



Institut : Sciences et Technologie  
N° d'ordre :  
Matricule : 11 / 2016

Département : Sciences de la Nature  
et de la Vie

[www.centre-univ-mila.dz](http://www.centre-univ-mila.dz)

# Thèse

Présentée pour l'obtention du Diplôme de Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle – LMD

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biodiversité et valorisation des ressources naturelles

**Etude de l'effet de l'addition des extraits de quelques  
plantes de la région de Mila sur la conservation du lait  
à froid**

Par

**SERRER Asma**

## Membres du Jury

CHEBBAH Mohamed	Professeur	Président	Centre Univ. de Mila
BOUBENDIR Abdelhafid	M.C.A	Rapporteur	Centre Univ. de Mila
YAHIA Abdelouahab	Professeur	Examineur	Centre Univ. de Mila
BOUNAMOUS Azzedine	Professeur	Examineur	Centre Univ. de Mila
IDOUI Tayeb	Professeur	Examineur	Univ. SADIK BENYAHIA - Jijel
SEKHRI ARAFA Nedjouda	M.C.A	Examineur	Univ. Frere Mentouri constantine1

**Année Universitaire : 2022/2023**

### *Remerciements*

*Nous tenons à remercier tout d'abord « ALLAH » le tout puissant qui nous a donné, durant toutes ces années, la santé, le courage et la foi pour arriver à ce jour.*

*Au moment où s'achève ce travail, permettez-moi de remercier du fond du cœur, tous ceux et toutes celles qui, pendant cette période de thèse, m'ont dirigée, soutenue, aidée et encouragée.*

*Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier mon directeur de thèse, le Professeur BOUBENDIR Abdelhafid, docteur Microbiologiste au Département de Science de la Nature et de la Vie à Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf, Mila, pour m'avoir fait confiance, m'avoir encouragé et conseillé tout en me laissant une grande liberté. Pour son soutien et sa grande générosité, tout le long de mon travail de thèse, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur CHEBBAH Mohamed, de centre universitaire Abdelhafid Boussouf, de Mila d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse. J'aimerais également remercier, Monsieur le Professeur YAHAI Abdelouahab de centre universitaire de Mila, le Professeur IDOUI Tayeb de l'université SADIK BENYAHIA – Jijel, le Professeur BOUNAMOUS Azzedine centre universitaire de Mila, ainsi que Doctorant SEKHRI ARAFA Nedjoua de l'université Frere Mentouri constantine pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, pour avoir accepté d'en être rapporteurs et surtout pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Je remercie tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : aussi bien par les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux, leurs suggestions ou contributions.*

*J'adresse de sincères remerciements à tous mes collègues et amis du laboratoire de recherche des Sciences Naturelles et des Matériaux du Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf de Mila, ainsi que le laboratoire EPIC Algérienne des Eaux de Ain Tinne – Mila, Merci à tous pour leur amitié et pour leur aide précieuse.*

*Enfin, pour leur soutien sans faille et permanent, je tiens à remercier de tout cœur mon marie , ma mère, pour son amour et sa compréhension.*

## Résumé

Le but de la présente étude est d'évaluer l'effet de la supplémentation des extraits aqueux de romarin et origan au lait cru de vache sur la dynamique de la croissance microbienne pendant la réfrigération, ainsi que l'analyse de la qualité sensorielle des laits supplémentés. Les extraits aqueux des feuilles des plantes ont été additionnés aux laits à différentes concentrations et conservés à 4 °C. Les concentrations utilisées étaient de 0, 0,25, 0,5, 0,75 et 1 mg mL<sup>-1</sup> pour le romarin et 0, 1,25, 2,5, 3,75, 5 mg mL<sup>-1</sup> pour l'origan.

L'évolution de la croissance microbienne a été suivie à intervalles de temps réguliers pendant dix jours. Le dénombrement de la flore microbienne totale viable a été réalisé par les méthodes de culture dépendante. Les paramètres de croissance microbienne, à savoir le taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$ ), la durée de la phase de latence ( $\lambda$ ) et la charge cellulaire maximale ( $X_{max}$ ) ont été obtenus à l'aide du modèle de Baranyi et Roberts.

Les résultats des cinétiques de croissance ont montré que la supplémentation des deux extraits de plantes au lait réfrigéré a généré des modifications des paramètres de croissance microbienne.

Pour le romarin, la durée de la phase de latence ( $\lambda$ ) a été prolongée de 1,2±0,80 jour (28,8 h) dans les laits sans supplémentation (0 mg mL<sup>-1</sup>) à 1,66±0,92 jour (39,84 h) dans les laits additionnés de 0,75 et 1 mg mL<sup>-1</sup>. Tandis que la charge cellulaire maximale ( $X_{max}$ ) diminuait de 7,00 ±0,17 log UFC mL<sup>-1</sup> dans les laits non supplémentés à 6,56±0,19 log UFC mL<sup>-1</sup> dans les laits additionnés aux mêmes concentrations. Alors que pour l'origan,  $\lambda$  a été retardé de 4,12±0,11 jour (98,88 h) dans les laits sans supplémentation à 5,04±0,97 jour (120,96 h) dans les laits additionnés de 1,25 mg mL<sup>-1</sup>. Une diminution de  $X_{max}$  a été remarquée pour l'ensemble des concentrations, enregistrant la valeur la plus basse de 4,45±1,34 log UFC mL<sup>-1</sup> à 2,5 et 3,75 mg mL<sup>-1</sup>. D'après les résultats, les concentrations recommandées d'ajout des extraits de plantes, permettant la prolongation de la durée de la phase de latence et la limitation de la croissance microbienne sont de 0,75 mg mL<sup>-1</sup> pour le romarin et de 1,25 mg mL<sup>-1</sup> pour l'origan.

L'analyse sensorielle des laits additionnés des deux extraits de plantes a révélé des appréciations par les consommateurs sur la couleur, l'odeur, la saveur et la texture. La concentration de 1 mg mL<sup>-1</sup> a donné la meilleure acceptabilité du produit par les dégustateurs pour les laits supplémentés de l'extrait de romarin. Tandis que dans les laits

additionnés d'origan, la concentration 1,25 mg mL<sup>-1</sup> a montré la meilleure acceptabilité par les dégustateurs.

L'utilisation des extraits aqueux de romarin et origan comme additifs naturels pendant la réfrigération du lait pourrait offrir des opportunités en tant que bioconservateurs dans l'industrie laitière, pour réduire le prétraitement thermique et l'ajout d'additifs chimiques.

**Mots clés** : Extraits aqueux, *Rosmarinus*, *Origanum*, bioconservateurs, réfrigération, dynamique de croissance microbienne, analyse sensorielle, lait cru.

**Abstract**

The aim of the present study is to evaluate the effect of the supplementation of rosemary and oregano aqueous extracts to raw cow's milk on the dynamics of microbial growth during refrigeration, as well the analysis of the sensory quality of supplemented milks. The aqueous extracts of plants leaves were added to the milks at different concentrations and stored at 4°C. The concentrations used were 0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg mL<sup>-1</sup> for rosemary and 0, 1.25, 2.5, 3.75, 5 mg mL<sup>-1</sup> for oregano.

The evolution of microbial growth was monitored at regular intervals of time during ten days of cold storage. The enumeration of the total viable bacterial count was carried out by dependent culture methods. The microbial growth parameters, namely the maximum growth rate ( $\mu_{max}$ ), lag phase duration ( $\lambda$ ) and maximum cell load ( $X_{max}$ ) were obtained using the model of Baranyi and Roberts.

The results of the growth kinetics showed that the supplementation of the two plants extracts to refrigerated milk generated modifications of the microbial growth parameters. For rosemary, the duration of the lag phase ( $\lambda$ ) was prolonged from 1.2±0.80 days (28.8 h) in milks without supplementation (0 mg mL<sup>-1</sup>) to 1.66±0.92 days (39.84 h) in milks supplemented with 0.75 and 1 mg mL<sup>-1</sup>. While the maximum cell load ( $X_{max}$ ) decreased from 7.00±0.17 log CFU mL<sup>-1</sup> in non-supplemented milks to 6.56 ±0.19 log CFU. mL<sup>-1</sup> in milks added at the same concentrations. Whereas for oregano,  $\lambda$  was delayed from 4.12±0.11 days (98.88 h) in milks without supplementation to 5.04±0.97 days (120.96 h) in milks supplemented of 1.25 mg mL<sup>-1</sup>. A decrease in  $X_{max}$  was noted for all the concentrations, recording the lowest value of 4.45±1.34 log CFU mL<sup>-1</sup> at 2.5 and 3.75 mg mL<sup>-1</sup>. According to the results the recommended concentrations for plant extracts adding, allowing the prolongation of the lag phase duration and the limitation of microbial growth, are 0.75 mg mL<sup>-1</sup> for rosemary and 1.25 mg mL<sup>-1</sup> for oregano.

The sensory analysis of the milks added with the plants extracts revealed consumer assessments of color, smell, flavor and texture. The concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup> gave the best acceptability of the product by tasters for milks supplemented with rosemary extract. While in milks added with oregano, the concentration of 1.25 mg mL<sup>-1</sup> showed the best acceptability.

The use of rosemary and oregano aqueous extracts as natural additives during milk refrigeration could offer opportunities as biopreservatives in the dairy industry, to reduce thermal pretreatment and the addition of chemical additives.

**Keywords:** Aqueous extracts, *Rosmarinus*, *Origanum*, biopreservatives, refrigeration, microbial growth dynamics, sensory analysis, raw milk.

## المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تأثير إضافة مستخلص نبتتي إكليل الجبل و الزعر إلى حليب البقر الطازج على ديناميكيات النمو الميكروبي أثناء التبريد وكذلك تحليل الجودة الحسية للحليب المضاف.

تمت إضافة مستخلص النبتتين بتركيز مختلفة إلى عينات الحليب وتخزينها عند درجة حرارة 4 درجات مئوية و قد إستخدمت التراكيز 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 مغ/مل بالنسبة لإكليل الجبل, أما فيما يخص نبتة الزعر فقد إستخدمت التراكيز 0, 1.25, 2.5, 3.75, 5 مغ/مل. تم رصد النمو الميكروبي على فترات منتظمة لمدة عشرة أيام من التخزين المبرد وإجراء تعداد إجمالي للمجموعة الميكروبية الحية عن طريق التقنية المرتبطة بالزرع وقد حصلنا على معلومات النمو الميكروبي : نسبة النمو الأقصى, مدة السبات و قيمة الشحنة الخلوية القصوى بإستخدام نموذج

Baranyi et Robert

أظهرت نتائج حركية النمو أن إضافة مستخلص النبتتين السابقتين إلى الحليب المبرد أحدثت تعديلات في النمو الميكروبي. بالنسبة للحليب المضاف إليه مستخلص إكليل الجبل فإن مدة السبات في الحليب الخالي من الإضافة قدرت ب  $0.8 \pm 1.2$  يوم ( 8.28 ساعة) لتصل قيمتها إلى  $0.9 \pm 1.66$  ( 39.84 ساعة ) في الحليب الذي أضفنا له التركيز 0.75 و 1 مغ/مل, أما فيما يخص قيمة الشحنة الخلوية القصوى فقد تناقصت من القيمة  $0.17 \pm 7.00$  في الحليب دون إضافة إلى القيمة  $0.19 \pm 6.56$  في الحليب الذي أضيف له نفس التركيزين السابقين من مستخلص نبتة إكليل الجبل. أما الحليب الذي أضيف له مستخلص نبتة الزعر فإن مدة السبات تغيرت من  $0.11 \pm 4.12$  يوم ( 98.88 ساعة ) في الحليب الخالي من الإضافة إلى  $0.97 \pm 5.04$  ( 120.96 ساعة) في الحليب الذي أضيف له التركيز 1.25 مغ/مل من مستخلص النبتة. أما قيمة الشحنة الخلوية القصوى تناقصت في جميع التراكيز.

من خلال النتائج المتحصل عليها تم إختيار التركيز 0.75 مغ/مل بالنسبة لمستخلص نبتة إكليل الجبل, و التركيز 1.25 مغ/مل بالنسبة لمستخلص نبتة الزعر وذلك لتمديد مدة السبات وتقليل قيمة الشحنة الخلوية القصوى.

التحليل الحسي للحليب المضاف إليه مستخلص النبتتين السابقتين أظهر تغيرات من حيث اللون, الرائحة, النكهة و النسيج وذلك من طرف المستهلك. التركيز 1 مغ/مل أعطى أفضل نتيجة بالنسبة للحليب المضاف إليه إكليل الجبل و التركيز 1.25 مغ/مل للمنتوج المضاف إليه مستخلص الزعر.

يمكن أن يوفر استخدام المستخلصات النباتية لإكليل الجبل و الزعر كإضافات طبيعية أثناء تبريد الحليب فرصاً كمواد حافظة حيوية في صناعة الألبان وذلك لتقليل المعالجة الحرارية وإضافة المضافات الكيميائية.

**الكلمات المفتاحية :** مستخلصات نباتية, إكليل الجبل, الزعر, مواد حافظة حيوية, الحفظ, النمو الميكروبي, التحليل الحسي الحليب الطازج.

**Liste des Abréviations**

**CMI** : Concentration Minimal Inhibitrice

**PLiBC** : Bactéries Lipolytiques Psychotropes

**UFC** : Unité Formant Colonie

**NTB** : Nombre Total de Bactéries

**NBP** : Nombre de Bactéries Psychotropes

**EA** : Extrait Aqueux

**MRS** : Man Rogosa et Sharp

**HE** : Huiles Essentiels

**X max** : niveau maximal de croissance ( $\log \text{ UFC mL}^{-1}$ ).

**$\mu\text{max}$**  : Vitesse maximale de croissance ( $\Delta \log \text{ UFC mL}^{-1} \cdot \text{jour}$ ).

**$\lambda$**  : Temps de génération (Jours).

**ADN** : Acide desoxirobo nucleuque

**mL** : millilitre

**$\mu\text{g}$**  : microgramme

**mg** : milligramme

**kg** : kilogramme

**°C** : Degré Celsius

**Cm** : Centimètre

**%** : Pourcentage

**h** : heures

**Log** : Logarétme



**Ans** : année

**Min** : minute

**Mm** : millimètre

**g** : gramme

Liste des Figures

Numéro	Titre	Page
<b>Figure 1</b>	Le romarin ; Sounaoua, Mila.	<b>06</b>
<b>Figure 2</b>	L'origan, Ain Tinn, Mila.	<b>10</b>
<b>Figure 3</b>	Courbe de croissance d'une culture bactérienne avec ses différentes phases (Delhalle et al., 2012).	<b>17</b>
<b>Figure 4</b>	Dynamique des populations bactériennes psychrotrophes (□) et mésophiles (▲) dans le lait cru (Hantsis-Zacharov et Halpern, 2007).	<b>20</b>
<b>Figure 5</b>	Augmentation de la TBC, PBC et PLiBC liée aux variations de température (les points du graphique représentent les logarithmes moyens des valeurs déterminées dans trois échantillons de lait différents) (Cempírková et Mikulová, 2009).	<b>21</b>
<b>Figure 6</b>	Le nombre total des bactéries psychrotrophes dans le lait cru pendant le stockage à 72 h.	<b>22</b>
<b>Figure 7</b>	Courbes de croissance obtenues par modélisation avec l'équation de Gompertz données de comptage des cellules de bactéries viables totales dans des échantillons de lait de 3 vaches pendant 21 jours de stockage à 4 ° C (Boubendir et al., 2015).	<b>22</b>
<b>Figure 8</b>	Appréciations des caractéristiques organoleptiques du fromage peuhl produit à partir du lait des vaches de races Girolando (fromage 1) et Borgou (fromage 2).	<b>27</b>
<b>Figure 9</b>	Attributs sensoriels (arôme, apparence et goût général) des échantillons de yogourt pendant le stockage à une température de $4 \pm 1$ ° C pendant 30 jours.	<b>28</b>
<b>Figure 10</b>	Comparaison des attributs couleur, goût amer, acidité, saveur salée et texture/fermeté, dans les deux échantillons de fromage frais à tartiner, évalué par l'échelle idéale (5 = beaucoup plus que l'idéal ; 3 = idéal ; 1 = beaucoup moins que l'idéal).	<b>29</b>
<b>Figure 11</b>	Les types d'additifs alimentaires naturels (Carocho et al., 2015).	<b>31</b>
<b>Figure 12</b>	Effet de l'addition de préparations de romarin sur le nombre de bactéries psychrotrophes dans la viande (Hać-Szymańczuk et al., 2017).	<b>33</b>
<b>Figure 13</b>	L'effet des extraits d'origan, de marjolaine, de sauge et de réglisse à une concentration de 5% (v/w) sur la survie de <i>B. subtilis</i> en milieu reconstitué lait (T.S; 8,5%) à 7°C.	<b>34</b>
<b>Figure 14</b>	L'effet des extraits d'origan, de marjolaine, de sauge et de réglisse à une concentration de 5 % (v/w) sur la survie d' <i>E. coli</i> dans le lait reconstitué (TS ; 8,5 %) à 7 °C.	<b>35</b>
<b>Figure 15</b>	Les sites de récolte des plantes dans la région de Mila. (service du cadastre de la wilaya de Mila, modifiée, 2021).	<b>36</b>
<b>Figure 16</b>	Sites d'échantillonnage du lait cru de la région de Mila. (service du cadastre de la wilaya de Mila, modifiée, 2021).	<b>37</b>

