs	Abs	Abs	

La lecture des résultats du tableau, montre une absence totale des différentes flores d'altération des yaourts. Ces résultats sont probablement liés à l'effet du traitement thermique appliqué qui était suffisant pour détériorer la majorité des germes pathogènes présent dans le lait (Tamine, 2002; Olson et Aryana, 2007), d'où la bonne réussite de l'application des bonnes pratiques de fabrication. Cependant, il se peut que la durée de conservation du yaourt fût insuffisante pour qu'il y à apparition de germes d'altération. De même, il se peut que les composés antimicrobiens produits par la flore lactique aient une influence sur la stabilité microbiologique du produit, en effet, selon Chamba (2008), le pH bas des produits fermentés peut avoir un effet inhibiteur vis-à-vis des microorganismes responsables de la détérioration,

cet effet est aussi dû à certains composés comme le peroxyde d'hydrogène. Cependant, il n'est pas exclu que des souches particulières d'une espèce de bactérie indésirable puissent se développer.

Une étude réalisée par **Nogueira et al. (1998)** concernant la qualité microbiologique de certains yaourts naturels Portugais a montré la détection de $6,8.10^2$ UFC de moisissures /g et moins de 10^2 UFC de levures /g avec une absence totale des coliformes.

Le dénombrement des coliformes est employé pour évaluer la qualité hygiénique de yaourt dans différents pays (**Tamine et Robinson, 2007**). **Rodrigues et al. (2010)** ont trouvé un faible niveau de contamination par les coliformes dans un yaourt commercialisé en Brésil.

L'absence totale de la flore indologène, des staphylocoques et des salmonelles durant toute la période de stockage indique l'état de propreté de l'ambiance environnante lors de la fabrication, et implique les bonnes pratiques de fabrication.

D'autre part, les levures représentent la cause principale de la détérioration du yaourt et les laits fermentés dans lesquels le pH bas fournit un environnement sélectif pour leur croissance (**Oyeleke et al., 2009**).

Un yaourt produit dans les bonnes conditions de la fabrication ne doit pas contenir plus de 10^6 cellules de levure et devraient avoir une durée de vie de 3-4 semaines à 5 °C. Cependant, un yaourt contient plus de 10^6 UFC/g tend à se détériorer rapidement (**Ledenbach et Marshall, 2009**). On peut dire alors, que l'absence totale de ces microorganismes dans nos produits témoigne la bonne conduite de la fabrication.

Par comparaison de nos résultats aux normes du journal officiel de la République Algérienne n° 35, les deux types de yaourts produits sont de bonne qualité microbiologique.

III.3.2.3. Evaluation sensorielle descriptive

Le yaourt est l'un des produits laitiers le plus consommé mondialement, ses caractéristiques sensorielles peuvent avoir un grand effet sur l'acceptabilité par le consommateur (**Saint-Eve et al., 2006**).

Huit panélistes ont été sélectionnés pour mener à bien cette évaluation sensorielle, chaque attribut est mesuré selon une échelle d'intensité de 0 à 15, où 0 est la pondération d'un caractère non détecté et 15 correspond à un caractère détecté extrêmement fort. Les résultats de cette analyse du début jusqu'à la fin de conservation sont groupés dans le tableau 16. La figure 50 montre l'aspect visuel des yaourts destinés à l'analyse sensorielle.



Figure 50 : Aspect visuel des yaourts destinés à l'analyse sensorielle.

Tableau 16: Résultats de l'analyse descriptive au début et à la fin de la conservation.

Attribut	Moyennes des notes attribuées			
	YFL		YFC	
	T _{J1}	T _{J15}	T _{J1}	T _{J15}
Quantité de lactosérum	7.37	4.50	7.62	6.87
Granulosité	5.37	6.25	4.00	7.25
Epaisseur	9.00	6.37	8.00	7.25
Onctuosité	7.00	8.37	8.75	9.25
Fermeté	10.75	11.00	10.75	11.75
Couleur blanchâtre	8.50	9.00	10.12	9.50
Goût de cuit	2.12	2.25	2.62	2.25
Goût acide	7.00	8.37	6.62	6.87
Goût sucré	2.00	0.87	2.25	1.25
Intensité d'odeur	7.00	7.62	6.75	6.91
Arrière goût	7.25	6.75	7.50	7.62

D'une manière générale, les deux produits sont jugés acceptables, le yaourt à base du ferment commercial (YFC) a été apprécié par six sur huit membres du panel, nous pouvons déclarer aussi qu'après quinze jours de conservation, certains panélistes ont préféré l'autre type de yaourt qui n'ont pas apprécié au début de la conservation.

Les scores les plus élevés sont attribués à la fermeté, tandis que les plus faibles sont attribués au goût de cuit et au goût sucré, il est intéressant de noter aussi que selon le panel de

dégustation, les caractéristiques organoleptiques des yaourts analysés ont changé au cours de la période de conservation.

D'après les résultats du panel d'évaluation, le yaourt YFL a présenté le taux de synérèse le plus faible, ce dernier a diminué aux quizièmes jours de conservation, ceci a été confirmé par les mesures physiques.

Selon **Lee et Lucey (2010)**, les caractéristiques physiques y compris la séparation du lactosérum sont des aspects importants de la qualité sensorielle et de l'acceptation chez le consommateur du yaourt.

La granulosité a été plus élevée au niveau du yaourt à base de ferment local, caractérisée par un score de 5.37, ceci pourrait être dû à des différences de composition entre les deux yaourts, en effet, la granulosité est apportée par les agrégats de protéine dont la taille est de 1 à 5mm.

Tous les sujets ont différencié les deux yaourts par le caractère épais, le panel a statué que l'intensité pour comprimer le gel du yaourt est plus importante avec les échantillons YFL.

Il ressort que le panel a préféré le yaourt YFC au terme d'onctuosité, caractérisé par un score de 8.75 comparativement à celle du yaourt YFL où le score était de 7.00. Cependant, après quinze jours de conservation, ces scores deviennent plus élevés.

Concernant la fermeté des gels formés, nous avons enregistré un meilleur score de 10.75 pour les deux types, les panélistes ont observé que ce caractère évoluait le long de la conservation, ils ont attribué un score de 11 pour YFL et 11.75 pour YFC. Selon **Lee et Lucey (2010)**, l'utilisation du saccharose augmente les solides totaux du mélange et renforce le réseau du gel, donc l'addition de ce sucre à des concentrations adéquates peut améliorer la fermeté de nos produits. D'autre part, **Walstra (1998)** ont rapporté que lors de l'homogénéisation du lait les globules de graisse étaient en partie couverts par la caséine, cela constitue un gel beaucoup plus ferme.

Selon le panel interrogé, les deux yaourts n'ont pas vraiment une couleur blanchâtre, le yaourt YFC a présenté une couleur plus claire que celle de YFL, ceci peut être dû au fait que nos yaourts sont riches en matière grasse (28%) ou bien à l'absence d'une étape d'homogénéisation lors de la reconstitution et la recombinaison du lait, en effet, **Vedamuthu (1991)** a rapporté que cette opération augmente la blancheur et l'uniformité des yaourts.

D'après les résultats du tableau, le goût de cuit gagne le plus faible score (au voisinage de 2), ceci constitue un point positif quant à la qualité de nos produits. Par ailleurs, en matière d'acidité et d'après le commentaire du groupe dégustateur, le yaourt YFL était plus acide que

YFC et cette acidité augmente pendant la conservation, ces résultats ont été confirmés par la détermination de l'acidité dornic.

Lors de la fabrication, nous avons additionné une faible quantité de saccharose à raison de 0.5%, cette concentration n'a pas été détectée par la plupart des dégustateurs, c'est pourquoi, le caractère sucré n'a gagné que 2 points. Compte tenu de l'échelle d'évaluation qui s'étale sur 15, cette sensation est devenue négligeable durant le stockage (0.87 pour YFL).

L'arôme du yaourt est un des caractères appréciés par les consommateurs. D'après les membres du jury, il n'existe aucune différence entre les deux yaourts (7 pour YFL et 6.75 pour YFC), cependant, il est à noter que ce caractère a connu une évolution au cours de la conservation.

Enfin, le groupe de dégustateur a ressenti un certain arrière-goût dans nos produits, il a attribué un score de 7.25 au yaourt YFL et un autre de 6.75 à celui codé YFC, il a mentionné également que ce caractère a changé et qu'il a devenu plus intense dans le yaourt YFC après quinze jours de stockage.

En ce qui concerne l'analyse statistique, les résultats de test Student ont montré que la variation de chaque attribut est non significative ($P > 0.05$) que ce soit entre les deux types de yaourts au premier puis au dernier jour de conservation ou bien entre les valeurs obtenues pour chaque yaourt.

Selon **Paseephol et Sherkat (2008)**, divers facteurs à savoir la qualité, la composition de lait et de sa matière grasse, le taux d'extrait sec total, le traitement thermique de lait, les interactions des bactéries lactiques utilisées, le taux d'acidification de lait et le temps d'entreposage, ont tous un effet sur la texture et les propriétés sensorielles du yaourt.