<b>Figure 17</b>	Echantillonnage du lait cru dans les fermes laitières.	<b>38</b>
<b>Figure 18</b>	Protocole de la préparation de l'extrait aqueux des plantes.	<b>39</b>
<b>Figure 19</b>	Suivi des cinétiques de croissance microbienne durant la réfrigération du lait additionné des EA de romarin et origan.	<b>41</b>
<b>Figure 20</b>	Mode opératoire des cultures bactériennes.	<b>42</b>
<b>Figure 21</b>	Courbes de croissance du nombre total de bactéries viables dans le lait cru supplémenté avec différentes concentrations d'extraits aqueux de <i>Rosmarinus</i> (a), d' <i>Origanum</i> (b) et réfrigéré à 4 °C durant 10 jours.	<b>50</b>
<b>Figure 22</b>	Paramètres de croissance microbienne obtenus par Baranyi et Roberts Modèle de données de comptage moyen de bactéries viables totales dans du lait supplémenté avec différentes concentrations d'extrait aqueux de <i>Rosmarinus</i> et réfrigéré pendant 10 jours à 4 °C.	<b>51</b>
<b>Figure 23</b>	Paramètres de croissance microbienne obtenus par le modèle Baranyi et Roberts des données de comptage moyen de bactéries viables totales dans le lait cru supplémenté avec différentes concentrations d'extrait aqueux d' <i>Origanum</i> et réfrigéré pendant 10 jours à 4 °C.	<b>52</b>
<b>Figure 24</b>	La relation de régression linéaire entre la croissance microbienne maximale et les concentrations d'extraits aqueux de <i>Rosmarinus</i> (a) et d' <i>Origanum</i> (b) additionnés de lait réfrigéré à 4 °C.	<b>55</b>
<b>Figure 25</b>	Evaluation sensorielle de la couleur du lait cru additionné de l'extrait aqueux de <i>Rosmarinus officinalis</i> (0,75 mg mL <sup>-1</sup> , 1 mg mL <sup>-1</sup> ). A : Agréable; TA : Très agréable; D : Désagréable; TD : Très désagréable; NAND : Ni agréable Ni désagréable.	<b>61</b>
<b>Figure 26</b>	Evaluation sensorielle de l'odeur du lait cru additionner de l'extrait aqueux de romarin (0,75 mg mL <sup>-1</sup> , 1 mg mL <sup>-1</sup> ). A : Agréable; TA : Très agréable; D : Désagréable; TD : Très désagréable; NAND : Ni agréable Ni désagréable.	<b>62</b>
<b>Figure 27</b>	Evaluation sensorielle de la saveur du lait cru additionner de l'extrait aqueux de romarin (0,75 mg mL <sup>-1</sup> , 1 mg mL <sup>-1</sup> ). A : Agréable; TA : Très agréable; D : Désagréable; TD : Très désagréable; NAND : Ni agréable Ni désagréable.	<b>63</b>
<b>Figure 28</b>	Evaluation sensorielle de la texture du lait cru additionner de l'extrait aqueux de romarin (0,75 mg mL <sup>-1</sup> , 1 mg mL <sup>-1</sup> ). A : Agréable; TA : Très agréable; D : Désagréable; TD : Très désagréable; NAND : Ni agréable Ni désagréable	<b>64</b>
<b>Figure 29</b>	Evaluation sensorielle de la couleur du lait cru additionner de l'extrait aqueux de l'origan (1,25 mg mL <sup>-1</sup> , 5 mg mL <sup>-1</sup> ). A : Agréable; TA : Très agréable; D : Désagréable; TD : Très désagréable; NAND : Ni agréable Ni désagréable.	<b>66</b>
<b>Figure 30</b>	Evaluation sensorielle de l'odeur du lait cru additionner de l'extrait aqueux de l'origan (1,25 mg mL <sup>-1</sup> , 5 mg mL <sup>-1</sup> ). A : Agréable; TA : Très agréable; D : Désagréable; TD : Très désagréable; NAND : Ni agréable Ni désagréable.	<b>67</b>
<b>Figure 31</b>	Evaluation sensorielle de la saveur du lait cru additionner de l'extrait aqueux de l' <i>Origanum vulgare</i> (1,25 mg mL <sup>-1</sup> , 5 mg mL <sup>-1</sup> ). A : Agréable; TA : Très agréable; D : Désagréable; TD : Très désagréable; NAND : Ni agréable Ni désagréable.	<b>68</b>

<b>Figure 32</b>	Evaluation sensorielle de la texture du lait cru additionner de l'extrait aqueux de <i>l'Origanum vulgare</i> (1,25 mg mL <sup>-1</sup> , 5 mg mL <sup>-1</sup> ). A : Agréable; TA : Très agréable; D : Désagréable; TD : Très désagréable; NAND : Ni agréable Ni désagréable.	<b>69</b>
------------------	--	-----------

## Liste des Tableaux

Numéro	Titre	Page
<b>Tableau 1</b>	La systématique de romarin (Goetz et al., 2012).	<b>05</b>
<b>Tableau 2</b>	Les valeurs minimales de concentrations inhibitrices de l'extait aqueux de romarin.	<b>09</b>
<b>Tableau 3</b>	La systématique d'Origan Guignard (1996).	<b>09</b>
<b>Tableau 4</b>	Les valeurs minimales de concentrations inhibitrices de l'extait aqueux d'origan.	<b>12</b>
<b>Tableau 5</b>	Les valeurs prédites de Gompertz paramètres obtenus en modélisant les données de dénombrement moyen des bactéries viables totales par rapport au stockage réfrigéré de trois échantillons de lait (Boubendir et al., 2015).	<b>23</b>
<b>Tableau 6</b>	Les valeurs de CMI choisie pour calculer les concentrations initiales et la méthode pour calculer les volumes de l'extrait ajouté au lait	<b>40</b>
<b>Tableau 7</b>	Concentrations, pourcentages et volumes des EA ajoutés au lait.	<b>40</b>
<b>Tableau 8</b>	Les valeurs de CMI choisie pour calculer les concentrations initiales et la méthode pour calculer les volumes de l'extrait ajouté au lait pour l'analyse sensorielle	<b>43</b>
<b>Tableau 9</b>	Les valeurs des volumes ajoutés au lait pour l'analyse sensorielle	<b>43</b>
<b>Tableau 10</b>	Description de l'aspect macroscopique des colonies bactériennes se développant sur les milieux gélose nutritive et M.R.S issues du le lait cru additionné d'extraits de plantes.	<b>45</b>
<b>Tableau 11</b>	Les valeurs de la croissance microbienne du lait cru additionné de différentes concentrations d'extrait aqueux de <i>Rosmarinus</i> et <i>Origanum</i> durant 10 jours de réfrigération à 4 °C	<b>48</b>
<b>Tableau 12</b>	Valeurs prédites des paramètres de croissance microbienne par le model Baranyi et Roberts (1995), obtenues en modélisant les données de comptage moyen des bactéries viables totales, durant le stockage réfrigéré du lait additionné de différentes concentrations d'extrait aqueux de <i>Rosmarinus</i> et <i>Origanum</i> .	<b>49</b>
<b>Tableau 13</b>	Les valeurs de la croissance microbienne de <i>Lactobacillus</i> dans le lait cru additionner de différentes concentrations d'extrait aqueux de <i>Rosmarinus</i> durant 10 jours de	<b>56</b>

	réfrigération à 4 °C	
<b>Tableau 14</b>	Les valeurs de la croissance microbienne de <i>Lactobacillus</i> dans le lait cru additionner de différentes concentrations d'extrait aqueux d'Origanum durant 10 jours de réfrigération à 4 °C.	<b>57</b>
<b>Tableau 15</b>	Les valeurs des appréciations de la couleur, l'odeur, la saveur et la texture par les consommateurs du lait cru additionner de l'extrait aqueux de romarin.	<b>59</b>
<b>Tableau 16</b>	Les valeurs de l'analyse sensorielle du lait cru additionnée de l'extrait aqueux de l'origan a révélé des appréciations par les dégustateurs sur la couleur, l'odeur, la saveur et la texture	<b>65</b>

**Liste des Abréviations****Liste des Tableaux****Liste des Figures**

<b>Introduction Générale.....</b>	<b>01</b>
-----------------------------------	-----------

**Partie I : Recherche Bibliographique**

<b>Chapitre 01. Les plantes médicinales en alimentation.....</b>	<b>04</b>
--	-----------

1. Introduction.....	04
----------------------	----

2. L'activité antimicrobienne des plantes.....	04
--	----

3. Généralités sur le romarin et l'origan.....	04
--	----

3.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	04
---	----

3.1.1. Classification botanique.....	05
--------------------------------------	----

3.1.2. Description botanique et répartition géographique.....	05
---	----

3.1.3. Utilisation traditionnelle.....	06
--	----

3.1.4. Propriétés biologiques.....	06
------------------------------------	----

3.1.5. Activité antimicrobienne du romarin et son utilisation dans la conservation des aliments.....	07
--	----

3.1.6. Les valeurs minimales de concentrations inhibitrices pour le romarin.....	08
--	----

3.2. <i>Origanum vulgare</i> L.....	09
-------------------------------------	----

3.2.1. Classification botanique.....	09
--------------------------------------	----

3.2.2. Description botanique et répartition géographique.....	10
---	----

3.2.3. Utilisation traditionnelle.....	10
--	----

3.2.4. Propriétés biologiques.....	11
------------------------------------	----

3.2.5. Activité antimicrobienne du romarin et son utilisation dans la conservation des aliments.....	11
--	----

3.2.6. Les valeurs minimales de concentrations inhibitrices pour l'origan.....	12
--	----

<b>Chapitre 02. Les bactéries psychrotrophes et leur dynamique de croissance.....</b>	<b>13</b>
---	-----------

1. Généralités.....	13
---------------------	----

2. Le microbiote du lait cru.....	13
-----------------------------------	----

2.1. Le microbiote originel.....	14
----------------------------------	----

2.2. Le microbiote de contamination.....	14
--	----

3. Les bactéries psychrotrophes.....	14
--------------------------------------	----

4. Distribution des psychrotrophes dans les environnements naturels.....	15
--	----

5. Classification des bactéries psychrotrophes.....	15
---	----

---

5.1. Agents de toxi-infections alimentaires.....	15
5.2. Agents d'altération des aliments.....	16
6. La corrélation entre la flore psychrotrophe et mésophile.....	16
7. La courbe de croissance des psychrotrophes.....	16
8. Les phases de croissance.....	18
8.1. Phase de latence.....	18
8.2. La phase d'accélération.....	18
8.3. Phase exponentielle.....	18
8.4. Phase stationnaire.....	18
8.5. La phase de déclin.....	19
9. La dynamique de croissance bactérienne à froid dans le lait.....	19
10. La modélisation de la croissance microbienne.....	23
<b>Chapitre 03. Analyse sensorielle.....</b>	<b>24</b>
1. Définition de l'analyse sensorielle.....	24
2. Objectif de l'analyse sensorielle.....	24
3. Principe de la méthodologie sensorielle.....	25
3.1. Propriétés organoleptiques.....	25
3.2. La perception sensorielle.....	25
4. La méthodologie de l'analyse sensorielle.....	25
5. Exemples d'analyse sensorielle.....	26
<b>Chapitre 04. Les additifs alimentaires.....</b>	<b>30</b>
1. Généralités.....	30
2. Additifs alimentaires naturels.....	30
3. Types d'additifs naturels.....	31
3.1. Antioxydants naturels.....	31
3.2. Antimicrobiens naturels.....	32
3.3. Colorants naturels.....	32
3.4. Édulcorants naturels.....	32
4. Exemples d'utilisation des additifs naturels dans les aliments.....	33



**Partie II : Recherche Expérimentale**

<b>1. Matériel et Méthodes.....</b>	<b>36</b>
1.1. Origine géographique et période de récolte.....	36
1.2. Récolte des plantes.....	36
1.3. Echantillonnage du lait cru.....	37
1.3.1. Description des sites d'échantillonnage de lait cru.....	38
1.4. Préparation de l'extrait aqueux.....	38
1.4.1. Calcul des volumes de l'extrait aqueux ajouté au lait.....	39
1.4.2. Détermination du rendement d'extraction.....	41
1.5. Culture bactérienne.....	41
1.6. Analyse sensorielle.....	42
1.6.1. Le principe de la méthode.....	42
1.6.2. Calcul des volumes de l'extrait aqueux ajouté au lait pour l'analyse sensorielle..	43
1.6.3. Mode opératoire de l'analyse sensorielle.....	44
1.7. Analyses Statistiques.....	44
<b>2. Résultats et Discussion.....</b>	<b>45</b>
2.1. Evolution de la flore totale viable durant la réfrigération.....	45
2.1.1. Aspect cultural de la croissance microbienne.....	45
2.1.2. Cinétiques de la croissance microbienne.....	47
2.1.3. Relation de régression linéaire.....	54
2.1.4. Evolution des bactéries lactiques.....	56
2.2. L'analyse sensorielle.....	58
2.2.1. Effet de l'addition du romarin sur la qualité sensorielle du lait.....	59
2.2.2. Effet de l'addition de l'origan sur la qualité sensorielle du lait.....	64
<b>Conclusion.....</b>	<b>72</b>
<b>Référence.....</b>	<b>74</b>
<b>Annexe</b>	

# *Introduction*

### Introduction générale

Depuis l'antiquité, le lait et les produits laitiers constituent une part importante de la nourriture humaine et jouent un rôle important dans l'alimentation. Le lait est défini comme une bonne source de nutriments car il contient de nombreux éléments nutritifs, tels que les protéines, les vitamines, le calcium, le phosphore, etc., qui sont nécessaires pour une vie saine des humains de tout âges et des deux sexes. La nature hautement nutritive du lait le rend un milieu particulièrement bon pour la croissance des microorganismes. La contamination microbienne du lait et des produits laitiers est un problème universel provoquant la détérioration du lait, qui se produit lorsque les microorganismes dégradent les hydrates de carbone, les protéines, les graisses et produisent des produits finaux délétères (Pal et al., 2016; Richmy et al., 2016).

Bien que le lait soit considéré comme un système thermostable, certains changements chimiques et physico-chimiques peuvent apparaître lors du traitement thermique du lait. Ces modifications incluent un brunissement non enzymatique (Maillard), une dénaturation des protéines de lactosérum, des dommages aux propriétés crémeuses et éventuellement une coagulation et une hydrolyse induites par la chaleur des caséines (Lan et al., 2010; Fox et al., 2015). Par conséquent, il y a une augmentation de la demande d'alternatives aux additifs chimiques antimicrobiens, ce qui a conduit à l'exploration de nouveaux composés naturels utilisés comme bioconservateurs pour réduire partiellement ou totalement les additifs chimiques. Une variété de produits naturels dérivés d'animaux, de plantes et de microorganismes peuvent être utilisés en bioconservation pour prolonger la durée de conservation des aliments (El-Saadany et al., 2017; Liu et al., 2017; Khameneh et al., 2019).

Dans le monde entier, la principale préoccupation des consommateurs, des industries alimentaires et des organismes de réglementation est la sécurité microbienne des aliments (Negi, 2012; Kumuda et al., 2017; Ritota et Manzi, 2020). Les additifs alimentaires sont largement utilisés par l'industrie alimentaire pour augmenter la durée de conservation du produit et/ou d'attribuer aussi à l'amélioration de certaines caractéristiques particulières des aliments, qui sont souvent perdues au cours de la transformation. Avec l'avènement de la vie moderne, de plus en plus d'additifs ont été employés par l'industrie alimentaire. Malgré leur large utilisation, ce sont des substances qui peuvent causer des effets indésirables pour la santé des consommateurs tels que les nausées, maux de tête et faiblesse. En outre, ils peuvent

entraîner des risques dangereux pour la santé tels que l'allergie, l'hypersensibilité, l'asthme, des dommages neurologiques, l'hyperactivité et le cancer. Ces facteurs incitent les consommateurs à porter une attention particulière aux produits alimentaires sains (Tarnavölgyi, 2003; Zantar et al., 2013; Daniele et al., 2017; Link et al., 2018; Sharma, 2018). Récemment, des études ont montré que les consommateurs sont devenus plus informés sur les additifs alimentaires et ont toujours tendance à choisir les additifs d'origine naturelle (Beaerth et al., 2014).

Le stockage réfrigéré du lait cru contrôle efficacement la prolifération des populations mésophiles d'altération, tout en favorisant simultanément la croissance de la flore psychrotrophe. Les populations bactériennes psychrotrophes se développant dans le lait sont représentées principalement par des genres à Gram<sup>-</sup> comprenant *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* et *Serratia* ; et un petit nombre de genres Gram<sup>+</sup>, notamment *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Microbacterium* (De jonghe et al., 2011; Oliveira et al., 2015; Boubendir et al., 2016).

Dans le passé, les plantes étaient utilisées dans les aliments non seulement pour aromatiser, mais aussi pour leurs effets thérapeutiques et conservateurs. Il existe une étroite association entre les habitudes alimentaires et la prévention des maladies. La littérature a bien documenté les effets de l'alimentation sur les maladies cardiovasculaires et l'hypertension, l'obésité, le diabète et l'ostéoporose (Abdel-Massih et al., 2010; Ghalem et Zouaoui, 2013; Martins et al., 2014; Abkhoo et Jahani, 2017). Le genre *Origanum* était utilisé comme arôme et assaisonnement alimentaire. En raison de ses composants bioactifs, l'origan présente des activités antiparasitaires, antimicrobiennes, antispasmodiques, stomachiques, diurétiques et immunomodulatrices (Bendifallah et al., 2015; Rahmani Gohar et al., 2016; Khrich, 2018; Alagawany et al., 2020). De plus, le genre *Rosmarinus* est une plante aromatique médicinale traditionnelle largement utilisée comme ingrédient alimentaire pour aromatiser et également reconnu pour ses bienfaits thérapeutiques et ses fortes propriétés antioxydantes, antimutagènes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antirhumatismales et antialgésiques (Ghalem et Zouaoui, 2013; Adam et al 2014; Gad et Sayd 2015, Hać-Szymańczuk et al., 2017). Ahmed El-Sayed et Aly (2014) ont étudié les activités antibactériennes et antitumorales des extraits de *Rosmarinus*. L'effet inhibiteur de l'extrait aqueux contre un certain nombre de bactéries pathogènes a enregistré des valeurs minimales de concentrations

inhibitrices pour les espèces de *Pseudomonas aeruginosa* (0,15 mg mL<sup>-1</sup>), *Staphylococcus aureus* (0,15 mg mL<sup>-1</sup>), *Escherichia coli* (0,1 mg mL<sup>-1</sup>), *Shigella dysenteriae* (0,1 mg mL<sup>-1</sup>), *Klebsiella pneumoniae* (0,1 mg mL<sup>-1</sup>), *Micrococcus roseus* (0,15 mg mL<sup>-1</sup>) et *Bacillus subtilis* (0,15 mg mL<sup>-1</sup>). Licina et al. (2013) ont évalué l'activité antimicrobienne des extraits d'*Origanum* contre les bactéries et les champignons. L'extrait aqueux a démontré le meilleur effet inhibiteur contre les espèces bactériennes testées telles que *P. aeruginosa* (5 mg mL<sup>-1</sup>), *E. coli* (5 mg mL<sup>-1</sup>), *Proteus mirabilis* (0,3 mg mL<sup>-1</sup>), *K. pneumoniae* (2,5 mg mL<sup>-1</sup>), *Salmonella typhimurium* (5 mg mL<sup>-1</sup>), *S. aureus* (0,6 mg mL<sup>-1</sup>), *Enterococcus faecalis* (5 mg mL<sup>-1</sup>) et *Bacillus cereus* (0,3 mg mL<sup>-1</sup>). De plus, l'activité antimicrobienne du romarin et de l'origan a été testée à une concentration de 5 mg mL<sup>-1</sup>, où les deux extraits de plantes ont montré une activité inhibitrice contre *P. fluorescens*, *E. coli*, *S. typhium*, *B. subtilis* et *S. aureus* (Kumuda et al., 2017). Par conséquent, l'application d'herbes dans la fabrication d'aliments pourrait améliorer leurs valeurs nutritionnelles et médicinales (Oraon, 2017; Kaptan et Sivri, 2018; Shahbazi et Shavisi, 2019). Les plantes sont très prometteuses comme source de nouveaux agents antimicrobiens. Les plantes sont facilement disponibles, pas chères et aussi, presque, n'ont pas d'effets secondaires (Khameneh et al., 2019).