Conclusion et
perspectives

L'industrie de fabrication du yaourt en Algérie est fortement dépendante des marchés extérieurs des matières premières, en particulier les ferments utilisés à cette fin.

L'objectif de ce travail peut se résumer en trois parties : l'étude des aptitudes technologiques ainsi la résistance aux antibiotiques de trois ferments thermophiles mixtes locaux et d'un ferment commercial, l'optimisation de la fermentation par le modèle de Box Behnken et enfin, la production d'un yaourt nature étuvé suivi d'un contrôle de sa qualité durant la conservation.

D'après les résultats de l'étude des aptitudes technologiques, nous avons pu déduire que deux parmi les trois ferments locaux mis aux tests présentent de bonnes aptitudes technologiques (protéolytique, texturante, aromatisante, lipolytique et antagonistique) comparativement au ferment commercial et à l'exception de l'activité acidifiante qui a été jugée faible. D'autre part, le ferment thermophile mixte local codé FTM 3 a montré les meilleures performances technologiques. Concernant la résistance aux antibiotiques, les résultats indiquent que tous les ferments locaux n'ont résisté qu'à la Colistine sulfate.

S'appuyant sur ces résultats, nous avons réalisé un plan d'expérience en utilisant le modèle de Box Behnken à quatre facteurs à savoir la température, l'extrait sec total, le taux d'ensemencement et le rapport *St/Lb*, nous avons obtenus une matrice composé de vingt sept expériences qui sont toutes réalisés en utilisant le ferment FTM 3, les résultats obtenus ont été analysés par le logiciel JMP 6 Discovery, cette analyse nous a donné l'optimum de chaque facteur étudié.

Afin de tester la validité du modèle appliqué, nous avons réalisé une expérience en respectant les valeurs données par le logiciel pour chaque facteur, le résultat de cette expérience a confirmé la validité du modèle avec une bonne production d'acide lactique après six heures d'incubation.

Ces résultats ont été donc concrétisés lors de la fabrication d'un yaourt nature à base du lait entier avec le starter local FTM 3, ce yaourt a eu comme label « Magilait », en parallèle un yaourt témoin avec usage d'un ferment industriel a été fabriqué.

Le suivi de l'évolution de la qualité de ces deux produits pendant quinze jour de conservation à 4°C, a montré une augmentation de l'acidité accompagnée d'une diminution du pH pour les deux types de yaourt, la synérèse s'est apparue moins élevée dans le yaourt expérimental et augmente jusqu'aux douzièmes jours de la conservation. Quant aux matières, sèche,

organique et minérale, il s'est avéré qu'elles étaient plus élevées dans le yaourt expérimental, et elles ont tendance à diminuer progressivement le long du stockage.

Pour la qualité microbiologique, l'étude de la viabilité des ferments lactiques a montré que le nombre a diminué pendant la période de conservation mais reste dans les normes de la réglementation Algérienne, le pourcentage de la viabilité était plus élevé dans le yaourt expérimental.

Concernant la recherche et le dénombrement des germes de contamination, les résultats ont montré une absence totale des microorganismes réglementés, ce qui confirme la bonne qualité microbiologique et hygiénique de nos produits.

Quant à l'analyse sensorielle, parmi un panel composé de huit membres, six ont apprécié le yaourt à base de ferment industriel, ils ont mentionné que la qualité des deux yaourts a changée pendant les quinze jours de stockage.

Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives. Donc pour compléter ce travail sur ces ferments thermophiles mixtes, nous proposons :

- ✓ Une identification moléculaire des souches;
- ✓ Ces ferments peuvent faire l'objet d'une étude du comportement vis-à-vis des traitements de conservation, la congélation et la lyophilisation et d'une meilleure caractérisation de leurs activités enzymatiques, car la qualité des produits fermentés passe par une meilleure connaissance des activités métaboliques ;
- ✓ Une étude approfondie sur la nature des EPS et des molécules inhibitrices produits par ces ferments ;
- ✓ Breveter les souches.

Références
bibliographiques

4

Adam M.R. et Mass M.O., 1999. Food microbiology. 2nd Edition, Royal Society of Chemistry.

Adesokan I. A., Ekanola Y. A. et Okanlawon B. M., 2010. Influence of cultural conditions on hydrogen peroxide production by lactic acid bacteria isolated from some Nigerian traditional fermented foods. *African Journal of Microbiology Research*, **4**, 1991-1996.

Ahuja S.K., Ferreira G.M. et Morreira A.R., 2004. Application of Plackett and Burman design and response surface methodology to achieve exponential growth of aggregated shipworm bacterium. *Biotechnology and Bioengineering*, **85**, 666-675.

Akalin A. S., Fenderya S. et Akbulut N., 2004. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharids during refrigerated storage. *International Journal of Food Science*, **39**, 613-621.

Akpinar A., Yerlikaya O. et Kiliç S., 2011. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish homemade yoghurts. *African Journal of Microbiology Research*, **5**, 675-682.

Al-Otaibi M.M., 2009. Evaluation of some probiotic fermented milk from el ahsa markets, Saudi Arabia. *American Journal of Food Technology*, **4**, 1-8.

Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Coccagn- Bousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillaud I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdou-Maréchal R. et Yvon M., 2008. Métabolisme et ingénierie métabolique. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec et Doc, Lavoisier*, Paris, France.

Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P. et Simpson R., 2002. Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse. In : Science et technologie du lait, transformation du lait (Vignola C. L), 2^{ème} Edition, *Lavoisier*, Paris, France.

Ammor M.S., Flórez A.B. et Mayo B., 2007. Antibiotic resistance in nonenterococcal lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *Food Microbiology*, **24**, 559-570.

Amrane A., 2001. Lactic acid production during the associated and the deceleration growth phases of *Lactobacillus helveticus* cultivated in various conditions and media. *Lait*, **81**, 91-103.

Analie L.H. et Viljoen B.C., 2001. Review: Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, **11**, 1-17.

Andrew P., Laws., Valerie M. et Marshall V.M ., 2011. The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with rropy strains of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **11**, 709-721.

Anonymes ., 2005. Statistiques de la consommation du yaourt en Algérie. Ministère du commerce.

Aryana K.J. et McGrew P., 2007. Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. *Food Science and Technology*, **40**, 1808-1814.

Aslim B., Beyatli Y. et Yuksekdog Z.N., 2006. Productions and monomer compositions of exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditional home-made yoghurts and raw milk. *International Journal of Food Science and Technology*, **41**, 973–979.

Aslim B., Yuksekdog Z.N., Sarikaya E. et Beyatli Y., 2004. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT- Food Science and Technology*, **1**, 1-4.

Axelsson L., 1998. “Lactic acid bacteria: classification and physiology” Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 2nd Edition, *Marcel Dekker*, New York, USA.

B

Badel S., Bernardi T. et Michaud P., 2011. A New perspective for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, **29**, 54–66.

Barefoot S.F. et Klaenhammer T.R., 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **45**, 1808-1815.

Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. et Obert J.P., 2008. Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. *Tec et Doc, Lavoisier*, Paris, France.

Béal C., Skokanova J., Latrille E., Martin N. et Corrieu G., 1999. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. *Journal of Dairy Science*. **82**, 673–681.

Beerens H. et Luquet M.F., 1987. Guide pratique d'analyse microbiologique des laits et produits laitiers. *Tec et Doc, Lavoisier*, Paris, France.

Bennama R., Rechidi-Sidhoum N. et Bensoltane A., 2011. Effect of threonine on growth and acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *World Applied Sciences Journal*, **15**, 160-163.

Bennama R., Ladero V., Alvarez M.A., Fernández M. et Bensoltane A., 2012. Influence of Lactose and Sucrose on Growth and Acetaldehyde Production by Three Strains of *Streptococcus thermophilus*. *International Conference on Applied Life Sciences (ICALS2012)* Turkey, 223-227.

Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S. et Gueguen M., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, **126**, 278-285.

Bielecka M. et Majkowska A., 1998. Survival of synergistic sets of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cultures during spray drying of yogurt. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, **48**, 267-274.

Biorollo G.A., Reinheimer J.A. et Vinderola C.G., 2000. Viability of lactic acid microflora in different types of yogurt. *Food Research International*, **33**, 799-803.

Bongers R.S., Hoefnagel M.H.N. et Kleerebezem M., 2004. High-level acetaldehyde production in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 1109-1113.

Bonnefoy C., Guillet F., Leyral G. et Verne-Bourdais E., 2002. Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. *Doin, Biosciences et techniques*. Paris, France.

Bouzar F., Cerning J. et Desmazeaud M., 1997. Exopolysaccharide production and texture-Promoting abilities of mixed strain starter cultures in yogurt production. *Journal of Dairy Science*, **80**, 2310-2317.

Box G.E.P. et Behnken D.W., 1960. Some new three-level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, **2**, 455-75.