Lors du développement et de l'introduction d'un nouvel aliment, la compréhension des croyances, des habitudes et des préférences sensorielles des consommateurs est très importante. Aujourd'hui, le client est de mieux en mieux informé et son choix est alors orienté par les propriétés sensorielles du produit, autrement dit, par son design ou sa qualité perçue. Les bonnes réponses aux questions sensorielles sont extrêmement importantes pour l'existence de tout produit alimentaire testé car elles déterminent son acceptabilité et fournissent des décisions efficaces pour le succès futur du produit sur le marché (Yang et Lee, 2019). L'analyse sensorielle du lait est l'utilisation des sens humains pour analyser objectivement les propriétés du lait telles que le goût, la saveur et la texture (Dark, 2007; Schiano et al., 2017).

Dans ce contexte, les objectifs principaux du présent travail sont :

**Objectif 1 :** Evaluation de l'effet de la supplémentation des extraits aqueux de *Rosmarinus* et *Origanum* au lait réfrigéré sur la dynamique de la croissance microbienne.

**Objectif 2 :** Analyse de la qualité sensorielle du lait cru additionné des extraits aqueux de *Rosmarinus* et *Origanum*.



*Partie I: Recherche  
Bibliographique*

***Chapitre 1 :***  
***Les plantes médicinales***  
***en alimentation***



## Chapitre 1. Les plantes médicinales en alimentation

### 1. Introduction

Les plantes médicinales sont connues depuis l'antiquité comme nourriture, arôme et remèdes traditionnels pour les maladies humaines mais aussi comme médicaments et conservateurs des aliments au cours des dernières décennies, car elles contiennent des composants chimiques de valeur thérapeutique (Shama et al., 2014; Liu et al., 2017), aussi ces plantes ont un spectre antimicrobien contre un large éventail de microorganismes. La richesse en métabolites secondaires crée une source importante de bactéricide et de divers médicaments pharmaceutiques (Abkhoo et Jahani, 2017).

### 2. L'activité antimicrobienne des plantes

Les composés dérivés de plantes sont employés pour traiter des maladies infectieuses et sont montrés une activité antimicrobienne intéressante contre plusieurs agents pathogènes humains. Certains de ces composés présentent une activité antibactérienne intrinsèque et activités de modification de la résistance aux antibiotiques. Certains d'entre eux bien qu'ils ne soient pas efficaces en eux-mêmes en tant qu'antibiotiques, associés aux antibiotiques, ils peuvent venir à bout des antibiotiques résistance chez les bactéries. Il existe de multiples cibles pour les agents antibactériens à savoir (I) la biosynthèse des protéines bactériennes ; (II) la biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne; (III) destruction de la membrane cellulaire bactérienne; (IV) réplication et réparation de l'ADN bactérien, (V) inhibition d'une voie métabolique et des pompes à efflux (EP) (Khameneh et al., 2019).

### 3. Généralités sur le romarin et l'origan

#### 3.1. *Rosmarinus officinalis* L.

*Rosmarinus* (romarin) est un mot latin qui signifie rosée de la mer (ros: rosée, marinus = mer), Son nom vernaculaire est : *klil, iklil al-jabal, âzîr, yazîr* (Alnamer et al., 2012).

### 3.1.1. Classification Botanique

Tableau 1 : la systématique de romarin (Goetz et al, 2012)

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-Règne	<i>Tracheobionta</i>
Superdivision	<i>Spermatophyta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae (labiateae)</i>
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>Rosmarinus officinalis</i>

### 3.1.2. Description Botanique et répartitions Géographiques

Le romarin est une plante vivace (Figure 1) appartient à la famille de Lamiaceae, de un à deux mètres de hauteur, arbuste ou sous-arbrisseau toujours vert, ligneux, très ramifié, très odorant. Les feuilles sont linéaires à marge révolutes, gaufrées, verdâtres en dessus, plus ou moins hispides blanchâtres en dessous. Les fleurs sont d'un bleu pâle ou lilas claire. Plante commune du bassin méditerranée, en particulier sur sol calcaire ou on peut aussi la cultiver dans les jardins. Elle pousse dans différentes régions du monde entier, le sud de l'Europe et dans la région littorale à travers les régions mineures de l'Asie sauvage. Aujourd'hui, le romarin est cultivé dans le monde en raison de son utilisation comme conservateur alimentaire naturel et agent aromatisant (Shama et al., 2014 ; Abkhoo et Jahani, 2017 ; Hamidpour et al., 2017).



**Figure 1** : le romarin ; Sounaoua, Mila (2018).

### 3.1.3. Utilisation traditionnelle

Le romarin est utilisé dans la médecine traditionnelle depuis des siècles. Ses applications ont varié de l'amélioration de la mémoire au traitement des troubles gastro-intestinaux (Abkhoo et Jahani, 2017; Hamidpour et al., 2017).

Aussi pour être utilisé comme une anti-crampe, diurétique, un tonique pour les nerfs, digesteur, antirhumatismal pour la cicatrisation des plaies et un tonique pour la circulation et le cœur. Il est décrit dans les cas de congestion du foie, inflammation de la vésicule biliaire, lavage gastrique, dans certains cas de jaunisse, fatigue, faiblesse physique et intellectuelle suite aux maladies débilitantes pour le corps, migraine, vertiges, palpitations, gifles, grèves, brûlures d'estomac, carminatives et anti-antiseptiques, utiles dans la grippe et l'asthme à venir. (Shama et al., 2014).

Dans la région de Béchar en Algérie, *Rosmarinus officinalis L.* est traditionnellement destiné à la conservation des pâtes, des dattes et comme un emménagogue (Makhloufi, 2013).

### 3.1.4. Propriétés biologiques

*Rosmarinus officinalis* a fait l'objet de plusieurs études récentes pour leur puissante activité antioxydante, antibactérienne, antimutagène, antidiabétique, antitumorigène. En raison de ses propriétés bénéfiques, le romarin est largement utilisé aujourd'hui comme ingrédient alimentaire sous forme frais, feuille séchée, huile essentielle ou sous forme

d'extrait (Lee et al., 2009; Abdel-Massih et al., 2010; Hać-szymańczuk et al., 2017). Les extraits de romarin sont parmi les extraits les plus efficaces et largement utilisés dans le traitement des aliments (Kumuda et al., 2017).

Les huiles essentielles et les extraits de romarin contiennent des composés biologiquement actifs qui les rendent uniques. Par exemple, les composés phénoliques tels que l'acide carnosique, le carnosol et l'acide rosmarinique sont responsables de la forte activité antioxydante de l'huile essentielle et de l'extrait de romarin. Cette importante activité antioxydante rend non seulement le romarin un conservateur alimentaire efficace, mais il représente également la quasi-totalité des autres capacités thérapeutiques de romarin, y compris ses propriétés anticancéreuses et mécanismes antidiabétiques. Aujourd'hui le romarin est une plante de grand intérêt dans les industries alimentaires et médicales (Hamidpour et al., 2017).

Le romarin empêche l'oxydation et la contamination microbienne. Par conséquent, l'extrait de romarin est utile pour diminuer ou même remplacer les antioxydants synthétiques dans les aliments. Ces extraits offrent plusieurs avantages technologiques et bénéfiques aux consommateurs (Nieto et al., 2018).

### **3.1.5. Activité antimicrobienne du romarin et son utilisation dans la conservation des aliments**

Hamidpour et al. (2017) ont démontrées que le romarin inhibe la croissance de bactéries telles que *E. coli*, *L. monocytogenes*, et *S. aureus*. Le romarin possède le potentiel d'inhiber la résistance aux médicaments de certaines bactéries en surmontant et en réduisant l'imperméabilité de membranes de ces bactéries.

Le romarin est appliqué dans des préparations pour améliorer la qualité microbiologique de différents produits carnés, entre autres de porc frais emballé sous atmosphère modifiée, de tranches de jambon emballées sous vide et dans la saucisse fraîche africaine. Les préparations de romarin peuvent être utilisées aussi pour minimiser les changements oxydatifs dans la viande et les produits à base de viande (Negi, 2012 ; Hać-szymańczuk et al., 2017).

Nieto et al. (2018) montrent que l'activité antibactérienne de l'huile de romarin contre *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas hydrophila*, et

*Salmonella choleraesuis*. Cette huile essentielle a été incorporée dans la viande rapportant une activité antibactérienne contre *Brochothrix thermosphacta* et *Enterobacteriaceae*.

La poudre de romarin est ajoutée à la galette de riz pour améliorer leur qualité microbienne et leur qualité sensorielle. L'utilisation de l'extrait de romarin retarde l'oxydation des lipides dans la viande pour améliorer leur qualité et valeur nutritionnelle (Lee et al., 2009; Kumuda et al., 2017).

Diverses études ont démontré que le complexe des substances actives de romarin ont un effet inhibiteur sur un large spectre de bactéries, y compris *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. subtilis* et *K. pneumoniae* ( Hać-szymańczuk et al., 2017).

L'ajout de poudre de romarin est efficace pour inhiber ou retarder la croissance de *B. cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157: H7, *S. aureus* et *Listeria monocytogenes* dans les gâteau de riz. Les extraits de romarin possèdent une fort activité antimicrobiennes contre les bactéries Gram<sup>+</sup> à savoir *S. aureus* et *B. subtilis* par rapport aux bactéries Gram<sup>-</sup> à savoir *E. coli*, *S. typhium* et *Pseudomonas fluorescens* (Lee et al., 2009; Kumuda et al., 2017).

El Sayed (2014); Shama et al. (2014); Hać-szymańczuk et al. (2017) ont indiqué que l'extrait aqueux de romarin restreint la croissance de la microflore bactérienne et diminue l'oxydation des lipides sous vide du poulet conservés à -18 °C pendant 4 mois. Il est aussi actif contre un certain nombre de bactéries pathogènes, y compris *K. pneumoniae*, *P. aeuroginosa*, *Shigella dysenteriae* (Gram<sup>-</sup>) et *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. roseus* (Gram<sup>+</sup>).

### 3.1.6. Les valeurs minimales de concentrations inhibitrices pour le romarin

L'effet inhibiteur de l'extrait aqueux contre un certain nombre de bactéries pathogènes a enregistré des valeurs minimales de concentrations inhibitrices résumé dans le Tableau 2

**Tableau 2 :** Les valeurs minimales de concentrations inhibitrices pour le romarin.

CMI (mg mL <sup>-1</sup> )					
	Moreno et al. (2006)	El Sayed et Aly . (2014)	Abkhoo et Jahani (2017)	Doudach et al. (2012)	Abdel-Massih et al. (2010)
<i>L. monocytogenes</i>				-	
<i>S. aureus</i>	0.025	0.150	-	3.12	
<i>K. pneumoniae</i>	-	0.1		3.12	0.080
<i>E. faecalis</i>	-			-	
<i>E. coli</i>	-	0.1	-	3.12	0.080
<i>P. aeruginosa</i>		0.150		3.12	

### 3.2. *Origanum vulgare* L.

Le nom du genre *Origanum* vient du grec *origanon*, qui serait la réunion des termes *oros* (montagne) et *ganos* (brillant), d'où la signification (qui se plaît sur le montage) (Dubios et al., 2006).

#### 3.2.1. Classification Botanique

**Tableau 3 :** la systématique d'Origan (Guignard 1996).

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Phanérogames ou Spermaphytes</i>
Classe	<i>Dicotylédones</i>
Sous-classe	<i>Gamopétales</i>
Super ordre	<i>Tubiflorales</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Origanum</i>
Espèce	<i>Origanum vulgare</i>

### 3.2.2. Description botanique et répartition géographique

L'Origan est une plante aromatique (Figure 2) herbacée vivace appartient à la famille des Lamiaceae. C'est une plante annuelle de 30 à 100 cm de hauteur au feuillage et aux fleurs très odorants quand on les froisse. Les tiges dressées, souvent rougeâtres et velues, atteignant 50 cm de hauteur, les feuilles sont ovales et les fleurs sont pourpres. Il pousse dans les régions arides et ensoleillées, il est distribués en Europe, en Asie et en Tell de l'Afrique du Nord, mais la plus grande distribution de l'origan est dans le bassin de la méditerranée (Licina et al., 2013).



**Figure 2** : l'origan, Ain Tinn, Mila (2018).

### 3.2.3. Utilisation Traditionnelle

L'origan est une herbe culinaire importante, utilisée comme épice autour du monde. En médecine traditionnelle elle est utilisée pour traiter les troubles respiratoires, la dyspepsie, la polyarthrite rhumatoïde, caries dentaires, antiseptiques, antispasmodiques et les troubles des voies urinaires (Saeed et Tariq, 2009; Teixeira et al., 2013; Martins et al., 2014).

L'origan est utilisé dans la médecine traditionnelle contre le froid, pour problèmes digestif et respiratoire ainsi que des moyens pour le bien-être général du corps. Les pommades à base d'origan sont bénéfiques pour l'infection et cicatrisation des plaies. Ses feuilles sont traditionnellement utilisées comme antiseptiques et désinfectants (Licina et al., 2013; Bendifallah et al., 2015).

En Algérie, communément appelé « zaâter », l'origan est une plante essentiellement médicinale qui jouit d'une grande ferveur populaire (Baba 1990). Elle est utilisée comme tisane par la population locale pour guérir plusieurs maladies telles que : rhumatismes, toux, rhume et troubles digestifs (Erdogan et Belhattab, 2010).

### 3.2.4. Propriétés biologiques

L'origan possède plusieurs activités telle que : activité antibactérienne, antifongique, antioxydante, antispasmodique, urolithique, anti-glycémique, anti-inflammatoire, antiparasitaire et nimaticide (Oka et al., 2000; Kintzios, 2002; Ocana-Fuentes et al., 2010; Kumuda et al., 2017)

Il a fait l'objet de plusieurs études validant ses effets antifongiques, antibactériens, antifongiques et antiviraux (Arcila-Lozano et al., 2004; El Gendy et al., 2015; Bendifallah et al., 2015; Kumuda et al., 2017). Les extraits d'origan sont moins étudiés que les huiles essentielles. L'extrait de l'eau, d'acétate d'éthyle et d'éther diéthylique de méthanol a montré une activité anti-inflammatoire, antibactérienne et antioxydante alors que des études antérieures rapportent le potentiel de l'huile essentielle d'origan pour conserver les aliments, comme le poulet frais (Licina et al., 2013; Teixeira et al., 2014; Kandasamy et al., 2017).

### 3.2.5. L'activité antimicrobienne de l'origan et son utilisation dans la conservation des aliments

L'origan possède un goût agréable, une odeur suggestive et présente aussi à une faible toxicité, pour cette raison il est utilisé comme additif alimentaire pour prévenir les bactéries de contamination et pour protéger les aliments, car il est expérimentalement confirmé que l'origan possède des activités antimicrobiennes contre les champignons et les bactéries pathogènes et d'altération (Kandasamy et al., 2017; Liu et al., 2017).

De plus, l'extrait d'origan est considéré comme un composé inhibiteur efficace contre *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. typhimurium* et *E. coli* (Licina et al., 2013; Shahbazi et Shavisi, 2019). En outre, Bankova et Popova (2017) ont confirmés que les extraits aqueux d'herbes d'origan séchées présentaient une activité antimicrobienne contre *Enterococcus faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *Candida*. Martins et al. (2014) ont rapportés l'efficacité d'extrait d'eau d'origan contre les microorganismes Gram<sup>+</sup> (*Staphylococcus*) et Gram<sup>-</sup> (*Enterobacteria* et *P. aeruginosa*). L'extrait d'origan pourrait



être utilisé comme composé naturel pour améliorer la durée de conservation du yogourt à des températures réfrigérées pendant 30 jours (Shahbazi et Shavisi, 2019). De plus, l'efficacité antibactérienne des extraits d'herbes d'origan ajoutés au fromage contre les agents pathogènes d'origine alimentaire a été démontrée (El-Sayed et Ahmed M. Youssef, 2019; Ritot et Manzi, 2020).

**3.2.6. Les valeurs minimales de concentrations inhibitrices pour l’origan**

L'effet inhibiteur de l'extrait aqueux contre un certain nombre de bactéries pathogènes a enregistré des valeurs minimales de concentrations inhibitrices résumé dans le Tableau 4

**Tableau 4:** valeurs minimales de concentrations inhibitrices pour l’origan.

	CMI (mg mL <sup>-1</sup> )			
	Licina et al. (2013)	Teixeira et al. (2013)	Kandasamy et al. (2017)	Kumuda et al. (2017)
<i>B. cereus</i>	0.3		3.12	
<i>E. faecalis</i>	5			
<i>E. coli</i>	5	inhibition not detected	25	5
<i>K. pneumoniae</i>	2.5			
<i>Proteus mirabilis</i>	0.3			
<i>P. aeruginosa</i>	5	inhibition not detected	25	
<i>S. aureus</i>	0.6		1.25	5
<i>S. typhimurium</i>	5	inhibition not detected		5
<i>Bacillus subtilis</i>				5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>				5
<i>L. monocytogenes</i>		inhibition not detected	3.12	

***Chapitre 2 :***  
***Les bactéries***  
***psychrotrophes et leur***  
***dynamique de croissance***  
***microbienne***

## **Chapitre 2. Les bactéries psychrotrophes et leur dynamique de croissance microbienne**

### **1. Généralités**

Le taux de contamination microbienne du lait cru de vache est influencé par l'état de santé et l'hygiène des vaches laitières, l'hygiène de l'environnement dans lequel les vaches laitières sont hébergées et traitées, les méthodes de préparation des mamelles et de traite, les méthodes de nettoyage et de désinfection, machines à traire et réservoirs à lait, hygiène du personnel soignant. D'autres facteurs importants sont le taux de refroidissement du lait à la température requise et la durée du stockage du lait (Cempírková, 2007; Yuan et al., 2019).

Le stockage à froid du lait dans les fermes minimise la croissance de la microflore mésophile, cependant les basses températures favorisent la croissance de la microflore psychrotrophe dans le lait (Cempírková, 2007; Yuan et al., 2019), de ce fait les populations de bactéries psychrotrophes dominent la microflore, et leurs enzymes extracellulaires, essentiellement les protéases, les lipases et les phospholipases (Bornert, 2000), contribuent à l'altération des produits laitiers (Hantsis-Zacharov et Halpern, 2007; Cempírková et Mikulová, 2009; Boubendir et al., 2011; De jonghe et al., 2011).

La majorité des bactéries psychrotrophes responsables de la détérioration du lait et des produits laitiers ne sont pas pathogènes. Cependant, certaines espèces de ces bactéries ont la capacité de produire des toxines et / ou montrent une résistance aux antibiotiques et doivent donc être considérées comme des bactéries pathogènes opportunistes humaines (Bornert, 2000; Samarzija et al., 2012).

### **2. Le microbiote du lait cru**

En raison de sa haute valeur nutritionnelle le lait cru constitue un milieu nutritif pour la croissance d'un large spectre de microorganismes et prend en charge des bactéries d'altération et pathogènes qui contaminent le lait pendant la collecte et / ou traitement. Plus de 160 espèces bactériennes ont été identifiées dans le lait cru (McClements et al., 2001; Oliveira et al., 2015; Yuan et al., 2019).

### 2.1. Le microbiote originel

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de  $10^3$  germes/mL). Il s'agit de germes essentiellement saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoques mais aussi streptocoques lactiques (*Lactococcus*) et lactobacilles. Le lait est protégé par des substances inhibitrices appelées « lacténines » mais, leur action est de courte durée (1 heure environ) (Guiraud, 1998).

### 2.2. Le microbiote de contamination

Selon Guiraud (1998), le lait se contamine par des apports microbiens d'origines diverses :

- **fèces et téguments de l'animal** : coliformes, entérocoques, *Clostridium*, éventuellement Entérobactéries pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), etc.
- **sol**: *Streptomyces*, *Listeria*, bactéries sporulées, spores fongiques, etc.
- **litières et aliments** : flore banale variée, en particulier lactobacilles, *Clostridium* butyrique(ensilage).
- **air et eau**: flores divers dont *Pseudomonas*, bactéries sporulées, etc.
- **équipement de traite et de stockage du lait** : microcoques, levures et flore lactique avec lactobacilles, streptocoques (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*), *Leuconostoc*, etc.
- **manipulateurs** : staphylocoques dans le cas de traite manuelle, mais aussi germes provenant d'expectorations, de contamination fécale, etc.
- **vecteurs divers (insectes en particulier)** : flore de contamination fécale.

### 3. Les bactéries psychrotrophes

Le terme psychrotrophe se réfère à des microorganismes qui ont la capacité de croître à basse température mais qui ont un optimum et un maximum de températures de croissance supérieures à 15 et 20 °C, respectivement. Cette caractéristique rend ces microbes particulièrement importants en ce qui concerne la détérioration des aliments et la sécurité, étant donné que le stockage de nombreux aliments à froid, les températures sont une pratique de routine pendant la production, le transport, traitement et après achat (De Jonghe et al., 2011 ; Oliveira et al., 2015).

Les bactéries psychrophiles appartiennent aussi au groupe des psychrotrophes, mais en pratique les principales bactéries psychrotrophes d'intérêt alimentaire sont mésophiles (Hantsis-Zacharov et Halpern, 2007; Boubendir et al., 2011).

Des bactéries psychrotrophes de divers genres ont été isolées à partir du lait (Tableau 6), à la fois des Gram - "*Pseudomonas, Aeromonas, Serratia, Acinetobacter, Alcaligenes, Achromobacter, Enterobacter, et Flavobacterium*" et des Gram + "*Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Microbacterium, Micrococcus, Streptococcus, Staphylococcus, et Lactobacillus*" (McClements et al., 2001; Boubendir et al., 2011).

Cependant, les genres *Enterococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. sont considérés comme les psychrotrophes les plus importants contribuant à la détérioration du lait par la production d'enzymes lipolytiques et protéolytiques (Gunasekera et al., 2002; Hantsis-Zacharov et Halpern, 2007).

#### 4. Distribution des psychrotrophes dans les environnements naturels

Les micro-organismes psychrotrophes ne sont pas uniquement confinés aux régions polaires mais ont été isolés d'une gamme variée d'environnements tempérés. En outre, ils ont été isolés de produits laitiers, notamment du lait cru et pasteurisé, de la crème et du beurre, du bœuf réfrigéré et des légumes. Ces données indiquent que les microorganismes psychrotrophes sont omniprésents et sont présents dans divers habitats (Anthony et Graham, 2000; Samarzija et al., 2012).

#### 5. Classification des bactéries psychrotrophes

Il est possible de classer les bactéries psychrotrophes en deux groupes, en fonction de leurs effets : les agents de toxi-infections alimentaires et les agents d'altération des aliments.

##### 5.1. Agents de toxi-infections alimentaires

De plus, à présenter des caractéristiques de détérioration, certaines espèces appartenant aux psychrotrophes sont considérées comme des bactéries pathogènes opportunistes qui possèdent une résistance inhérente aux antibiotiques et / ou produisent des toxines (Samarzija et al., 2012).

Il est important de retenir la place prépondérante de *L. monocytogenes* en tant que bactérie psychrotrophe pathogène pour l'homme. Les espèces *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* sont impliquées de façon beaucoup plus rare dans des accidents d'origine alimentaire. D'autres bactéries présentent un intérêt pratique mineur, en particulier *Aeromonas hydrophila* et *Plesiomonas shigelloides*. Enfin, il faut noter que certaines souches de *Salmonella* et de *Escherichia coli* sont susceptibles de se développer entre +5 °C et +7 °C, mais que ces souches restent atypiques de sorte que ces micro-organismes ne sont pas considérés parmi les psychrotrophes (Bornert, 2000).

### 5.2. Agents d'altération des aliments

Les bactéries psychrotrophes agents d'altérations des aliments sont beaucoup plus nombreuses et variées, mais la famille des *Pseudomonadaceae* est souvent la plus représentée (Gunasekera et al., 2002 ; Oliveira et al., 2015). Elle regroupe Aussi, des bacilles, le genre *Pseudomonas*, les genres *Shewanella*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Alteromonas* et *Flavobacterium* sont aussi fréquemment rencontrés dans les denrées alimentaires (Bornert, 2000).

### 6. La corrélation entre la flore psychrotrophe et mésophile

Le lait frais tiré de la mamelle souvent ne contient pas de populations des bactéries psychrotrophes. Cependant, ces populations se développent au fil du temps de stockage à froid du lait cru. (Oliveira et al., 2015).

Le stockage à froid du lait dans les fermes minimise la croissance de la microflore mésophile, mais il a apporté à propos d'un nouveau problème parce que les basses températures permettent la croissance de la microflore psychrotrophique dans le lait. La présence de bactéries psychrotrophes dans le lait est significativement corrélée avec l'apparition des bactéries mésophiles (Cempírková, 2007; Samarzija et al., 2012; Oliveira et al., 2015).

### 7. La courbe de croissance des psychrotrophes

Les bactéries mésophiles psychrotrophes présentent, aux températures de réfrigération, une courbe de croissance caractérisée par une phase de latence longue, pouvant durer plusieurs jours, et par une pente très faible au cours de la phase de croissance

exponentielle, témoignant d'un allongement important du temps de génération. Plus la température est proche de la température limite inférieure de croissance et plus la multiplication est lente. Des écarts très faibles de température peuvent avoir une incidence notable sur l'activité de la flore psychrotrophe. Ainsi, si une température de +2°C exerce un effet inhibiteur très net, une activité bactérienne très significative peut être constatée dès +4°C (Bornert, 2000).

Les phases de la courbe de croissance peuvent être décrites par trois paramètres: le taux de croissance spécifique maximal,  $\mu_{max}$  est défini comme la tangente au point d'inflexion; le temps de génération G (ou bien  $\lambda$ ) est défini comme l'ordonnée à l'origine de cette tangente; et l'asymptote [ $X = \log(N)$ ] est la valeur maximale atteinte (Zwietering et al., 1990). La (Figure 3) décrit la courbe de croissance d'une culture bactérienne et ses différentes phases. (Delhalle et al., 2012).

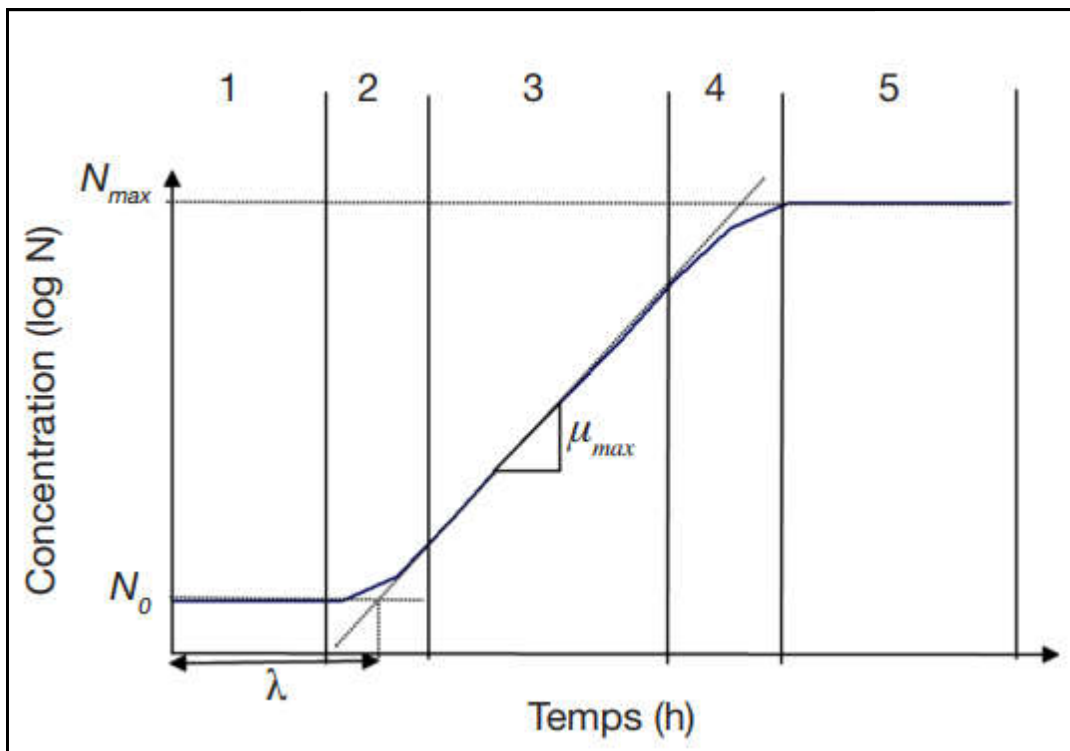


Figure 3 : Courbe de croissance d'une culture bactérienne avec ses différentes phases (Delhalle et al., 2012).

## **8. Les phases de croissance**

### **8.1. Phase de latence**

Pendant cette phase, la vitesse de croissance ou le taux de croissance est nul ( $\mu = 0$ ). Lorsqu'une population microbienne se trouve placée dans un milieu favorable, la croissance ne débute pas immédiatement mais seulement après une phase de latence de durée variable. Ceci est la conséquence de phénomènes divers : effet de dilution, absorption sur les surfaces, effet toxique transitoire de milieu, adaptation aux nouvelles conditions (Prescott et al., 2003).

### **8.2. La phase d'accélération**

Cette phase est considérée comme faisant partie de la phase de latence. Les bactéries commencent à se multiplier pour atteindre progressivement la vitesse maximum de croissance  $\mu_{\max}$ , pendant laquelle le métabolisme cellulaire reprend et la croissance démarre (Augustin et Garry, 2005).

### **8.3. Phase exponentielle**

La phase exponentielle ou logarithmique fait suite à la période de latence. C'est la phase physiologique par excellence : les bactéries se multiplient sans entrave ( $\mu = \mu_{\max}$ ). Le taux de croissance est maximal et constant, ce qui revient à dire que le temps de génération est minimal (Guezlane-tebibel et al., 2010). Pendant cette phase la vitesse de croissance est constante, les organismes se divisent et doublent leur nombre à intervalles de temps réguliers. La croissance exponentielle est une croissance à l'équilibre, tous les constituants cellulaires sont synthétisés à des vitesses constantes les uns par rapport aux autres. Un changement des concentrations en nutriments ou conditions de culture provoque une croissance en équilibre instable car la vitesse de synthèse des composants cellulaires varient les uns par rapport aux autres jusqu'à ce qu'un nouvel état d'équilibre soit atteint (Prescott et al., 2003).

### **8.4. Phase stationnaire**

À la fin de la phase de croissance, la courbe devient horizontale. La phase stationnaire correspond à un équilibre entre division et mort cellulaire ou bien la population peut cesser de diviser, mais reste métaboliquement active (Prieur et al., 2011). Les populations



microbiennes entrent en phase stationnaire pour plusieurs raisons. Un des facteurs le plus évident est la limitation en élément nutritifs. Si une substance essentielle est sévèrement réduite, la croissance de la population diminuée (Prescott et al., 2003). On peut définir une phase de ralentissement entre la phase exponentielle et la phase stationnaire. Durant cette phase, le taux népérien de croissance passe de sa valeur maximal à zéro.

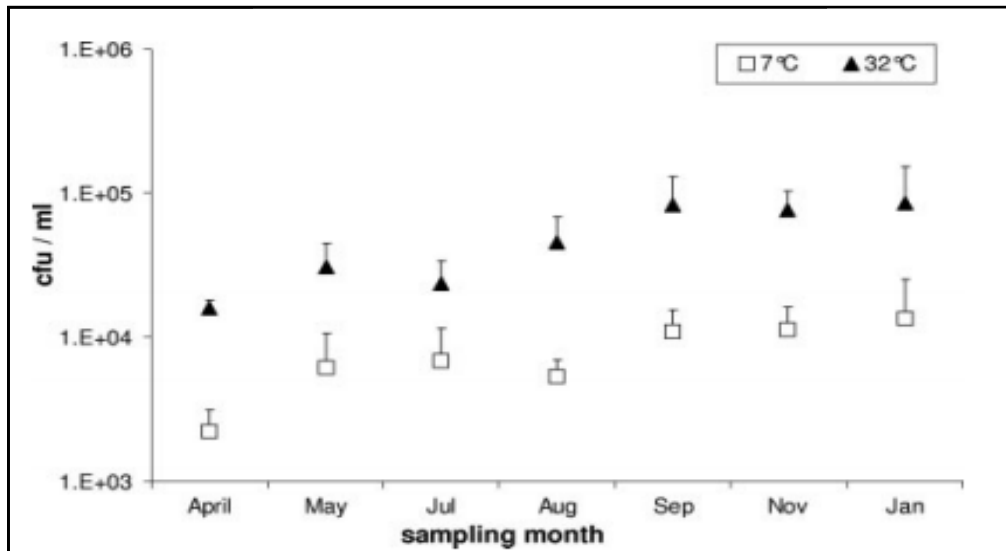
### 8.5. La phase de déclin

Au cours de la phase de déclin ou de mortalité, les bactéries ne se divisent plus, beaucoup d'entre elles meurent et sont lysées par les enzymes qu'elles libèrent. Le taux de mortalité peut être constant comme le taux de croissance (Guezlane-tebibel et al., 2010). La mort d'une population microbienne, comme sa croissance durant la phase exponentielle, est habituellement logarithmique (une proportion constante de cellules meurt chaque heure) souvent la seule façon de déterminer si une cellule bactérienne est morte, est de l'incuber (Prescott et al., 2003).

La phase de décroissance ne se traduit pas toujours par un taux de mortalité d'ordre exponentiel. Dans certains cas, des bactéries survivantes peuvent amorcer une nouvelle phase de multiplication aux dépens des substances libérées par la lyse (c'est la phase cryptique). On parle aussi de phase d'accélération (entre phase de latence et phase stationnaire) où  $\mu$  augmente, et de phase de ralentissement (entre phase exponentiel et phase stationnaire) où  $\mu$  diminue (Guezlane-tebibel et al., 2010).

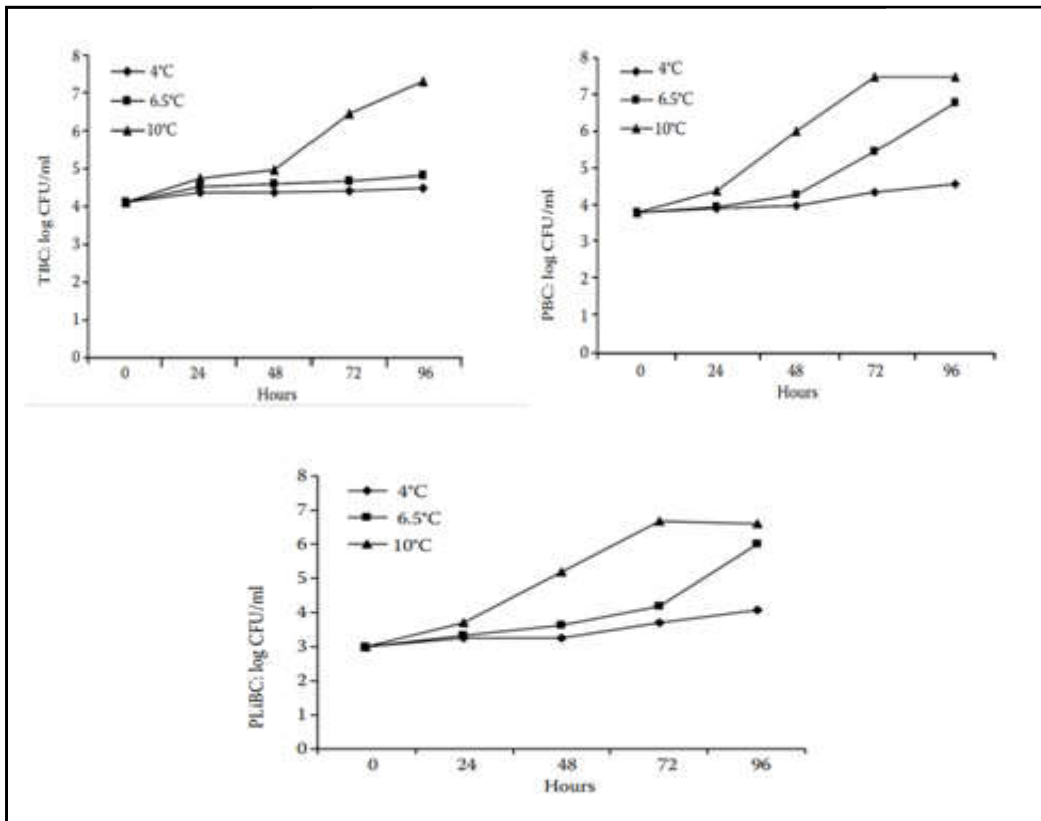
### 9. La dynamique de croissance bactérienne à froid dans le lait

Hantsis-Zacharov et Halpern (2007) ont étudiés les populations des bactéries psychrotrophes et mésophiles durant différentes saisons, et ils ont trouvés une corrélation significative entre la dynamique des deux populations. Les communautés psychrotrophes et mésophiles ont augmentés ou diminués selon le même schéma au cours des différentes saisons (Figure 4).