Broadbent J.R., McMathon D.J., Welker D.L., Oberg C.J. et Moineau S., 2003. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science*, **86**, 407-423.

Bronner F. et Pansu D., 1999. Nutritional aspects of calcium absorption. *Journal of Nutrition*, **129**, 9-12.

C

Callaway T. R., Edrington T. S., Anderson R. C., Harvey R. B., Genovese K. J. et Kennedy C. N., 2008. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. *Animal Health Research Reviews*, **9**, 217-225.

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

Chamba J.F., 2008. Application des bactéries lactiques lors des fabrications fromagères, *In: Bactéries lactiques De la génétique aux ferments* (Corrieu, G., Luquet, F.M.). *Tec et Doc, Lavoisier*, Paris, France.

Chamba J.F., 1990. Pas de piston pour les bactéries lactiques thermophiles. *Lait*, **492**, 47-50.

Charlier C., Cretenet M., Even S. et Leloir Y., 2009. Interaction between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, **131**, 30-39.

Chaves A.C.S.D., Fernandez M., Lerayer A.L.S., Mierau I., Kleerebezem M. et Hugenholtz J., 2002. Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 5656-5662.

Cheriguene A., Chougrani F. et Bensoltane A., 2006. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from goat's Algerian milk. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **9**,1242-1249.

Chibane H., 2007. Aptitudes Technologiques de Quelques Variétés Communes de Dattes : Formulation d'un Yaourt Naturellement Sucré et Aromatisé. Thèse de doctorat spécialité génie alimentaire, Université de Boumerdès, 127p.

Cintas L.M., Casaus M.P., Herranz C., Nes I.F. et Hernández P.E., (2001). Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology*, **7**,281–305.

Clark S. et Plotka V.C., 2004. Yoghurt and sour cream: operational procedures and processing equipment. In: Handbook of food and beverage fermentation technology (Taylor C.R.C. et Francis G.,) New York, USA.

Courtin P. et Rul F., 2004. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait*, **84**, 125-134.

Courtin P., Monnet V. et Rul F., 2002. Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology*, **148**, 3413-3421.

Committee on Specification of Food Chemicals Codex of the Committee on Food Protection (CSFCCCFP), 1972. National Research Council. Food Chemicals Codex. 2nd Edition. Washington (DC).

D

Daeschel M.A., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, **43**,164–167.

Dave R. I. et Shah N.P., 1997. Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, **7**, 435-443.

Dave R. I. et Shah N.P., 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Journal of Dairy Science*, **81**, 2804–2816.

Dave R.I. et Shah N.P., 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, **17**, 31-41.

De Vuyst L. et Degeest B., 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*, **23**, 153-177.

De Vuyst L. et Tsakalidou E., 2008. *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *International Dairy Journal*, **18**, 476 - 485.

De vuyst L., Zamfir M., Mozzi F., Adariany T., Marshall V., Degeest B. et Veningelgem F., 2003. Exopolysaccharide producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. *International Dairy Journal*, **13**, 707 - 717.

Degeest B. et De Vuyst L., 2000. Correlation of activities of the enzymes α -phosphoglucosyltransferase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 3519–3527.

Devlieghere F., Vermeiren L. et Debevere J., 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *Rev. International Dairy Journal*, **14**, 273-285.

Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi Z. et Bennamoun L., 2006. Application of a statistical design to the optimisation of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal Food Engineering*, **73**, 190-197.

Doleyres Y., Schaub L. et Lacroix C., 2005. Comparaison of the functionality of exopolysaccharides produced in situ or added as bioingredients on yogurt properties, *Journal of Dairy Science*, **88**, 4146-4156.

Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T. et Shah N.P., 2006. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, **16**, 1181-1189.

Drake M.A., Karagul-Yuceer Y., Cadwallader K., Civille G.V. et Tong P.S., 2003. Determination of the sensory attributes of dried milk powders and dairy ingredients. *Journal of Sensory Studies*, **18**, 199-216.

Duboc Ph. et Mollet B., 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry, *International Dairy Journal*, **11**, 759–768.

E, F

El Soda M., Abd El Wahab H., Ezzat N., Desmazeaud M.J. et Ismail A., 1986. The esterolytic and lipolytic activities of the lactobacilli. Detection of the esterase system of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Lait*, **66**, 431-443.

El-Zahar K., Chobert J. M., Sitohy M., Dalgarrondo M. et Haertle T., 2003. Proteolytic degradation of ewe milk proteins during fermentation of yoghurts and storage. *Nahrung*, **47**, 199–206.

Enel E. S., Atamer M., Gursoy A. et Oztekin F.S., 2011. Changes in some properties of strained (Suzme) goat's yoghurt during storage. *Small Ruminant Research*, **99**, 171– 177.

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

Fernandez L., Beerthuyzen M.M., Brown J., Coolbear T., Holland R. et Kuipers O.P., 2000. Cloning, characterization, controlled overexpression and inactivation of major tributyrin esterase gene of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 1360-1368.

Ferreira S.L.C., Bruns R.E., Ferreira H.S., Matos G.D., David J.M., Brandao G.C., da Silva E.G.P., Portugal L.A., dos Reis P.S., Souza A.S. et dos Santos W.N.L., 2007. Box-

Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytical and Chimical Acta*, **597**, 179-186.

Folkenberg D.M., Dejmek P., Skriver A., Guldager H.S. et Ipsen R., 2006. Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures. *International Dairy Journal*, **16**, 111-118.

Fredot E., 2005. Connaissance des aliments, base alimentaire et nutritionnelles de la diététique. *Tec et Doc, Lavoisier*, Paris, France.

G,H

Gafaar A.M., 1992. Volatile flavor compounds of yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, **27**, 87-91.

Galvez A., Abriouel H., Benomar N. et Lucas R., 2010. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**, 142-148.

Garcia P., Rodriguez L., Rodriguez A. et Martinez B., 2010. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science and Technology*, **21**, 373-382.

Gentès M.C., 2011. Compréhension du rôle structural d'exopolysaccharides des bactéries lactiques dans des systèmes laitiers fermentés enrichis en amidon modifiés, thèse de doctorat en science et technologie des aliments, Université Laval, Canada, 195p.

Goupy J. et Creighton L., 2006. Introduction aux plans d'expériences. *Dunod*, Paris, France.

Goupy J., 2005. Pratiquer les plans d'expériences. *Dunod*, Paris, France.

GOUPY J., 2006. Les plans d'expériences. *Revue Modulad*, **34**, 74-116.

Guessas B. et Kihal M., 2004. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African Journal of Biotechnology*, **3**, 339-342.

Guiraud J.P., 2003. Microbiologie Alimentaire. *Tec et Doc, Dunod*, Paris, France.

Gürsoy A., Durlu-Özkaya F., Yildiz F. et Aslim B., 2010. Set Type Yoghurt Production by Exopolysaccharide Producing Turkish Origin Domestic Strains of *Streptococcus thermophilus* (W22) and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (B3). *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, **16**, 81-86.

Haller D., Colbus H., Gänzle M.G., Scherenbacher P., Bode C. et Hammes W.P., 2001. Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: A Comparative *in vitro* study between bacteria of intestinal and fermented food origin. System. *Applied Microbiology*, **24**, 218-226.

Haque A., Richarson R.K. et Morris E.R., 2001. Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt. *Food Hydrocoloids*, **15**, 593-602.

Hassan A. N., Ipsen R., Janzen T. et Qvist K.B., 2003. Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*, **86**, 1632-1638.

Horwitz W., 1980. Official methods analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13th Edition. Gaithersburg (MD): Association of Official Analytical Chemists.

Hou Y., Liu S., Xiong H. et Li C., 2011. Optimization of Polygalacturonase Production Condition for *Bacillus licheniformis* 3x05 Using Response Surface Methodology. International Conference on Agricultural and Biosystems Engineering. *Advances in Biomedical Engineering*, **1-2**, 373-377.

Hujanen M., Linko S., Linko Y.Y. et Leisola M., 2001. Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **30**, 99-109.

I, J, K

Idoui T. et Karam N.E., 2008. Lactic acid bacteria from Jijel's butter: isolation, identification and major technological traits. *Grasas Y Aceites*, **59**, 361-367.

Idoui T., 2008. Les bactéries lactiques indigènes : Isolement, identification et propriétés technologiques. Effet probiotiques chez le poulet de chair ISA15, le lapin de souche locale et le rat Wistar. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran, Algérie, 179p.

Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. et Karam N.E., 2009. Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan", a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas Y Aceites*, **60**, 177-183.

Idoui T., Leghouchi E. et Karam N.E., 2007. Selection of *Lactobacillus plantarum* BJ0021 for rabbit probiotic adjuncts. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, **2**, 188-193.

Irkin R. et Eren U.V., 2008. A Research about Viable *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* Numbers in the Market Yoghurts. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, **3**, 25-28.

Iyer R., Tomar S.K., Maheswarria T.U. et Singha R., 2010. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **20**, 133-141.