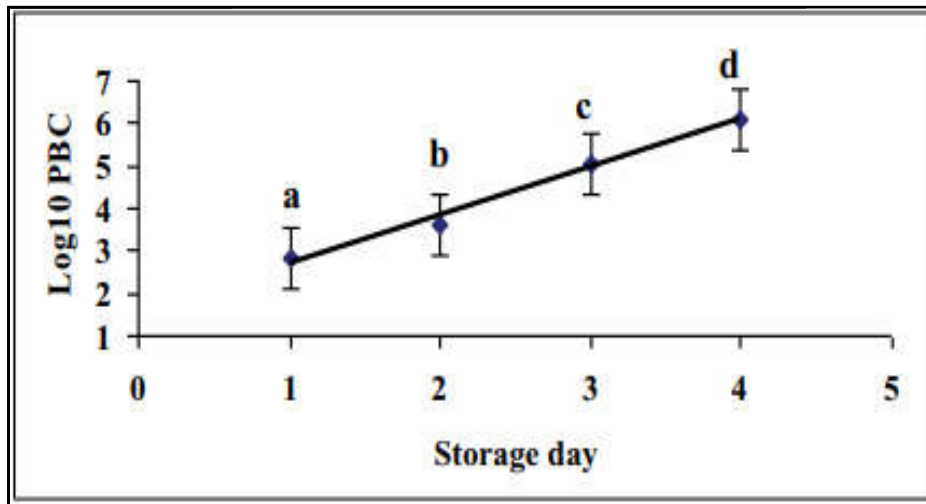
**Figure 4 :** Dynamique des populations bactériennes psychrotrophes (□) et mésophiles (▲) dans le lait cru (Hantsis-Zacharov et Halpern, 2007).

La contamination des échantillons du lait cru de vache par les bactéries lipolytiques psychrotrophes, le nombre total de bactéries psychrotrophes et de bactéries mésophiles a été surveillée pendant deux ans sur huit fermes laitières par (Cempírková et Mikulová, 2009). La dynamique de la croissance des bactéries lipolytiques psychrotrophes, le nombre total de bactéries psychrotrophes et les bactéries mésophiles dans le lait cru de vache, a été étudiée expérimentalement dans trois échantillons de lait en vrac non conservés à différentes températures (4, 6, 5 et 10 °C), était liée au temps, à la température de stockage et à la contamination initiale du lait cru (Figure 5) (Cempírková et Mikulová, 2009).



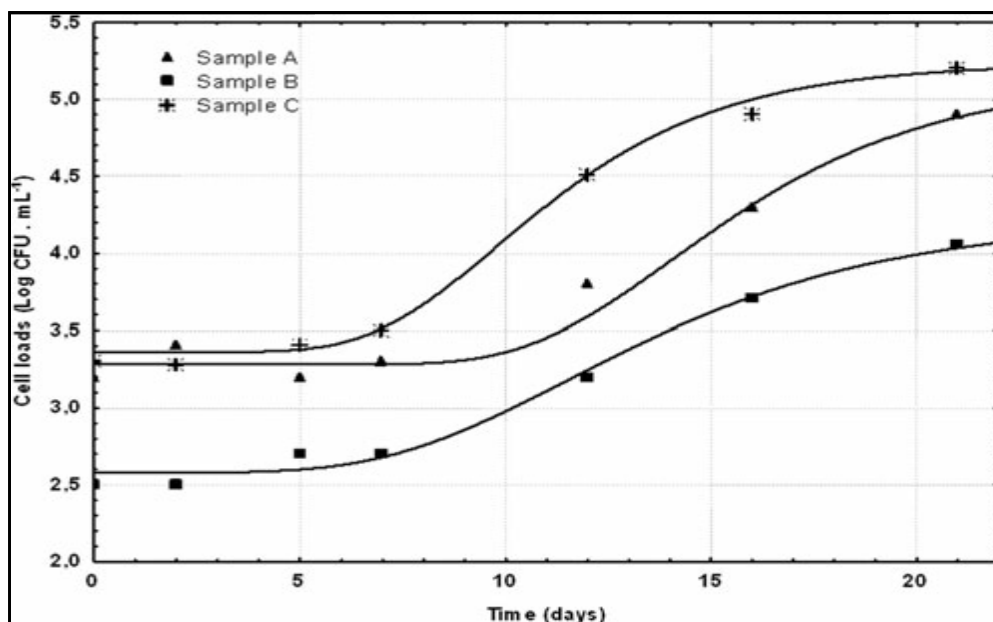
**Figure 5 :** Augmentation des bactéries lipolytiques psychrotrophes, le nombre total de bactéries psychrotrophes et de bactéries mésophiles liée aux variations de température (les points du graphique représentent les logarithmes moyens des valeurs déterminées dans trois échantillons de lait différents) (Cempírková et Mikulová, 2009).

Gargouri et al, (2013) ont étudié la dynamique de la croissance des micro-organismes psychrotrophes dans des échantillons du lait cru stocker à 4 °C pendant 72 h.



**Figure 6 :** Le nombre total des bactéries psychrotrophes dans le lait cru pendant le stockage à 72 h.

Boubendir et al. (2015) ont étudié le lait de vache d'une la région semi-aride de l'Algérie, la diversité des communautés bactériennes de lait cru et l'effet de la réfrigération sur leur dynamique.



**Figure 7:** Courbes de croissance obtenues par modélisation avec l'équation de Gompertz données de comptage des cellules de bactéries viables totales dans des échantillons de lait de 3 vaches pendant 21 jours de stockage à 4 ° C (Boubendir et al., 2015).

Les 3 échantillons de lait ont été analysés pendant 21 jours en raison d'une croissance microbienne lente. Le nombre initial d'échantillons de lait, allant de 2,5 à 3,5 Log UFC

.mL<sup>-1</sup>. Le tableau 7 rapporte les paramètres Gompertz obtenus. **Tableau 5** : Les valeurs prédites de Gompertz paramètres obtenus en modélisant les données de dénombrement moyen des bactéries viables totales par rapport au stockage réfrigéré de trois échantillons de lait (Boubendir et al., 2015).

	$\mu \text{ max}$	$\lambda$
<b>Échantillon A</b>	0.19	10.50
<b>Échantillon B</b>	0.14	07.10
<b>Échantillon C</b>	0.22	06.74
<b>Mean</b>	0.18	08.11

$\mu \text{ max}$  : la vitesse maximal de croissance ( $\Delta \text{ Log UFC.mL}^{-1} \cdot \text{jour}$ )  
 $\lambda$  : le temps de génération (jours)

### **10. La modélisation de la croissance microbienne**

Les problèmes couramment rencontrés liés à la modélisation de la croissance bactérienne dans les aliments sont analysés d'un point de vue mathématique. Les techniques et les termes de modélisation, dont certains sont mal utilisés, sont discutés et une tentative est faite pour clarifier comment et dans quelles conditions ils peuvent être utilisés. Un cadre théorique est donné pour fournir une base dans laquelle les modèles mathématiques ayant été utilisés en microbiologie prédictive peuvent être intégrés. En utilisant plusieurs idéalizations simplificatrices comme compromis entre la complexité du système biologique et les données disponibles, un modèle pratiquement utilisable devient disponible (McMeekin et al., 1993; Baranyi et Roberts, 1995).

Les modèles trouvés plus souvent dans le domaine mentionné ci-dessus sont les Gompertz modifiés modèle (Gibson et Roberts, 1986; Gibson et al., 1988) et le modèle Baranyi (Baranyi et al., 1993; Baranyi et Roberts, 1994). En général, on considère que le modèle Baranyi fournit une meilleure qualité d'ajustement que l'équation de Gompertz modifiée. De plus, le modèle Gompertz modifié manque d'un mécanisme base, et le modèle de Baranyi fournit une interprétation biologique pour la phase de latence (Baranyi et Roberts, 1995).

***Chapitre 3 :***  
***Analyse Sensorielle***

## Chapitre 3. Analyse Sensorielle

### 1. Définition de l'analyse sensorielle

L'analyse sensorielle est une science multidisciplinaire qui fait appel à des dégustateurs et à leur sens de la vue, de l'odorat, du goût, du toucher et de l'ouïe pour mesurer, analyser et interpréter les réactions aux caractéristiques organoleptiques et l'acceptabilité de produits alimentaires ainsi que de nombreux autres produits (Watts et al., 1991; Jain et Gupta, 2005).

Il s'agit donc d'utiliser l'être humain comme instrument de mesure en mettant à profit ses capacités olfactives, gustatives, visuelles, auditives et tactiles pour caractériser et évaluer les qualités sensorielles d'un produit (Claustrioux, 2001; Chen-yen-Su, 2016).

### 2. Objectif de l'analyse sensorielle

L'analyse sensorielle consiste à étudier d'une manière ordonnée et structurée les propriétés d'un produit afin de pouvoir le décrire, de le classer ou de l'améliorer d'une façon extrêmement objective et rigoureuse (Toussaint, 2003).

Si le produit doit être perçu comme différent, les épreuves d'évaluation sensorielle permettent de confirmer ou d'infirmer cette réalité. Elles contribuent les efforts de conception nécessaire à l'amélioration des stimuli perçus par le consommateur (Avramescu et al., 2014).

Ainsi, selon le type, l'évaluation sensorielle peut avoir comme objectifs.

- ✓ Décrire et caractériser les produits afin d'établir un profil sensoriel.
- ✓ L'étude de la compréhension des consommateurs et/ou de leurs préférences.
- ✓ Amélioration et optimisation de la qualité des produits ou conception de nouveaux produits.
- ✓ Etudier l'impact des conditions de fabrication, suivre les effets du stockage et déterminer ainsi une date limite d'utilisation optimale.
- ✓ La comparaison entre les produits concurrents.
- ✓ La comparaison entre deux produits pour étudier l'influence de certains procédés technologiques sur les qualités organoleptiques de ces derniers (Branger et al., 2007; Darke, 2007; Deneulin et Pfister, 2013).

### 3. Principe de la méthodologie sensorielle

#### 3.1. Propriétés organoleptiques

Selon Diane et al. (2010), la qualité organoleptique des aliments regroupe les propriétés d'un produit perceptibles par les organes des sens:

- ✓ **L'apparence:** l'apparence peut être les attributs de qualité initiaux qui attirent le consommateur vers un produit et peut aider dans les achats impulsifs.
- ✓ **La saveur:** la saveur a été définie comme un mélange des sensations de goût (sucré, acide, salé, amer), d'odorat, la pression, et souvent des sensations cutanées telles que la chaleur ou douleur légère. La saveur est généralement décrite par l'arôme (odeur et le goût).
- ✓ **La texture:** les paramètres de texture des produits sont perçus avec le sens du toucher, soit lorsque le produit est ramassé par la main ou placé dans la bouche et mâché.

#### 3.2. La perception sensorielle

La perception est une opération psychophysique de traitement de données par nos récepteurs sensoriels qui se déroule en trois étapes: transduction, codage et intégration (Avanzini et al., 2017).

L'être humain est équipé de capteurs sensoriels. Ces capteurs constituent une interface entre le sujet et le monde extérieur et quelle que soit la stimulation extérieure, ils mettent en jeu les mêmes mécanismes sensoriels (Furtuna, 2011).

Lorsque les capteurs sensoriels rentrent en contact avec un stimulus, les informations engendrées sont amplifiées, puis transmises au système nerveux central sous forme de signaux électriques après avoir été progressivement filtrées, réduites et stabilisées. Ces informations électriques sont caractérisées d'une part par une masse globale d'activité, correspondant à l'intensité, et d'autre part par une répartition spatiale de cette activité, correspondant à la qualité (MacLeod, 1998).

### 4. La méthodologie de l'analyse sensorielle

L'évaluation sensorielle d'un produit permet, soit la mesure de ses caractéristiques sensorielles, soit la mesure du plaisir qu'il procure au consommateur. Ces deux approches



sont souvent complémentaires, mais doivent être soigneusement distingués car les groupes de sujets interrogés sont différents (Lefebvre et Bassereau, 2003).

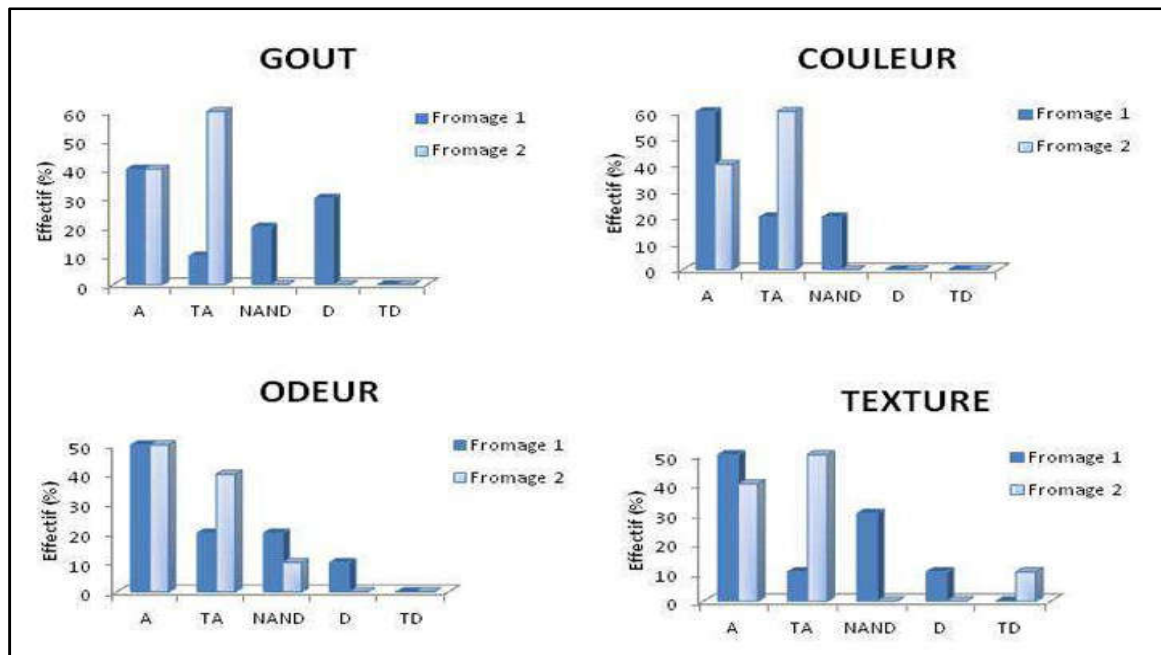
En général, l'analyse sensorielle traditionnelle peut être divisée en deux: analytique et affective, les tests analytiques qui comprennent des évaluations discriminatoires et descriptives, tentent de décrire et différencier les produits. D'autre part, les tests affectifs tentent d'évaluer l'acceptation du produit et sont divisés en tests de préférence et tests hédoniques (Ruiz-Capillas et al., 2021). Le choix de ces méthodes est basé sur l'objectif du test et la nature et le nombre des produits analysés (Herbet, 2018).

### 5. Exemples d'analyse sensorielle

#### Exemple 1

Les caractéristiques organoleptiques (goût, couleur, odeur et texture) des échantillons de fromages produits à partir du lait de deux races de vache ont été évalués par un jury de 30 consommateurs selon l'échelle d'appréciation décroissante suivante: (très agréable)- (agréable)- (ni-agréable/ni-désagréable)- (désagréable)- (très désagréable) (Richmy et al., 2016).

Selon les résultats de Richmy et al., (2016) (Figure 8), les fromages Pulh produit étaient globalement acceptés. Toutefois, le fromage produit avec le lait de la race Borgou à été le plus apprécié par les dégustateurs. En effet, 60% des dégustateurs ont apprécié très agréablement le goût et la couleur du fromage issu du lait de la race Girolando pour les deux paramètres. 50% des dégustateurs ont apprécié très agréablement et agréablement respectivement la texture et l'odeur du fromage issu du lait de la race Borgou contre 30 et 20% des consommateurs qui n'ont pas apprécié respectivement la texture la couleur du fromage produit à partir du lait de la race Girolando.

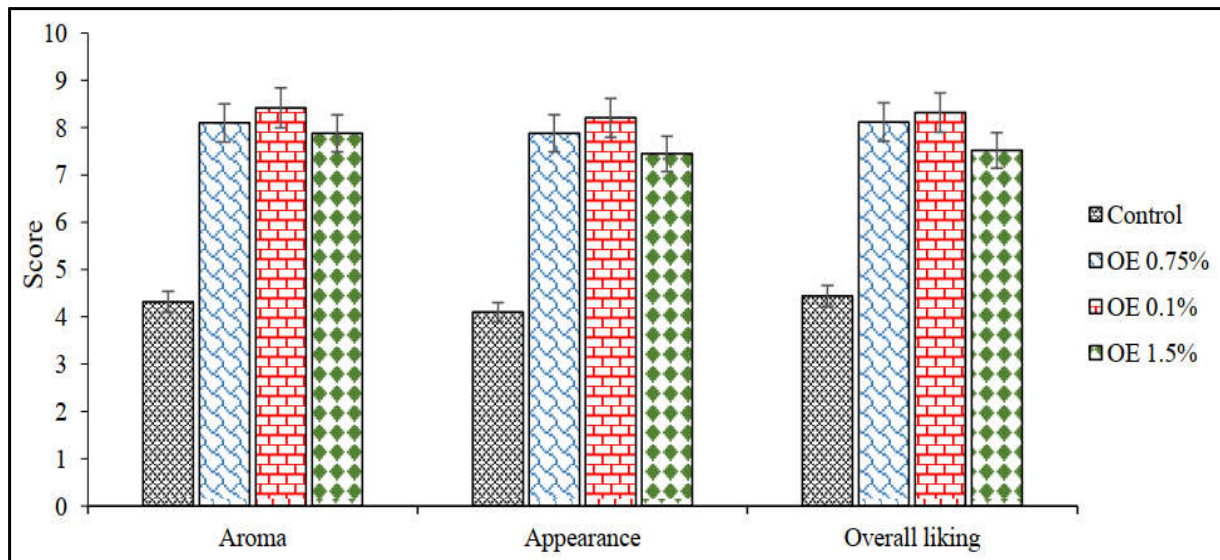


**Figure 8 :** Appréciations des caractéristiques organoleptiques du fromage peuhl produit à partir du lait des vaches de races Girolando (fromage 1) et Borgou (fromage 2).