Jeantet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P. et Brulé G., 2008. Les produits laitiers. 2^{ème} Edition, *Tec et Doc, Lavoisier*, Paris, France.

Jeantet R., Croguennec T., Schuck P. et Brulé G., 2007. Science des aliments, Technologie des produits alimentaires Vol 2, *Tec et Doc, Lavoisier*, Paris, France.

Olugbuyiro J.A.O. et Oseh J. E., 2011. Physico-chemical and Sensory Evaluation of Market Yoghurt in Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition*, **10**, 914-918.

Kacem M. et Karam N.E., 2006. Physicochemical and microbiological study of "shmen", a traditional butter made from camel milk in the sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts. *Grasas Y Aceites*, **57**, 198-204.

Kadam P.S., Kale.R.V. et Syed- Imran H., 2010.Effect of different varieties of date palm past incorporation an quality characteristics of yogurt. *Journal of Dairy Sciences*, **4**, 12-17.

Kailasapathy K., 2006.Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yogurt. *Lebensmittel Wissenschaft und -Technologie*, **39**,1221–1227.

Kalantzopoulos G., Tsakalidou E. et Manolopoulou E., 1990. Proteinase, peptidase and esterase activities of cell-free extracts from wild strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* isolated from Greek yogurt'. *Journal Dairy Research*, **57**,593-601.

Kandler O. et Weiss N., 1986. Regular non-sporing Gram-positive rods. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 (Sneath, P. H. A., Sharpe, M . E., Holt, J. G., Williams et Wilkins), Baltimore, M D, USA.

Koksoy A. et Kilic M., 2004. Use of hydrocolloid in structural stabilization in yoghurt drink, ayran. *Food Hydrocolloid*, **18**, 593-600.

Kuipers O.P., Buist G. et Kok J., 2000.Current strategies for improving food bacteria. *Research Microbiology*, **151**, 815-822.

Kyriacou A., Tsimpidi E., Kazantzi E., Mitsou E., Kitzralidou E., Oikonomou Y., Gazis G. et Kotsou M., 2008.Microbial content and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from yoghurts. *International Journal of Food Science and Nutrition*, **59**, 512-525.

L

Lamontagne M., 2002.Produits laitiers fermentés : *In Science et technologie du lait, transformation du lait* (Vignola C. L.). 2^{ème} Edition , *Lavoisier*, Paris, France.

Lankaputhra W. E. V., Shah N. P. et Britz M. L., 1996b.Survival of bitidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide. *Milchwissenschaft*, **51**, 65-70.

Larpent J.P., 1997. Microbiologie alimentaire, Techniques de laboratoire. *Tech et Doc Lavoisier*, Paris, France.

Lecoq R., 1965. Manuel d'analyses alimentaires et expertises usuelles. *Doin*, Paris, France.

Lee marc Y., Valik L. et Medvedova A., 2009.Modeling the effect of starter culture on the growth of *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, **129**, 306-311.

Lee W. J. et Lucey J. A., 2004. Structure and physical properties of yogurt gels: Effect of inoculation rate and incubation temperature. *Journal of Dairy Science*, **87**, 3153–3164.

Lee W.J. et Lucey J.A., 2010. Formation and Physical Properties of Yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animals Sciences*, **23**, 1127 -1136.

Lees G. J. et Jago G.R., 1976.Formation of acetaldehyde from threonine by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Research*, **43**,75-83.

Leory F., Degeest B. et De Vuyst L., 2002. A novel area of predictive modeling: describing the functionality of beneficial micro-organisms in foods. *International Journal of Foods Microbiology*, **73**, 251-259.

Levander F. et Radstron P., 2001. Requirement for phosphoglucomutase in exopolysaccharid biosynthesis on glucose and lactose using *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **6**, 2734-2738.

Leveau J.Y., Boiux M. et De Roissart H.B., 1991. La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires. 2^{ème} Edition, *Tec et Doc, Lavoisier*, Paris, France.

Levy S.B. et Marshall B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Journal of Natural Medicines*, **10**, 122-129.

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

Ledenbach L.H. et Marshall R.T., 2009. Microbiological Spoilage of Dairy Products. Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. *Food Microbiology and Food Safety*, 41-67.

Lucas A., Sodini I., Monnet C., Jolivet P. et Corrieu G., 2004. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, **14**, 47-53.

Lucey J. A., 2001. The relationship between rheological parameters and whey separation in milk gels. *Food Hydrocolloids*, **15**, 603-608.

Lucey J.A. et Singh H., 1998. Formation and physical properties of acid milk gels. *Food Research*, **30**, 529-542.

Lucey J.A., 2004. Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. *International Journal of Dairy Technology*, **57**, 77-84.

Luquet F.M. et Corrieu G., 2005. Bactéries lactiques et probiotiques. *Tec et Doc, Lavoisier*, Paris, France.

M

Madzingaidzo L., Danner H. et Braun R., 2002. Process development and optimisation of lactic acid purification using electro dialysis. *Journal of Biotechnology*, **96**, 223-239.

Mahaut M., Jeantet R., Brulé G., Schuck P., 2000. Les produits industriels laitiers. *Tec et Doc, Lavoisier*, Paris, France.

Marathe M.Y. et Ghosh J.S., 2009. Study of proteinase activity of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2083. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, **1**, 001-005.

Marshall V.M. et Rawson H.L., 1999. Effect of exopolysaccharides producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, **34**, 137-143.

Marty-Teyesset C., De la Torre F. et Garel J-R., 2000. Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbruekii spp bugarius* upon aeration: involvement. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 262- 267.

Mataragas M., Drosinos E. H. et Metaxopoulos J., 2003. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4 ± 2 °C. *Food Microbiology*, **20**, 259–265.

Matilla-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R. et Saarela M., 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, **12**, 173-182.

Meilgaard M., Civille G.V. et Carr B. T ., 1999. The spectrum descriptive analysis method. *Sensory Evaluation Techniques*. 3rd Edition. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.

Mezaini A., Chihib N.E., Dilmi Bouras A., Nedjar-Arroume N. et Pierre Hornez J., 2009. Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product. *Journal of Environmental and Public Health* , Volume 2009, Article ID 678495, 6 pages doi:10.1155/2009/678495

Mihail A., Georgi K., Emilina S., Dora B. et Petia K.H., 2009. Proto-cooperation factors in yogurt starter cultures. *Revue de Génie Industriel*, **3**,4-11.

Milcent S. et Carrere H., 2001. Clarification of lactic acid fermentation broths. *Separation and Purification Technology*, **22- 23**, 393-401.

Mohammeed H.A., Abu-Jdayil B. et Al- Shawabkeh A., 2004. Effect of solid concentration on the rheological properties of Labneh (concentrated yoghurt) produced from sheep milk. *Journal of Food Engineering*, **61**, 347-352.

Monnet V., Latrille E., Béal C. et Corrieu G., 2008. Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. *In* : Corrieu G. et Luquet F.M. Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. *Tec et Doc, Lavoisier*, Paris, France.

Moulay M., Aggad H., Benmechernene Z., Guessas B., Henni D.E. et Kihal M., 2006. Cultivable Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their Proteolytic Activity. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, **1**, 12-18.

Mozzi F., Raya R.R. et Vignolo G.M., 2010. Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. *Blackwell. Publishing*. Iowa, USA.

Mozzi F., Torino M.I. et Valdez G.F., 2001. Identification of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria. *Methods in biotechnology. Food Microbiology Protocols*, **14**, 183-190.

Murthy M.S.R.C., Swaminathan T., Rakshit S.K. et Kosugi Y., 2000. Statistical optimization of lipase catalysed hydrolysis of methyloleate by response surface methodology. *Bioprocess Engineering*, **22**, 35-39.

N,O

Narayanan N., Roychoudhury P. et Srivastava A., 2004. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerisation. *Electronic Journal of Biotechnology*, **2**, 167-179.

- Narkprasom N., Assavarachan R. et Wongputtisai P., 2013.** Optimization of Reducing Sugar Production from Acid Hydrolysis of Sugar cane Bagasse by Box Behnken Design. *Journal of Medical and Bioengineering*, **2**, 238-241.
- Ngoufack Z.F., El-Noda A.N., Tchouanguép F.M. et El-Soda M., 2004.** Effect of rropy and capsular exopolysaccharides producing strain of *Lactobacillus plantarum* 162RM on characteristics and functionality of fermented milk and soft Kareish type cheese. *African Journal of Biotechnology*, **3**, 512-518.
- Nogueira C., Albano H., Gibbs P. et Teixeira P., 1998.** Microbiological quality of Portuguese yogurts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **21**, 19-21.
- Nurhajati J., Chrysanti., Indrawati I. et Syaftika N., 2008.** Antibacterial Activity of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* Soygurt Cultures. *Proceedings of ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology*, **3**, 51-8.
- O'Sullivan L., Ross R.P. et Hill C., 2002.** Review: Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, **84**, 593-604.
- Oberg C.J. et Broadbent J.R., 1993.** Thermophilic starter cultures: another set of problems. *Journal Dairy Science*, **76**, 191-194.
- Ogawa H., Gomi T. et Fujioka M., 2000.** Serine hydroxymethyl transferase and threonine aldolase: are they identical?. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **32**, 289-301.
- Ogunshe A.A.O. , Omotoso M.A. et Bello V.B., 2011.** The In Vitro Antimicrobial Activities of Metabolites from *Lactobacillus* Strains on *Candida* Species Implicated in *Candida vaginitis* . *Malaysian Journal of Medical Sciences*, **18**, 13-25.
- Oliveira M.N., Sodini I., Remeuf F. et Corrieu G., 2001.** Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties, and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, **11**, 939-946.
- Olivera M., Caric M., Bozanic R. et Tratnik L., 1996.** The influence of whey protein concentrates on the viscosity of yogurt, acidophilus and acidophilus yogurt. *Mljekarstvo*, **46**, 91-100.
- Olson D.W. et Aryana K.J., 2008.** An excessively high *Lactobacillus acidophilus* inoculation level in yogurt lowers product quality during storage. *LWT - Food Science and Technology*, **41**, 911-918.
- Ott A., Germond J.E et Chaintreau A., 2000.** Origin of acetaldehyde during milk fermentation using ¹³C-labeled precursors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**, 1512-1517.
- Oyeleke S.B., 2009.** Microbial assessment of some commercially prepared yoghurt retailed in Minna, Niger State. *African Journal Microbiology Research*, **3**, 245-248.

Özer B. et Atasoy F., 2002. Effects of addition of amino acids, treatment with β -galactosidase and use of heat-shocked cultures on the acetaldehyde level in yoghurt. *International Journal Dairy Technology*, **55**, 166-170.

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

P

Panesar P.S., Kennedy J.F., Gandhi D.N. et Bunko K., 2007. Bioutilization of whey for lactic acid production. *Food chemistry*, **105**, 1-14.

Parente E. et Cogan T. M., 2004. Starter cultures: general aspects: *In Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (Fox P. F., Sweeney P. L. H., Cogan T. M. et Guinee T. P.), Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Park Y.S., Kang S.W., Lee J.S., Hong S.I. et Kim S.W., 2002. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental design. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **58**, 761-766.

Parvez S., Malik K.A., Ah Kang S. et Kim H.Y., 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, **100**, 1171-1185.

Pasephol T., Small M. D. et Sherkat F., 2008. Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition. *Journal of Texture Studies*, **39**, 617-634.

Patricia RM., Tuinier R., Kaning M. et Zoon P., 2002. Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milk. *International Dairy Journal*, **12**, 689- 695.

Peng Y., Serra M., Horne D. S. et Lucey J. A., 2009. Effect of fortification with various types of milk protein on the rheological properties and permeability of nonfat set yogurt. *Journal of Food Science*, **74**, 666-673.

Petry S., Furlan S., Crepeau M.J., Cerning J. et Desmazeaud M., 2000. Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 3427-3431.

Petry S., Furlana S., Waghornec E., Sanlnerd L., Cerning J. et Maguin E., 2003. Comparaison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides, *FEMS Microbiology Letter*, **221**, 285-291.

Piard J.C. et Desmazeaud M., 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, **71**, 525-541.

Pirttijärvi T.S.M., Wahlström G., Rainey F.A., Saris P.E.J. et Salkinoja-Salonen M.S., 2001. Inhibition of bacilli in industrial starches by nisin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **26**, 107-114.

Purwandari U., Shah N.P. et Vasiljevic T. 2007. Effects of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type

yoghurt. *International Dairy Journal*, **17**, 1344–52.

R, S

Radke-Mitchell L. et Sandine W.E., 1984. Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: a review. *Journal of Food Protection*, **47**, 245–248.

Reyes-Gavilán C. G., 2008. Exopolysaccharides produced by intestinal Bifidobacterium strains act as fermentable substrates for human intestinal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 4737–4745.

Robinson R.K., Tamime A.Y. et Chubb L.W., 1977. Acetaldehyde as an indicator of flavour intensity in yoghurt. *The Milk Industry*, **79**, 4-6.

Rodrigues L. A., Ortolani M. B. T. et Nero L. A. ., 2010. Microbiological quality of yoghurt commercialized in Viçosa, Minas Gerais, Brazil. *African Journal of Microbiology Research*, **4**, 210-213.

Rodríguez E., Arqués J.L., Rodríguez R., Nuñez M. et Medina M., 2003. Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. *Letters in Applied Microbiology*, **37**, 259-263.

Roudant H. et Lefrancq E., 2005. Alimentation théorique. *Doin*, Paris, France.

Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. et Karam N.E., 2009. Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *European Journal of Science Research*, **34**, 218-227.

Roussel Y., Pebay M., Guedon G., Simonet J.P. et Decarissn B., 1994. Physical and genetic map of *Streptococcus thermophilus* A054. *Journal of Bacteriology*, **176**, 7413-7422.

Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J. et Zoon P., 2001. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **12**, 163–171.

Sadhukhan A.K., Ramana Murthy M.V., Ajaya Kumar R., Mohan EV.S., Vandana G., Bhar C. et Venkateswara Rao K., 1999. Optimization of mycophenolic acid production in solid-state fermentation using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **22**, 33-38.

Sado G.M. et Sado C., 2000. Les plans d'expériences, AFNOR.

Saint-Eve, A., Levy C., Martin N. et Souchon I., 2006. Influence of proteins on the perception of flavored stirred yogurts. *Journal of Dairy Science*, **89**, 922–933.

Salazar N., Gueimonde M., Hernández-Barranco A. M., Ruas-Madiedo P. et de los Sava N., Plancken I.V.D., Claeys W. et Hendriekx M., 2005. The kinetics of heat- induce structural changes of β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, **88**, 1646-1653.

Scannel A.G.M., Hill C., Ross R.P., Marx S., Hartmeier W. et Arendt E. K., 2000. Development of bioactive bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin. *International Journal of Food Microbiology*, **60**, 241-249.

- Schorsch C., Wilkins D.K., Jones M.J. et Norton I.T., 2001.** Gelation of casein whey mixtures: effect of heating whey proteins alone or in the presence of casein micelles. *Journal of Dairy Research*, **68**, 471-481.
- Serra M., Trujillo A. J., Jaramillo P. D., Guamis B. et Ferragut V., 2008.** Ultra-high homogenization-induced changes in skim milk: Impact on acid coagulation properties. *Journal of Dairy Research*, **75**, 69-75.
- Serra M., Trujillo A. J., Guamis B. et Ferragut V., 2009a.** Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yogurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk. *Food Hydrocolloids*, **23**, 82-91.
- Serra M., Trujillo A.J., Guamis B. et Ferragut V., 2009 b.** Flavour profiles and survival of starter cultures of yoghurt produced from high-pressure homogenized milk. *International Dairy Journal*, **19**, 100-106.
- Shah N. P., 2003.** Yogurt: The product and its manufacture. *In: Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, Vol. 10, 2nd Edition (Caballero B, Trugo L. C. et Finglas P. M.), *Academic Press*, London, England
- Shahbal S., Hemme D. et Desmazeaud M. J., 1991.** High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. *Lait*, **71**, 351-357.
- Shakeel Hanif M., Zahoor T., Iqbal Z., Ihsan-ul-Haq. et Arif A.M., 2012.** Effect of storage on rheological and sensory characteristics of cow and buffalo milk yogurt. *Pakistan Journal of Food Sciences*, **22**, 61-70.
- Sinngh Sudheer K., Ahmed Syed U. et Ashok P., 2006.** Yogurt science and technology. 2nd Edition, *Cambridge Woodhead Publishing*, England
- Smit G., Smit B.A. et Engels W.J.M., 2005.** Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**, 591–610.
- Sodini I., Remeuf F., Haddad S. et Corrieu G., 2004.** The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44**, 113-137.
- Somkuti G.A. et Steinderg D.H. , 1997.** Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques. *In : Les Bactéries lactiques T1, Aspects fondamentaux et technologiques. Loriga*, Paris, France.
- Sondi I., Remenf F., Haddad S. et Corrieu G., 2004.** The relative effect of milk base, starter and process on yogurt texture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44**, 113-137.
- Soomro A.H., Masud T. et Anwaar K., 2002.** Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and Human health. *Pakistan Journal of Nutrition*, **1**, 20-24.

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

Sun W. et Griffiths M.W., 2000. Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. *International Journal of Food Microbiology*, **61**, 17-25.

Sunitha I., Subba Rao M.V. et Ayyanna C., 1998. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of L-glutamic acid by the co-immobilized whole cells of *Micrococcus glutamicus* and *Pseudomonas reptilivora*. *Bioprocessing and Engineering*, **18**, 353-359.

T

Tadesse G., Ephraim E. et Ashenafi M., 2004. Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Borde and Shamita, traditional Ethiopian fermented beverages, on some foodborne pathogens and effect of growth medium on the inhibitory activity. *International Journal of Food Safety*, **5**, 13-20.