### Exemple 2

Les effets sensoriels de l'ajout d'extrait d'origan sur l'échantillon de yogourt non traité, neuf panélistes (vieilli 22-30 ans; quatre femmes et cinq hommes) a examiné les produits sur la base d'un neuf points score hédonique (Extrêmement Je n'aime pas = 1, ni l'un ni l'autre ni Je n'aime pas = 5, et Extrêmement comme = 9) pour l'acceptabilité globale des échantillons de yogourt.

Les résultats de l'évaluation sensorielle des échantillons de yogourt qui ont été conservés au réfrigérateur la température n'a indiqué aucune différence significative entre l'apparence et l'arôme des échantillons traités avec l'extrait d'origan à la concentration de 0,75%, 1% et 1,5% ( $P > 0,05$ ) (Figure 9). Cependant, des différences significatives étaient observées dans les scores hédoniques de l'arôme et l'aspect des échantillons contenant l'extrait d'origan aux concentrations de 0,75%, 1% et 1,5% par rapport au groupe témoin ( $P < 0,05$ ) (Shahbazi et Shavisi, 2019).

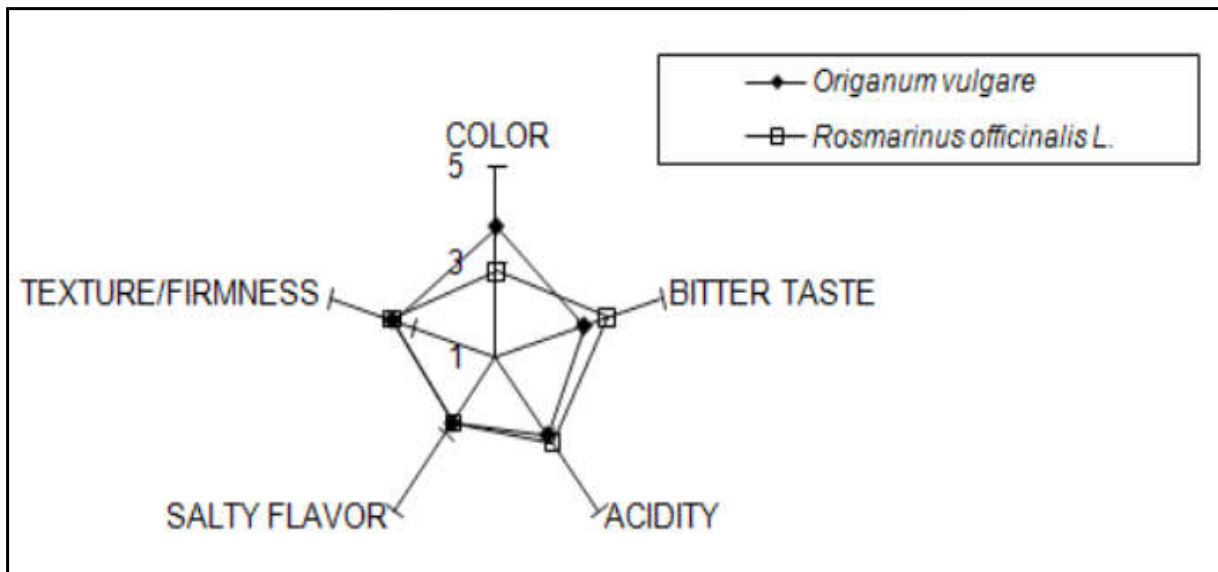


**Figure 9** : Attributs sensoriels (arôme, apparence et goût général) des échantillons de yogourt pendant le stockage à une température de  $4 \pm 1$  ° C pendant 30 jours (Shahbazi et Shavisi , 2019).

### Exemple 3

Des extraits de romarin et de l'origan ont été ajoutés séparément à un fromage frais à tartiner et le produit a été évalué pour ses qualités sensorielles via un test d'acceptation et une échelle idéale utilisant 50 dégustateurs. L'échelle idéale a été utilisée pour évaluer les paramètres: couleur, goût amer, acidité, goût salé et texture (Figure 10). Les échantillons codés aléatoirement avec des nombres à trois chiffres ont été servis sous une forme monadique dans des cabines individuelles à 25°C.

Dans la qualité sensorielle globale l'échantillon avec l'extrait d'origan était le plus accepté atteignant un indice d'acceptation de 91,1% et l'échantillon contenant de l'extrait de romarin a montré un taux d'acceptation de 76,0% (Santos et al., 2012).



**Figure 10 :** Comparaison des attributs couleur, goût amer, acidité, saveur salée et texture/fermeté, dans les deux échantillons de fromage frais à tartiner, évalué par l'échelle idéale (5 = beaucoup plus que l'idéal ; 3 = idéal ; 1 = beaucoup moins que l'idéal).

***Chapitre 4 :***  
***Additifs Alimentaires***

## **Chapitre 4. Additifs Alimentaires**

### **1. Généralités**

Les additifs alimentaires sont toujours l'un des sujets les plus controversés dans le monde moderne et peut représenter une préoccupation pour le consommateur. Cependant, des additifs alimentaires ont été utilisés depuis des siècles, étant associé aux technologies de production alimentaire les plus récentes. Ces techniques, utilisées aujourd'hui à l'aide d'une technologie de pointe, étaient basées sur la corrélation entre la teneur en eau des aliments et les durabilités corrélées. C'est connu que les Égyptiens et les Romains utilisaient des colorants, des arômes, des épices et du sel pour faire plus nourriture savoureuse et pour prolonger la durée de conservation. La préparation, la nourriture et le stockage sont des objectifs partagés par la cuisine traditionnelle et l'industrie. Au cours des 50 dernières années, les développements de la science et de la technologie alimentaires et l'évolution concomitante des demandes des consommateurs ont conduit à une augmentation substantielle de l'utilisation des additifs alimentaires, associé aux nouvelles technologies industrielles (Légana et al., 2017).

### **2. Additifs alimentaires naturels**

Depuis quelques décennies, les additifs alimentaires naturels (Figure 11) suscitent de plus en plus d'intérêt à la fois du public et des fabricants de produits alimentaires. Généralement, le public choisi un aliment sans additifs, mais s'ils ne sont pas disponibles, le même consommateur choisira, si possible, un aliment contenant des additifs naturels plutôt que des additifs synthétiques. La nourriture est soumise à de nombreuses conditions, telles que les changements de température et l'exposition à l'air et aux microorganismes, qui peuvent changer sa composition originale. Les additifs naturels aident à garantir que nos aliments restent sains à manger et ne se détériore pas ou ne disparaît pas trop rapidement. Les additifs naturels sont des composés, des groupes de composés ou des huiles essentielles de plantes déjà utilisées empiriquement par la population pour le goût fins (Baines et Seal, 20126; Carochó et al., 2014).

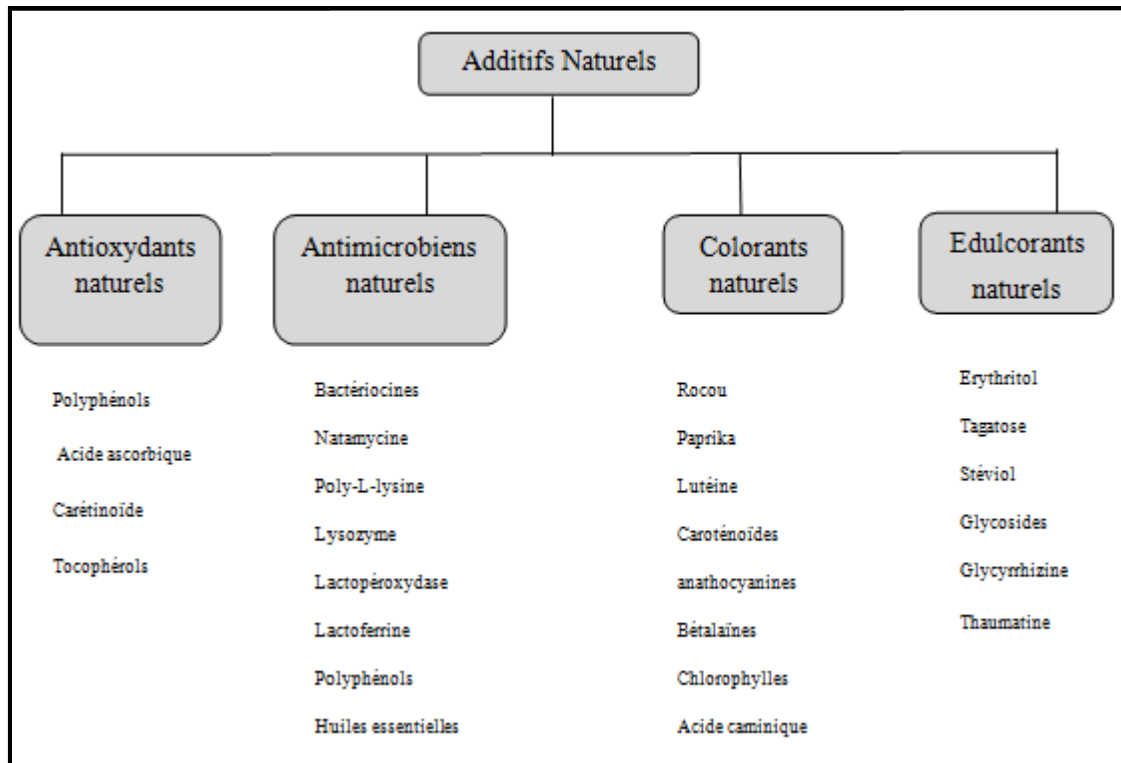


Figure 11 : Les types d'additifs alimentaires naturels (Carocho et al., 2015).

### 3. Types d'additifs naturels

Les additifs naturels les plus recherchés sont les antioxydants, les antimicrobiens, les colorants et les édulcorants.

#### 3.1. Antioxydants naturels

Les antioxydants sont principalement utilisés dans les aliments pour éviter les mauvais goûts par oxydation des graisses, stoppant ainsi leur peroxydation dans les phases d'initiation ou de propagation. Il y a 5 types d'antioxydants; les antioxydants primaires connus sous le nom de piègeurs de radicaux ou d'antioxydants briseurs de chaîne ; chélateurs, qui se lient aux métaux et les empêchent de s'initierformation de radicaux; les extincteurs, qui désactivent les espèces oxydantes à haute énergie ; oxygène les charognards, qui retirent l'oxygène des systèmes, évitant leur déstabilisation ; et enfin les régénérateurs d'antioxydants, qui régénèrent d'autres antioxydants lorsque ceux-ci se radicaliser. (Baines and Seal, 2012). Ils sont présents dans les plantes, les algues et les champignons sont d'excellents additifs naturels à ajouter aux aliments pour leurs capacités de don d'ions ou d'hydrogène, de chélation des métaux et de rupture de chaîne. Entre

autres, les molécules naturelles les plus antioxydantes sont les vitamines, les polyphénols et les caroténoïdes (Carocho et al., 2014).

Les principaux aliments où les antioxydants sont utilisés dans les viandes, les huiles, les aliments frits, les vinaigrettes, les produits laitiers, produits de boulangerie et snacks extrudés (Baines et Seal, 2012).

### **3.2. Antimicrobiens naturels**

Les antimicrobiens naturels qui peuvent être ajoutés aux aliments sont principalement des terpènes, des peptides, des polysaccharides et des composés phénoliques, parmi d'autres avec moins d'expression. Les antimicrobiens naturels sont également un sujet très chaud pour la transformation des aliments ; ils garantissent que la nourriture est exempte de micro-organismes et peut être consommée sans danger. Il existe des antimicrobiens naturels de trois sources, dérivées de micro-organismes, d'animaux et de plantes. (Carocho et al., 2014).

### **3.3. Colorants naturels**

Les colorants sont utilisés dans les aliments pour les rendre plus attrayants et appétissants, qui sont facteurs importants lors du choix des aliments sur les étagères. Les colorants sont utilisés pour améliorer les couleurs existantes qui peuvent être perdues soit pendant la fabrication, soit au cours de la durée de conservation, voire attribuez-lui de nouveaux. Les colorants alimentaires peuvent être classés en trois groupes; nourriture naturelle les colorants, qui font référence à ceux qui sont synthétisés naturellement; colorants identiques à la nature, qui bien que synthétisé dans les industries, mime les naturels et enfin les colorants artificiels / synthétiques (Msagati, 2013).

### **3.4. Édulcorants naturels**

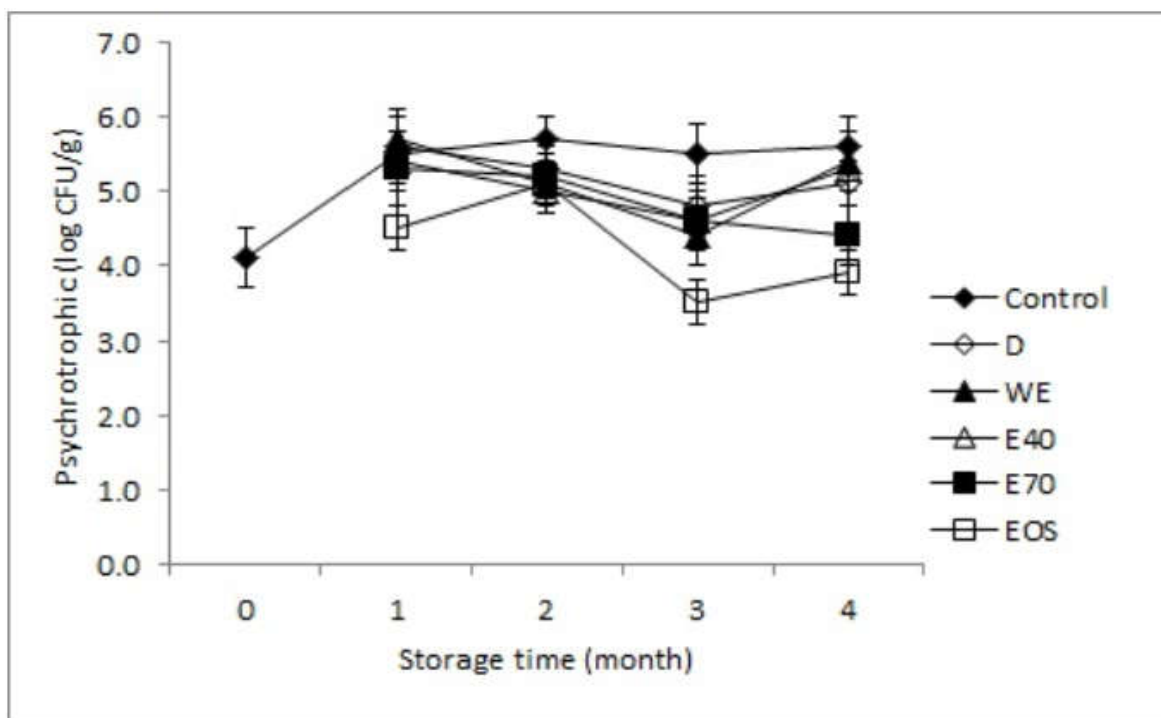
Les édulcorants sont utilisés depuis des siècles pour rendre les aliments plus appétissants et attrayants aux consommateurs. Les édulcorants ont été introduits pour la première fois en raison de la contribution calorique élevée du sucre à l'alimentation, favorisant l'obésité dans la population, qui prévalait assez chez les nourrissons et enfants. Ainsi, sur les dix-huit cents un édulcorant hypocalorique est devenu disponible, saccharine. Puis, avec le succès de cet édulcorant, d'autres ont suivi, à savoir les cyclamates, l'aspartame et l'acésulfame K, qui sont les plus répandus. Les édulcorants ont également été cibles de



scandales et de controverses au fil des ans, avec des allégations de cancérogénéité, malformations du fœtus, toxicité pour le foie et la vessie, entre autres dangers. (Carocho et al., 2014).

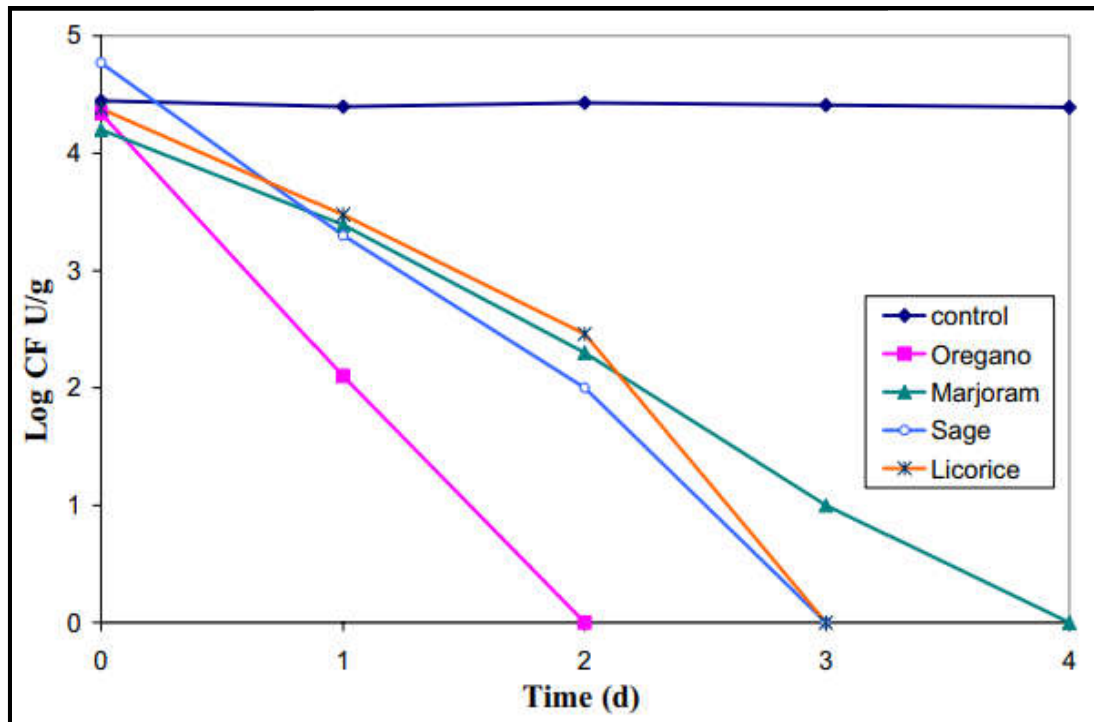
#### 4. Exemples d'utilisation des additifs naturels dans les aliments

Une étude réalisée par Hać-szymańczuk et al. (2017) en Pologne sur l'effet des préparations de romarin sur la qualité microbienne et la stabilité à l'oxydation de la viande de volaille désossée et conservée à -18 °C pendant 4 mois a été menée (Figure 12). Ils ont utilisé de la viande de volaille provenant de quatre lots de production dans lesquels le romarin a été ajouté dans la forme d'épice séchée (2,0%), extrait d'eau (2,0%), extrait éthanolique (40 et 70% (v / v) et huile essentielle (0,2%). l'échantillon témoin ne contenait pas de romarin ajouté.