Tamime A. Y. et Robinson R. K., 1999. Yogurt science and technology, 2^{ème} Edition, Cambridge, Woodhead Publishing, England.

Tamime A.Y. et Robinson R.K., 2007. Tamime and Robinson's Yoghurt, Science and Technology, 3rd Edition. Cambridge Woodhead Publishing, England.

Tamine A.Y., 2002. Fermented milks: a historical food with modern applications - a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, **56**, 01-15.

Tantillo M. G., Di P. A. et Novello L., 2002. Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* as starter culture in dry sausages. *New Microbiology*, **25**, 45-49.

Roginski H., Fuquay J.W. et Fox P.F., 2003. Encyclopedia of Dairy Sciences. Vol 1. Academic Press and Elsevier Science, London, England.

Teles G.D. et Flores S.H., 2007. The influence of additives on the rheological and sensory properties of nonfat yogurt, *International Journal of Dairy Technology*, **60**, 270-277.

Temmerman R., Pot B., Huys G. et Swings J., 2002. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, **81**, 1 – 10.

Thevenard B., 2011. Implication des systèmes à deux composants dans les réponses de *Streptococcus thermophilus* à des changements environnementaux, dont la coculture avec *Lactobacillus bulgaricus*. Thèse de doctorat, 132p.

Towler C., 1998. Sedimentation in a cultured milk beverage. *Journal of Dairy Science and Technology*, **19**, 205-211.

Tufail M., Hussain Sh., Malik F., Mirza T., Parveen Gh., Shafaat Sh., Wajid A., Mahmood R., Channa R.A. et Sadiq A., 2011. Isolation and evaluation of antibacterial

activity of bacteriocine produced by *Lactobacillus bulgaricus* from yogurt. *African Journal of Microbiology Research*, **5**, 3842-3847.

Turgeon S.L. et Plesces V., 2009. Study of interactions between exopolysaccharides produced by strain *Lactobacillus rhamnosus RW-9595 M* and milk proteins, in 5th international symposium on food rheology and structure; *proceeding ISFRS 2009, Zurich, Suisse*, 416-419.

U, V

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

Vaillancourt K., Bedard N., Bart C., Robitaille M. T. G., Turgeon N. et Frenette M., 2008. Role of galK and galM in galactose metabolism by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 1264–1267.

Vali M., Sauer M., Branduarddi P., Borth N., Porro D. et Mattanovich D., 2006. Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevicea* by cell sorting for height intracellular pH. *Applied and Environnemental Microbiology*, **72**, 5492-5499.

Vaningelgem F., Van der Meulen R., Zamfir M., Adriany T., Laws A.P. et De Vuyst L., 2004a. *Streptococcus thermophilus* ST 111 produces a stable high-molecular-mass exopolysaccharide in milk-based medium. *International Dairy Journal*, **14**, 857-864.

Vaningelgem F., Zamfir M., Mozzi F., Adriany T., Vancanneyt M., Swings J. et De Vuyst L. 2004b. Biodiversity of Exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Applied and Environnemental Microbiology*, **70**, 900-912.

Vasiljevic T., Shah N.P. et Jelen P, 2005. Growth characteristics of *Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus* ATCC .11842 as affected by different neutralizers. *Australian Journal of Dairy Technology*, **60**, 3-9.

Vedamuthu E. R., 1991.The yogurt story-past, present and future. *Dairy Food and Environmental Sanitation*, **7**, 371-374.

Versalovic M. et Wilson T., 2008. Therapeutic Microbiology: Probiotics and Related Strategies. ASM Press 420.

Vierling E., 2008. Aliments et boissons : filières et produits, 3^{eme} Edition, Doin ,Welters Kluwer, France.

Vignola C.I., 2002. Science et technologie du lait : transformation du lait. *Lavoisier*, Paris, France.

Vinderola G., Perdigón G., Duarte J., Farnworth E. et Matar C., 2007. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine*, **36**, 254–260.

Vinderola C.G., Bailo J.A. et Reinheimer J.A., 2000. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, **33**, 97-102.

Vuillemand J.C., 1986. Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. *Tec et Doc, Lavoisier*. Paris, France.

W, Y, Z

Walstra P., 1998. Relationship between structure and texture of cultured milk products. Texture of Fermented Milk Products and Dairy Desserts, *International Dairy Federation*. Brussels.

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

Welman A.D. et Maddox I.S., 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trend in Biotechnology*, **21**, 269–274.

Weuster-Botz D., 2000. Experimental design for fermentation media development: statistical design or global random search?. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **90**, 473-483.

Woolford M.K., 1975. Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. *Journal of Science Food and Agriculture*, **26**, 229-237.

WWW.musee-afrappier.qc.ca

WWW.raw-milk-facts.com

Yesillik S., Yildirim N., Dikici A., Yildiz A. et Yesillik S., 2011. Antibacterial Effects of Some Fermented Commercial and Homemade Dairy Products and 0.9% Lactic Acid against Selected Foodborne Pathogens. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, **6**, 189-195.

Yu X., Hallet S.G., Sheppard J. et Watson A.K., 1997. Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **47**, 301-305.

Yuksekdag Z.N. et Beyatli Y., 2003. Kefir Mikroflorasi ile Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Genetik Özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **1**, 49-69.

Zalan Z., Nemeth E., Barath A. et Halasz A., 2005. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus strains*. *Food Technology and Biotechnology*, **43**, 219-225.

Zhu W.M., Liu W. et Wu D.O., 2000. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *L. gasserii* KT7. *Journal of Applied microbiology*, **88**, 877-886.

Zourari A., Accolas J. P. et Desmazeaud M. J., 1992. Metabolism and biochemical characteristics of yoghurt bacteria. *Lait*, **72**, 1–34.

Annexe

Annexe I : Composition des milieux de culture

- bouillon MRS (pH 6.5)

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure5g
Glucose	20g
Tween 80.....	.1ml
Phosphate bipotassique2g
Acétate de sodium5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O	0.2g
Sulfate de manganèse, 4 H ₂ O	0.5g
Eau distillée qsp	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15min.

- Bouillon MRS additionné du lait écrémé

Même composition sauf pour :

Glucose.....	10g
Phosphate bipotassique	2,3g
Lait écrémé.....	1g

- bouillon hypersaccharosée (pH 6.8)

Extrait de viande	10g
Extrait de levure	3g
Peptone	2.5g
Saccharose	150g
K ₂ HPO ₄	2g
NaCl	1g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.2g
Eau distillée qsp	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

- Gélose aux triglycérides (pH 6.5)

Peptone	5g
Extrait de levure	3g
Triglycérides	10ml
Agar	15g

Stérilisation à 110°C pendant 5min.

- Gélose Agar au lait : Il se compose d'un mélange de deux milieux

Milieu A : pour un litre

Agar	3%
Extrait de levure	1%

Autoclaver à 121°C pendant 15min.

Milieu B : pour un litre

Lait écrémé 6%
 Pourpre de Bromocrésol0.006%

Stérilisation par tyndallisation 3 fois à 100°C

Mélange A/B : Agar 1.5%, extrait de levure 0.5%, lait écrémé 3.0%, pourpre de Bromocrésol 0.003%

Annexe II : Courbes d'étalonnage

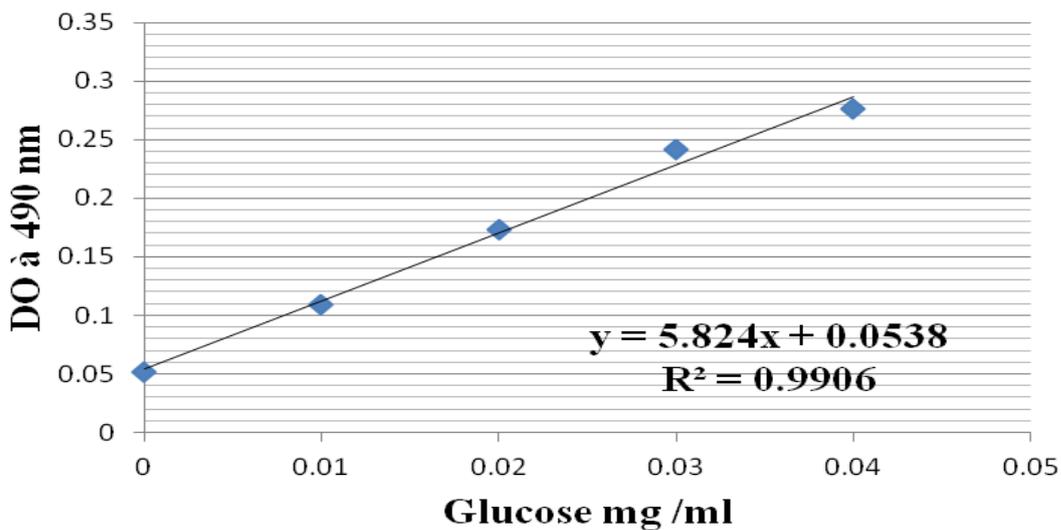


Figure 1 : Courbe d'étalonnage du glucose.