**Figure 12 :** Effet de l'addition de préparations de romarin sur le nombre de bactéries psychrotrophes dans la viande (Hać-Szymańczuk et al., 2017).

Al-Turki et al. (2007), ont étudié l'effet de l'extrait aqueux de l'origan, marjolaine, sauga sur l'inhibition de *E. coli* et *B. subtilis*. Tous les extraits aqueux à base de plantes démontrent un effet inhibiteur contre les deux organismes. L'extrait d'origan possède l'activité antibactérienne la plus élevée contre les bactéries testées par rapport aux autres extraits.



**Figure 13** : L'effet des extraits d'origan, de marjolaine, de sauge et de réglisse à une concentration de 5% (v/w) sur la survie de *B. subtilis* en milieu reconstitué lait (T.S; 8,5%) à 7 °C (Al-Turki et al, 2007).

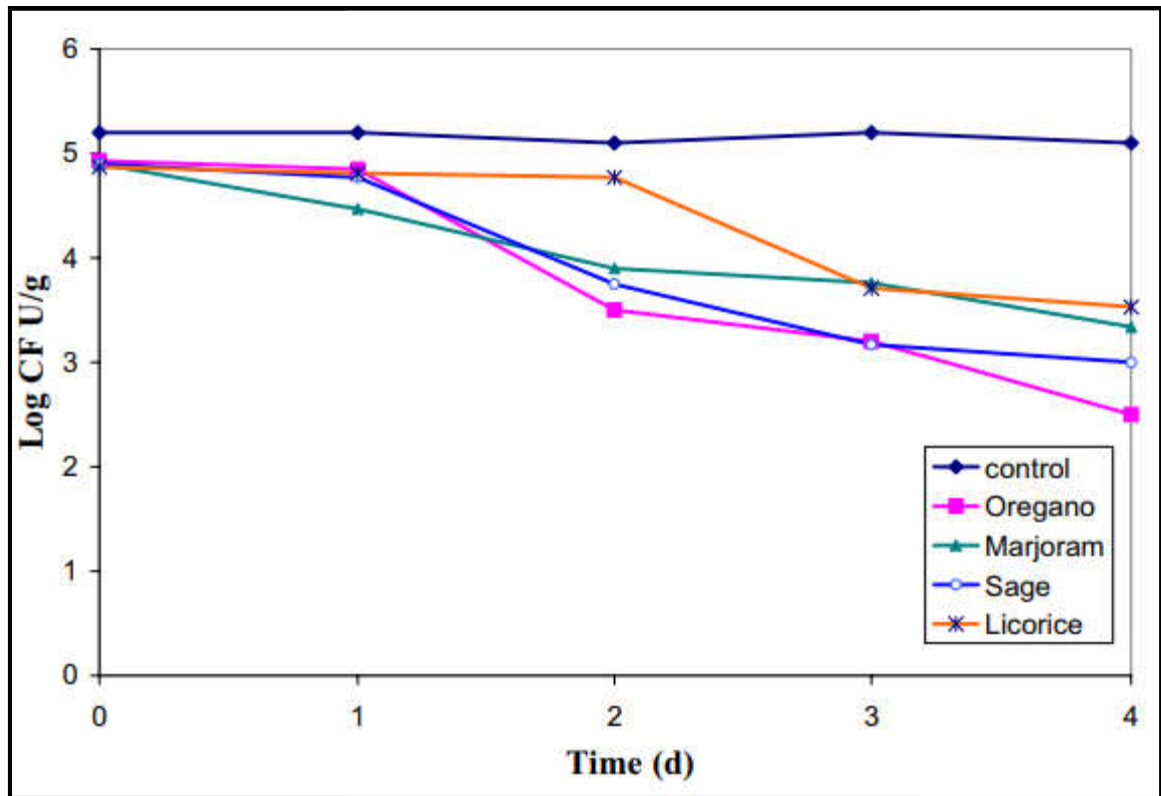


Figure 14 : L'effet des extraits d'origan, de marjolaine, de sauge et de réglisse à une concentration de 5 % (v/w) sur la survie d'E. coli dans le lait reconstitué (TS ; 8,5 %) à 7 °C ( Al-Turki et al, 2007).

***Partie II: Recherche  
Expérimentale***

# ***Matériel et Méthodes***

## 1. Matériel et Méthodes

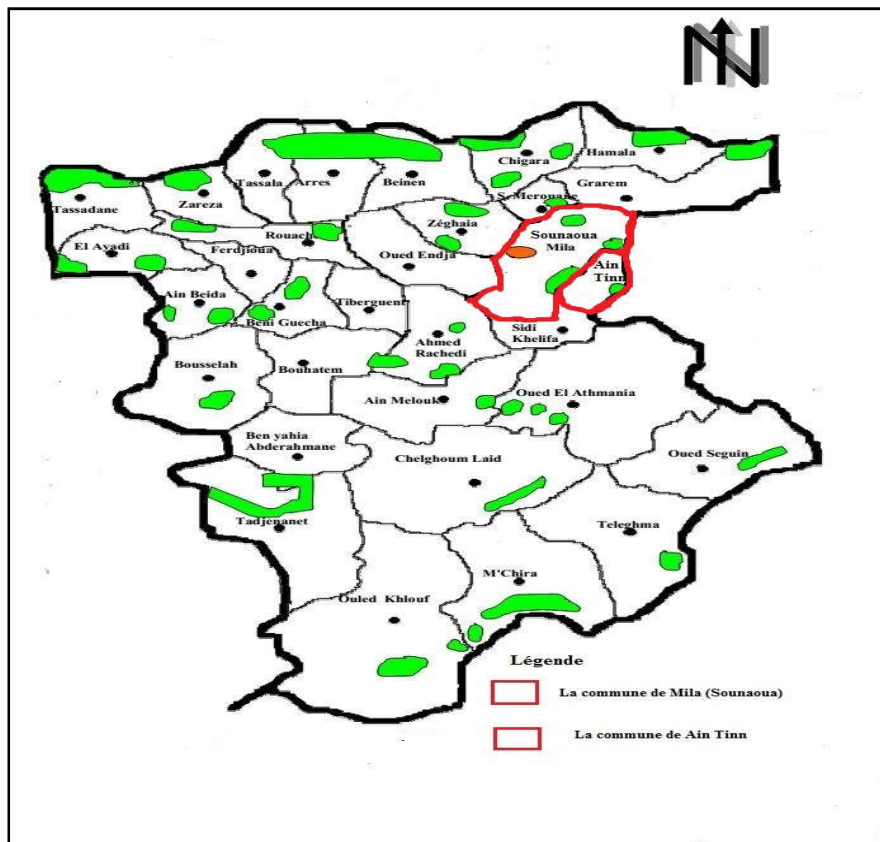
L'ensemble des manipulations expérimentales a été réalisé dans les laboratoires du Département des Sciences de la Nature et de la Vie, le laboratoire de recherche des Sciences Naturelles et des Matériaux du Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf de Mila.

### 1.1. Origine géographique et période de récolte

Avec une superficie de 3.478 km<sup>2</sup> (36°27'N/6°15'E) la wilaya de Mila est située dans le Nord- Est Algérien. Elle est limitée au Nord par les wilayas de Jijel et Skikda, à l'Est par la wilaya de Constantine, à l'Ouest par la wilaya de Sétif et au Sud par la wilaya de Batna et Oum El Bouaghi (A.N.D.I, 2013).

### 1.2. Choix des plantes

Les feuilles de romarin et origan ont été récoltées durant la période de Février - Avril 2018 dans la région de Sennaoua (36° 26 ' 19" N ; 6° 16' 08" E) et Ain Tine (36° 24' 53" N ; 6° 17' 36" E) dans la région de Mila (Figure 15).

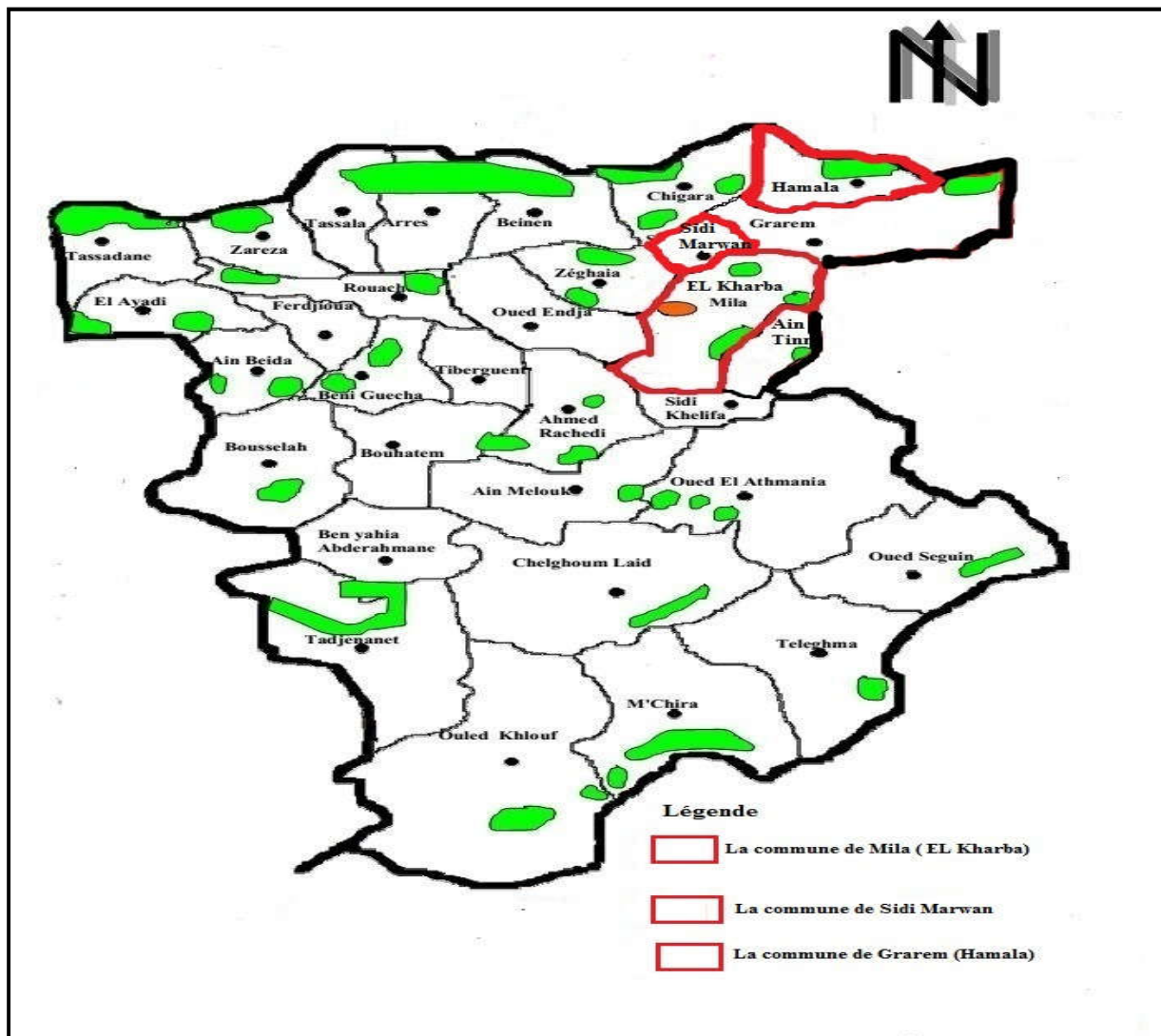


**Figure 15 :** Les sites de récolte des plantes dans la région de Mila. (Service du cadastre de la wilaya de Mila, modifiée, 2021).

Après la récolte, les feuilles ont été laissées sécher à l'ombre pendant deux semaines sur du papier propre à l'air libre, non exposées à l'humidité, sans appliquer un traitement thermique pour minimiser la perte des composants actifs. Les feuilles séchées ont été broyées à l'aide d'un moulin à café électrique pour l'obtention d'une poudre fine.

### 1.3. Echantillonnage du lait cru

Des échantillons de lait cru ont été collectés dans trois fermes laitières situées dans trois sites de la région de Mila (Figure 16).



**Figure 16 :** Sites d'échantillonnage du lait cru de la région de Mila. (Service du cadastre de la wilaya de Mila, modifiée, 2021).

### 1.3.1. Description des sites d'échantillonnage de lait cru

Durant l'échantillonnage, dans chaque ferme les extrémités des trayons ont été nettoyées en essuyant avec des serviettes en papier sec, les 3 premiers jets ont été éliminés et 600 mL de lait cru ont été prélevés des quatre pis en déplaçant le flacon stérile ombré successivement. Finalement, le flacon est transféré directement à froid au laboratoire à une température de 4°C. Les volumes des laits récoltés des trois fermes ont été rassemblés avant les analyses en un seul mélange uni.

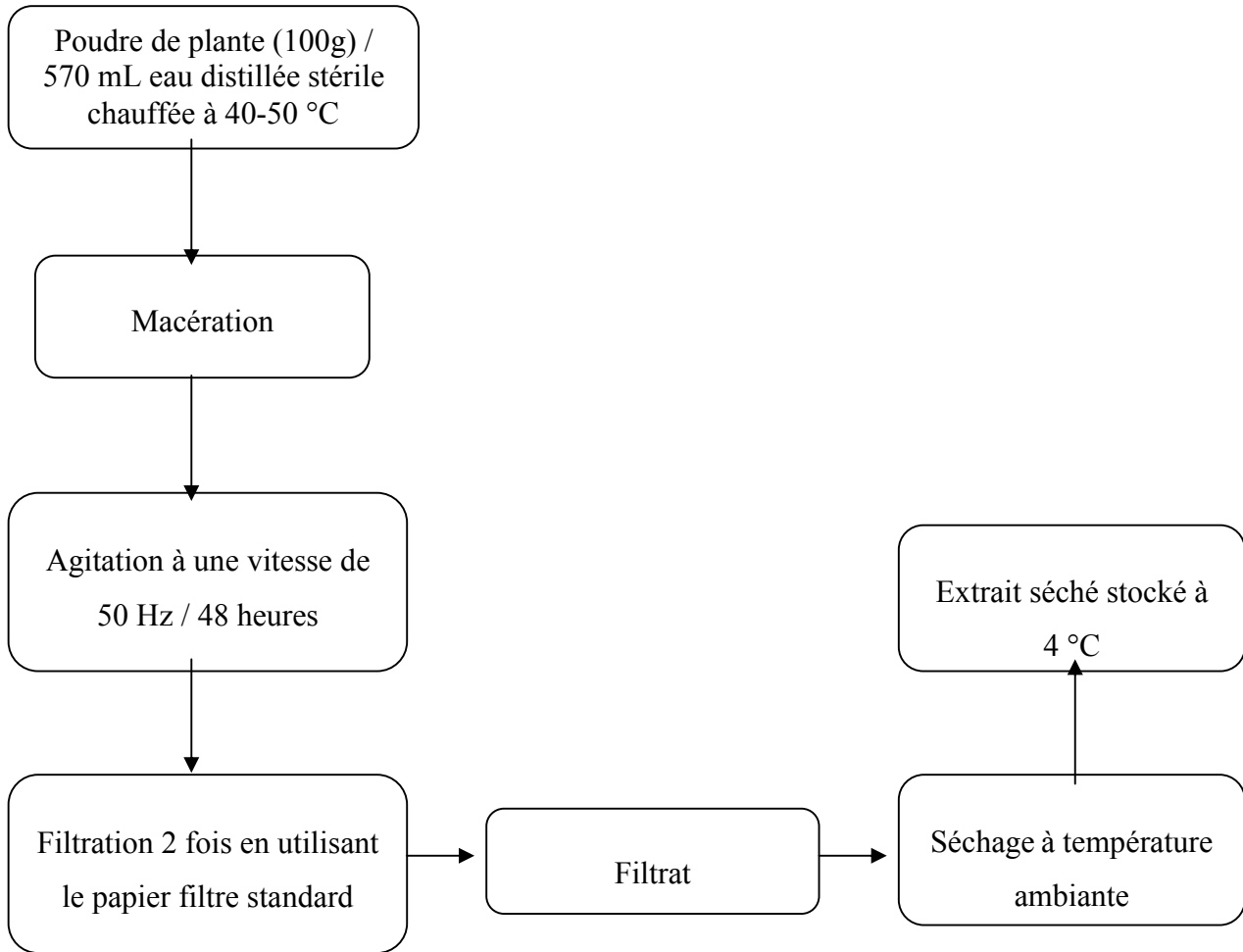


Figure 17 : Echantillonnage du lait cru dans les fermes laitières.

### 1.4. Préparation de l'extrait aqueux

Pour préparer les extraits aqueux des deux plantes, 2 solutions mères ont été préparées séparément par dissolution de 100 g de chaque poudre sèche de romarin et origan dans l'eau distillée stérile (570 mL) chauffé à 40-50 °C. Une agitation modérée continue d'une vitesse de 50 Hz pendant 48 heures a été appliquée (macération sous agitation). L'extrait obtenue a été filtré 2 fois en utilisant le papier filtre standard. L'extrait final a été stocké dans le réfrigérateur à 4 °C jusqu'à utilisation (Figure 18).





**Figure 18** : Protocole de la préparation de l'extrait aqueux des plantes.

#### 1.4.1. Calcul des volumes de l'extrait aqueux ajouté au lait

Les concentrations initiales des extraits aqueux ajoutés dans les laits et la méthode de calcul des volumes des extraits ajoutés aux laits à partir de la solution mère, sont montrés dans le Tableau 6 :

**Tableau 6 :** Les concentrations initiales des extraits aqueux.

<b>Romarin</b>	<b>Origan</b>
Concentration initiale (100%) : 1 mg mL <sup>-1</sup>	Concentration initiale (100%) : 5 mg mL <sup>-1</sup>
$C_1^* \times V_1 = C_2^{**} \times V_2$ 1 g / 50 mL $\times$ V <sub>1</sub> = 1mg / mL $\times$ 100mL	$C_1^* \times V_1 = C_2^{**} \times V_2$ 5g / 50 mL $\times$ V <sub>1</sub> = 5 mg / mL $\times$ 100 mL

\* Concentration de la solution mère de l'extrait aqueux.