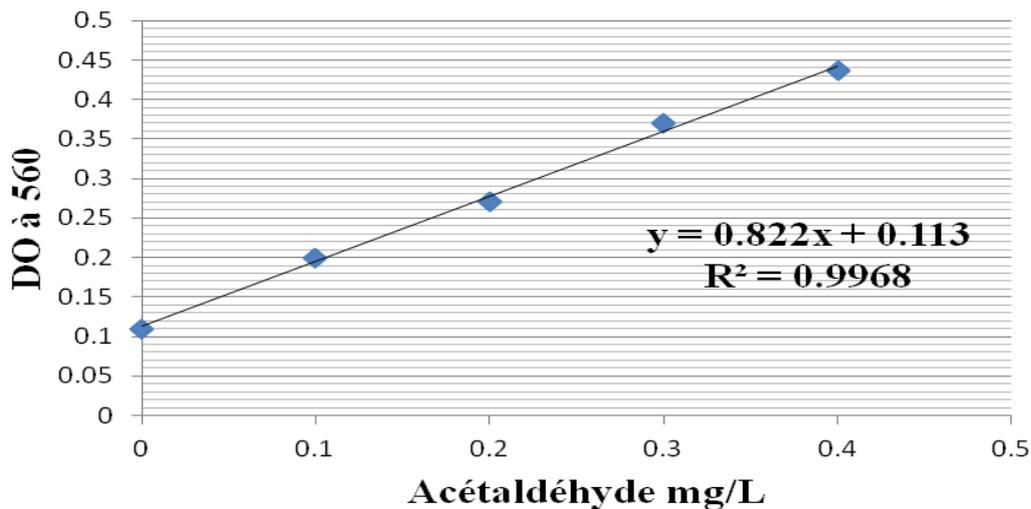


Figure 2 : Courbe d'étalonnage d'acétaldéhyde.

Annexe III : Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

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

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

Annexe IV : Analyse par HPLC

Tableau 1 : Analyse par HPLC de l'effet protéolytique de ferment FTM1 après 4h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
5	1.990	564772	43563	28.2928
6	2.114	1409934	44678	70.6321
7	3.217	10195	784	0.5107
8	6.532	2610	128	0.1308
9	7.105	4227	257	0.2118
10	7.235	4429	262	0.2219
Total		1996166	89672	100

Tableau 2 : Analyse par HPLC de l'effet protéolytique de ferment FTM1 après 24h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
1	0.323	1029	107	0.0286
3	1.983	525790	45728	14.615
4	2.184	884870	66953	24.5961
5	2.346	2185908	102073	60.7602
Total		3597597	214861	100

Tableau 3 : Analyse par HPLC de l'effet protéolytique de ferment FTM2 après 4h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
2	2.236	3115486	71298	100
Total		3115486	71298	100

Tableau 4 : Analyse par HPLC de l'effet protéolytique de ferment FTM2 après 24h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
4	2.289	5262977	147856	100
Total		5262977	147856	100

Tableau 5: Analyse par HPLC de l'effet protéolytique de ferment FTM3 après 4h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
3	1.958	536124	38832	24.447
4	2.112	1645236	37539	75.022
5	4.227	4506	253	0.2055
6	4.842	4598	355	0.2097
9	12.847	2541	32	0.1159
Total		2193005	77012	100

Tableau 6: Analyse par HPLC de l'effet protéolytique de ferment FTM3 après 24h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
4	1.998	939837	55940	25.8833
5	2.366	2691220	78991	74.1167
Total		3631057	134931	100

Tableau 7: Analyse par HPLC de l'effet protéolytique de ferment ST-M6 après 4h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
1	0.285	1056	131	0.0263
3	1.949	783629	64765	19.5551
4	2.132	1169514	79793	29.1846
5	2.314	2053095	70245	51.234
Total		4007293	214933	100

Tableau 8: Analyse par HPLC de l'effet protéolytique de ferment ST-M6 après 24h d'incubation.

Pic	Temps de rétention	Surface	Longueur	Concentration
5	1.991	974957	68818	26.3149
6	2.096	776439	67833	20.9567
7	2.359	1953567	76460	52.7284
Total		3631057	134931	100

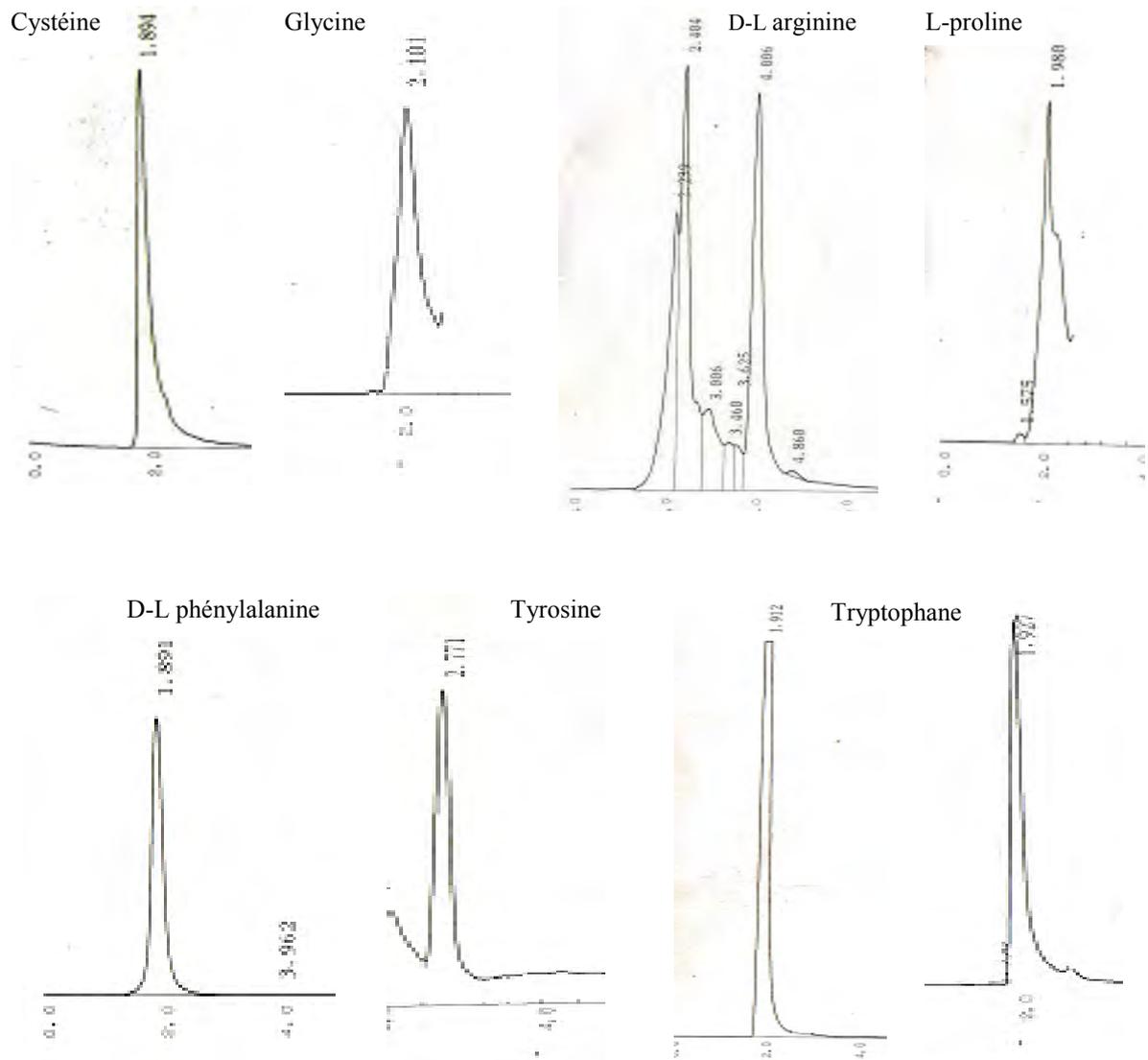


Figure 1: Chromatogramme des acides aminés étalons.

Annexe V : Résistances aux antibiotiques**Tableau 1:** Résultats de l'antibiogramme des souches indicatrices.

Antibiotiques	Diamètres des zones d'inhibition des souches (mm)							
	Lm	Ko	Ec	Bs	Sa	S	Pa	Ab
PG 10	18	15	14	12	18	10	17	19
Sp 100	20	00	15	11	15	00	17	19
C 30	10	00	14	13	19	12	09	10
Tob 10	19	29	21	23	19	21	23	20
L 15	00	21	12	12	18	00	16	20
Cip 5	34	32	31	33	31	29	45	12
T 30	07	35	29	38	17	31	34	00
A 30	00	24	21	26	22	22	33	12
Fox 30	28	26	26	27	24	25	34	22
CS 50	18	19	20	20	19	18	32	17

Souches indicatrices : **Lm** : *Listeria monocytogenes*, **Ko** : *Klebsiella oxytoca*, **Ec** : *Escherichia coli*, **Bs** : *Bacillus subtilis*, **Sa** : *Staphylococcus aureus*, **S** : *Salmonella*, **Pa** : *Pseudomonas aeruginosa*, **Ab** : *Acinetobacter baumannii*

Antibiotiques : **PG 10** : Pénicilline G 10 iμ, **Sp100** : Spiramycine 100μg, **C 30** : Chloramphénicol 30μg, **Tob 10** : Tobramycine 10μg, **L 15** : Lincomycine 15μg, **Cip 5** : Ciprofloxacine 5mcg, **T 30** : Tétracycline 30μg, **A 30** : Amikacine 30μg, **CS 50** : Colistine Sulfate 50μg, et **Fox 30** : Céfoxitine 30μg.

Annexe VI : Optimisation de la production d'acide lactique par Box Behnken

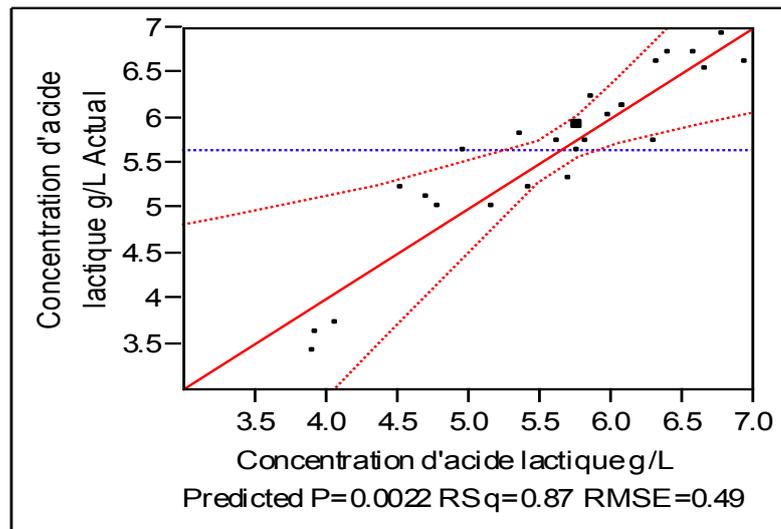


Figure 1: Concentration d'acide lactique trouvée par rapport à celle prévue.

Annexe VII: Emballages fabriqués de pourtour (17,5X 4) cm et un couvercle (6,3 X 6,3) cm



Figure 1: Emballage du pourtour pour la boîte du yaourt étuvé fabriqué en utilisant le ferment industriel.



Figure 2: Emballage du couvercle pour la boîte du yaourt étuvé fabriqué en utilisant le ferment industriel.



Figure 3: Emballage du pourtour pour la boîte du yaourt étuvé fabriqué en utilisant le ferment local.



Figure 4: Emballage du couvercle pour la boîte du yaourt étuvé fabriqué en utilisant le ferment local.

Annexe VIII : Evaluation sensorielle descriptive

Bonjour;

Type d'échantillon ; yaourt nature étuvé

Avant de participer à cette évaluation sensorielle descriptive, veuillez préciser certaines informations vous concernant :

L'âge :.....

Sexe : féminin masculin

Il vous est présenté deux types du yaourt codéet.....

1-.....

2-.....

Quelle est l'échantillon qui vous avez apprécié ?

Pour mener à bien cette évaluation sensorielle descriptive, il vous est présenté un langage sensoriel. Chaque attribut est mesuré selon une échelle d'intensité universelle de 0 à 15, où 0= non détecté et 15= extrêmement fort.

Terme	Note	
	YFL	YFC
Quantité de lactosérum libre		
Granulosité		
Epaisseur (la force exigée pour comprimer le gel d'un yaourt dans la bouche)		
Onctuosité		
Fermeté		
Couleur blanchâtre		
Goût de cuit		
Goût acide		
Goût sucré		
Intensité d'odeur		
Arrière goût		

Merci pour votre participation

Annexe X : Nom de ferment industriel

ST- M6. Termophilic lactic culture
For Direct Vat Set (DVS)
Storage: -18 °C or below
Package size: 5011
Batch no: 2775099
DOM: 06-2007
BBD: 06-2009
CHR HANSEN

اللقب و الإسم: بوحنة إيمان

السنة الجامعية: 2013-2014

الأطروحة: الخمائر المحلية وتطبيقاتها في مجال تكنولوجيا الألبان

طبيعة الشهادة : ماجستير في العلوم الغذائية

إختصاص : تكنولوجيا غذائية

المخلص

صناعة الياوورت في الجزائر تعتمد بشكل كبير على أسواق السلع الأجنبية للمواد الاولية وبالخصوص الخمائر التي تستخدم لهذا الغرض. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم المهارات التكنولوجية لثلاث خمائر محلية محبة للحرارة ومختلطة بالمقارنة مع اخرى صناعية ، تليها تحسين عملية التخمير باستخدام النموذج الاحصائي **Box Behnken** و في الاخير صناعة ياوورت طبيعي بالاعتماد على نتائج التحسين وكذلك دراسة نوعيته خلال مدة التخزين.

تشير النتائج المتحصل عليها إلى أن هذه الخمائر لها قدرة جيدة في تحليل البروتينات و الدهون ، رفع اللزوجة ، إنتاج المركبات العطرية و المركبات المضادة للبكتيريا ، لكن قدرتها على رفع حموضة الوسط ضعيفة، بحيث **FTM3** تمتلك أفضل المهارات التكنولوجية.

بعد تطبيق الظروف المثلى التي تم الحصول عليها باستخدام النموذج الإحصائي **Box Behnken**، تركيز حامض اللبن الذي تم الحصول عليه يعادل 94 % من القيمة المتوقعة الياوورت الناتج يملك درجة حموضة و معدل طرد الماء مقبولين وكذلك عدد الخلايا الحية يبقى في نطاق المقاييس الجزائرية خلال مرحلة الحفظ. وتتميز منتجاتنا بجودة ميكروبيولوجية جيدة لعدم وجود كائنات مجهرية ملوثة.

الكلمات المفتاحية: مخمر محب للحرارة مختلط، القدرات التكنولوجية ، التحسين، ياوورت

Name and first name: **BOUHANNA Imène**

Academic year: **2013-2014**

Theme: **The autochthonous thermophilic starters and their applications in dairy technology**

Nature of the diploma: **Magister in foods sciences**

Option: **Food Technology**

Abstract

The yoghurt industry in Algeria is strongly dependent on the external markets of the raw materials in particular the starters used for this purpose. The present study was related to the assessment of technological performance of three autochthonous thermophilic starter compared to an industrial one, followed by the optimization of fermentation by Box Behnken model and finally the production of a natural yoghurt using the results of this optimization, then the quality evaluation of the product during storage was done.

The results showed that these local starters have good proteolytic and lipolytic activities, showed their ability to produce exopolysaccharides and flavors, and exhibited good antagonistic activity, however acidifying activity was lower. The starter coded FTM 3 presenting the best technological traits.

After application of the optimal conditions obtained by the model Box Behnken, the concentration in lactic acid obtained accounts for approximately 94% of the value envisaged. The produced yoghurt is characterized by acceptable acidity and syneresis, the number of viable cells is in the values of standards Algerian for all period of storage, thus a good microbiological quality was obtained by the fact of the absence of all contaminants.

Key words: autochthonous thermophilic starter, technological aptitude, optimization, yoghurt.

Nom et prénom : **BOUHANNA Imène**

Année universitaire : **2013-2014**

Thème : **Les ferments locaux et leurs applications en technologie laitière**

Nature du diplôme : **Magister en Sciences Alimentaires**

Option : **Technologie Alimentaire**

Résumé

L'industrie de fabrication du yaourt en Algérie est fortement dépendante des marchés extérieurs en matières premières, en particulier les ferments. La présente étude consistait en l'évaluation des aptitudes technologiques de trois ferments thermophiles mixtes locaux comparativement à un autre ferment industriel, suivie d'une optimisation de la fermentation par le modèle de Box Behnken et enfin la production d'un yaourt nature étuvé en se basant sur les résultats de l'optimisation avec une évaluation de sa qualité pendant la conservation.

Les résultats ont montré que ces ferments ont des bons pouvoirs protéolytique et lipolytique, une bonne aptitude texturante et aromatisante, et une bonne activité antagonistique, cependant l'activité acidifiante était faible. Le ferment codé FTM 3 a montré les meilleures performances technologiques.

Après application des conditions optimales obtenues par le modèle Box Behnken, la concentration en acide lactique obtenue représente environ 94% de la valeur prévue. Le yaourt obtenu est caractérisé par une acidité et une synérèse acceptable, un nombre de cellules viables dans les normes Algériennes pendant toute la période de conservation, ainsi qu'une bonne qualité microbiologique du

Mots clés : ferment thermophile mixte, aptitude technologique, optimisation, yaourt.