\*\* Concentration de EA recherchée dans le lait.

Les valeurs des volumes ajoutés au lait sont présentées dans le Tableau 7

**Tableau 7:** Concentrations, pourcentages et volumes des EA ajoutés au lait.

<b>Plantes</b>	<b>Romarin</b>				<b>Origan</b>			
Pourcentage de supplémentation (%)	100	75	50	25	100	75	50	25
Volume ajouté au lait (mL)	5	3.75	2.5	1.25	5	3.75	2.5	1.25
Concentration d'EA dans le lait (mg mL <sup>-1</sup> )	1	0.75	0.5	0.25	5	3.75	2.5	1.25

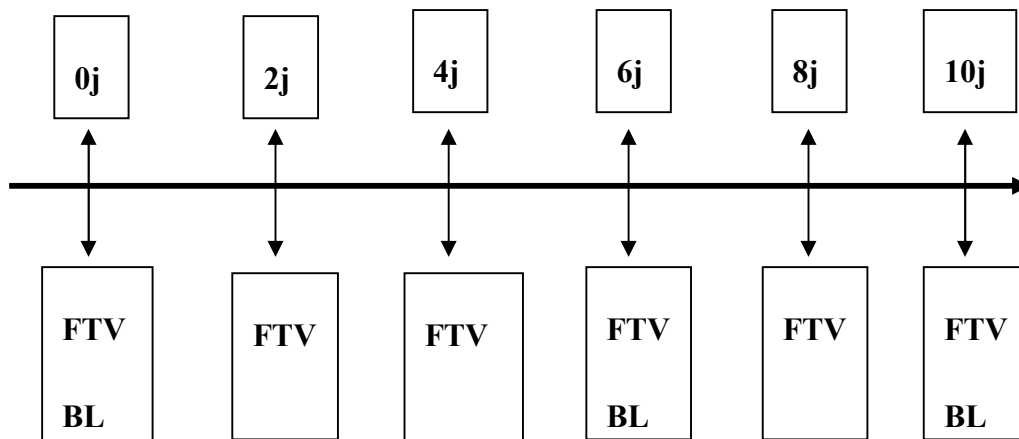
### 1.4.2. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement de l'extrait sec a été déterminé par la loi suivante :

$$R = \frac{\text{masse de l'extrait après évaporation (g)}}{\text{masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction (g)}}$$

### 1.5. Culture bactérienne

Les échantillons de lait cru ont été conservés à 4 °C pour favoriser la croissance de la flore psychrotrophe dans le microbiote et différentes concentrations d'extraits aqueux de plantes ont été ajoutées initialement (jour 0) aux échantillons de lait. L'évolution de la croissance microbienne a été contrôlée à intervalles de temps réguliers : 0, 2, 4, 6, 8, 10 jours, tandis que les bactéries lactiques ont été suivies durant les jours 0, 6, 10 jours (Figure 19).



**J** : Jours ; **FTV** : Flore totale viable ; **BL** : Bactéries lactiques.

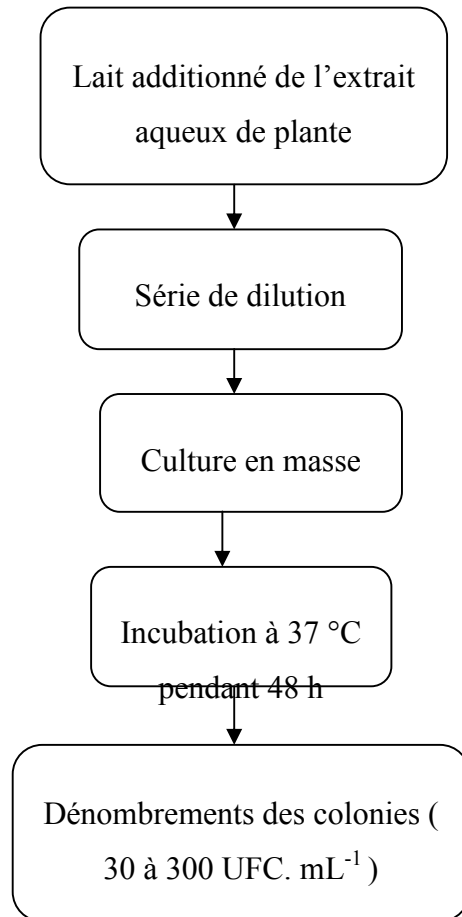
**Figure 19** : Suivi des cinétiques de croissance microbienne durant la réfrigération du lait additionné des EA de romarin et origan.

Pour suivre la cinétique de développement de la flore totale viable pour chaque échantillon de lait, des dilutions en série ( $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ ) ont été préparées et 1 mL de chaque dilution a étéensemencé en masse dans la gélose nutritive. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C pendant 48 h, celles ayant un nombre de colonies de 30 à 300 ont été prises en compte pour le dénombrement (Figure 20).

Pour contrôler la viabilité des bactéries lactiques lors de l'addition des EA au lait, à partir des dilutions  $10^{-1}$ , ensemencer en masse 1 mL dans la gélose MRS, après refroidissement

couler une autre couche de gélose sur la première solidifiée, les cultures ont été incubées pendant 48 h à 37 °C.

L'ensemble des expériences ont été conduites en trois répétitions par échantillon de lait à chaque temps de prélèvement, et les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes.



**Figure 20** : Mode opératoire des cultures bactériennes : la flore totale viable.

## 1.6. Analyse sensorielle

### 1.6.1. Principe de la méthode

La méthode est basée sur la segmentation de l'analyse selon les quatre compartiments principaux du lait ajouté à l'extrait des plantes : couleur, odeur, saveur et texture. Une liste de 50 descripteurs a permis à tous les dégustateurs d'utiliser les mêmes termes pour caractériser une même sensation (Richmy et al., 2016). Chaque descripteur est quantifié sur une échelle de notation structurée, l'analyse sensorielle utilise tous les sens sauf l'ouïe (Diane et al., 2010).

**1.6.2. Calcul des volumes de l'extrait aqueux ajouté au lait pour l'analyse sensorielle**

Les concentrations initiales des extraits aqueux ajoutés dans les laits et la méthode de calcul des volumes des extraits ajoutés aux laits à partir de la solution mère, sont montrés dans le Tableau 8 :

**Tableau 8 :** Les concentrations initiales des extraits aqueux pour l'analyse sensorielle.

<b>Romarin</b>	<b>Origan</b>
Concentration initiale (100%) : 1 mg mL <sup>-1</sup>	Concentration initiale (100%) : 5 mg mL <sup>-1</sup>
$2g / 100mL \times V1 = 1mg / mL \times 700 mL$	$5g / 100mL \times V1 = 5mg / mL \times 700mL$

**Tableau 9 :** Concentrations, pourcentages et volumes des EA ajoutés au lait dans les tests de l'analyse sensorielle.

<b>Plantes</b>	<b>Romarin</b>		<b>Origan</b>	
Concentration d'EA dans le lait (mg mL <sup>-1</sup> )	1	0,75	5	1,25
Volume ajouté au lait (mL) pour l'analyse sensorielle	35	26,25	70	17,5

### **1.6.3. Mode opératoire de l'analyse sensorielle**

Les tests de l'analyse sensorielle ont été conduits dans une salle vide sur des tables isolées les unes des autres. Le choix du dégustateur est aléatoire, car nous avons réunis étudiants, professeurs et techniciens de laboratoire. Devant le dégustateur trois gobelets en plastique contenant 20 mL de lait ajouté de l'extrait de plante, le mélange a été préparé au préalable et mis directement au réfrigérateur. Chaque tasse contient respectivement des concentrations des EA :  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$  pour le romarin ; et  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$  pour l'origan, en tenant compte de l'analyse d'une tasse avec du lait de vache sans ajout considérée comme témoin.

On met aussi devant le dégustateur de l'eau potable à boire pour que le goût précédent ne reste pas et ne se mélange avec celui d'après. Aussi, un formulaire (préalablement préparé) est rempli par le connaisseur selon les couleurs, les odeurs, les saveurs et les goûts.

Pour la plante de romarin, le choix des concentrations de  $0,75$  et  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  est guidé par le fait qu'elles provoquent une prolongation du temps de génération et une diminution du niveau de croissance maximale. Les mêmes raisons pour le choix des concentrations de  $1,25$  et  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  pour la plante origan.

### **1.7. Analyses statistiques**

Les valeurs prédites des paramètres de croissance microbienne, à savoir le taux de croissance maximal ( $\mu_{\text{max}}$ ), la durée de la phase de latence ( $\lambda$ ) et la charge cellulaire maximale atteinte ( $X_{\text{max}}$ ) ont été obtenus à l'aide du modèle de Baranyi et Roberts (1995). Le modèle relève de la microbiologie prédictive, il utilise des équations mathématiques pour prédire la croissance microbienne. Le modèle de Baranyi fournit un meilleur ajustement que l'équation de Gompertz modifiée. De plus, le modèle de Gompertz modifié manque d'un mécanisme base, et le modèle de Baranyi fournit une interprétation biologique pour la phase de latence (Baranyi et Roberts, 1995).

## ***Résultats et Discussion***

## 2. Résultats et Discussion


Il est à rappeler que l'objectif de cette étude est le contrôle des cinétiques du développement microbien de la flore totale viable du lait cru additionné des extraits aqueux de *Rosmarinus* et *Origanum* durant la réfrigération à 4 °C pendant 10 jours et l'évaluation de la qualité sensorielle des laits supplémentés.

### 2.1. Evolution de la flore totale viable durant la réfrigération

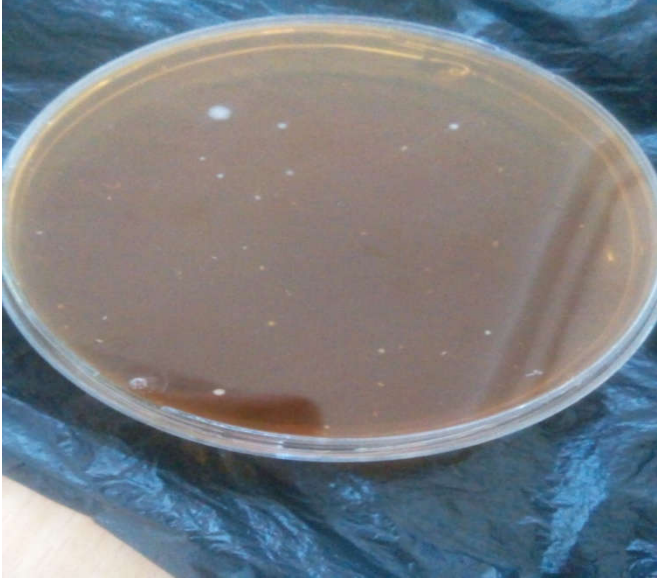

#### 2.1.1. Aspect cultural de la croissance microbienne

Une grande diversité phénotypique culturale a été obtenue, faite de petites colonies, d'autres moyennes et grandes, de différentes couleurs (blanches, jaunes, etc.), la plupart des colonies sont rondes avec un contour régulier (Tableau 10).

**Tableau 10 :** Description de l'aspect macroscopique des colonies bactériennes se développant sur les milieux gélose nutritive et M.R.S issues du le lait cru additionné d'extraits de plantes.

<i>Rosmarinus</i>		<p><b>Aspect macroscopique des colonies sur gélose nutritive.</b> Les colonies sont de tailles différentes, petites (environ 1 mm) et grandes (1 à 3 mm). La plupart des colonies apparaissent blanches et rondes à contour régulier (Photo réalisée au Département de Biologie à l'Université de Mila).</p>
-------------------	--	--



		<p><b>Aspect macroscopique des colonies sur M.R.S.</b> Les colonies sont de formes rondes, grandes ou petites de couleur blanchâtres.</p> <p>(Photo réalisée au Département de Biologie à l'Université de Mila).</p>
<p><i>Origanum</i></p>		<p><b>Aspect macroscopique des colonies sur gélose nutritive.</b> Les colonies sont de tailles différentes, petites (environ 1mm) et grandes (1 à 3 mm).</p> <p>La plupart des colonies apparaissent blanches et rondes à contour régulier (Photo réalisée au Département de Biologie à l'Université de Mila).</p>

		<p><b>Aspect macroscopique des colonies sur M.R.S.</b> Les colonies sont de formes rondes, grandes ou petites de couleur blanchâtres.</p> <p>(Photo réalisée au Département de Biologie à l'Université de Mila).</p>
--	--	--

### 2.1.2. Cinétiques de la croissance microbienne

Les valeurs de la croissance microbienne enregistrées dans le lait réfrigéré additionné de différentes concentrations d'extraits aqueux de *Rosmarinus* et *Origanum* sont présentées dans le Tableau 11.

**Tableau 11 :** Les valeurs de la croissance microbienne du lait cru additionné de différentes concentrations d'extrait aqueux de *Rosmarinus* et *Origanum* durant 10 jours de réfrigération à 4 °C.

	<b>Croissance microbienne (Log UFC mL<sup>-1</sup>)</b>				
<b>Jours</b>	<b>Concentrations de l'extrait aqueux du Romarin (mg mL<sup>-1</sup>)</b>				
	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0.75</b>	<b>0.5</b>	<b>0.25</b>
<b>0</b>	3.54	3.93	3.95	3.88	3.79
<b>2</b>	5.28	5.06	5.23	5.43	5.50
<b>6</b>	6.70	6.45	6.32	6.39	6.85
<b>8</b>	6.63	6.37	6.38	7.18	6.88
<b>10</b>	7.17	6.75	6.77	6.91	7.13
	<b>Concentrations de l'extrait aqueux de l'origan (mg mL<sup>-1</sup>)</b>				
<b>Jours</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>3.75</b>	<b>2.5</b>	<b>1.25</b>
<b>0</b>	3.19	3.12	3.1	3.98	2.8
<b>2</b>	2.9	2.81	2.9	3.24	3.18
<b>6</b>	4.28	3.38	4.05	3.71	3.52
<b>8</b>	5.67	4.18	3.86	4.42	4.5
<b>10</b>	6.27	4.37	4.39	4.5	4.65

Les valeurs prédites des paramètres de croissance microbienne ( $X_{max}$ ,  $\mu_{max}$  et  $\lambda$ ) sont représentées dans Tableau 12.

**Tableau 12 :** Valeurs prédites des paramètres de croissance microbienne par le model Baranyi et Roberts (1995), obtenues en modélisant les données de comptage moyen des bactéries viables totales, durant le stockage réfrigéré du lait additionné de différentes concentrations d'extrait aqueux de *Rosmarinus* et *Origanum*.

	<b>Concentration Extrait Aqueux <sup>a</sup></b>	<b><math>X_{max}</math> <sup>b</sup></b>	<b><math>\mu_{max}</math> <sup>c</sup></b>	<b><math>\lambda</math> <sup>d</sup></b>
<b>Romarin</b>	<b>0</b>	7.00426 ± 0.171	0.782 ± 0.232	1.2 ± 0.804
	<b>1</b>	6.561 ± 0.19	0.838 ± 0.449	1.66 ± 0.928
	<b>0.75</b>	6.561 ± 0.19	0.838 ± 0.449	1.66 ± 0.928
	<b>0.5</b>	7.0411 ± 0.181	0.548 ± 0.174	0.224 ± 1.262
	<b>0.25</b>	7.00665 ± 0.125	0.825 ± 0.263	0.927 ± 0.785
<b>Origan</b>	<b>0</b>	6.297±0.0379	0.712±0.026	4.128±0.112
	<b>5</b>	4.526±0.205	0.254±0.0869	4.0252±1.705
	<b>3.75</b>	4.457±1.349	0.183±0.202	1.933±6.527
	<b>2.5</b>	4.457±1.349	0.183±0.202	1.933±6.527
	<b>1.25</b>	4.65±0.24	0.541±0.281	5.049 ±0.978

**a:** (mg mL<sup>-1</sup>).

**b:** (log UFC mL<sup>-1</sup>).

**c :** ( $\Delta$ log CFU mL<sup>-1</sup> \* jour).

**d :** (jours).

$X_{max}$  : niveau maximal de croissance (log UFC mL<sup>-1</sup>).

$\mu_{max}$  : Vitesse maximale de croissance ( $\Delta$  log UFC mL<sup>-1</sup>\*jour).

$\lambda$  : Temps de génération (Jours).

Les courbes de croissance microbienne du lait réfrigéré additionné de différentes concentrations d'extraits aqueux de *Rosmarinus* et d'*Origanum* sont présentées dans la Figure 21.

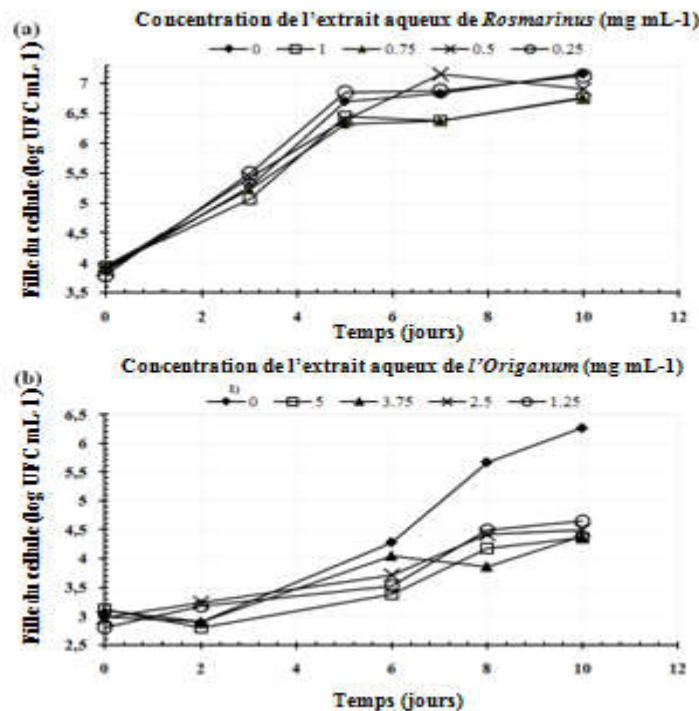


Figure 21 : Courbes de croissance du nombre total de bactéries viables dans le lait cru supplémenté avec différentes concentrations d'extraits aqueux de *Rosmarinus* (a), d'*Origanum* (b) et réfrigéré à 4 °C durant 10 jours.

Alors que les résultats des paramètres de croissance microbienne ( $X_{max}$ ,  $\mu_{max}$  et  $\lambda$ ) obtenus à l'aide du modèle de Baranyi et Roberts (1995), sont représentés dans la Figure 22 pour *Rosmarinus* et la Figure 23 pour l'*Origanum*.

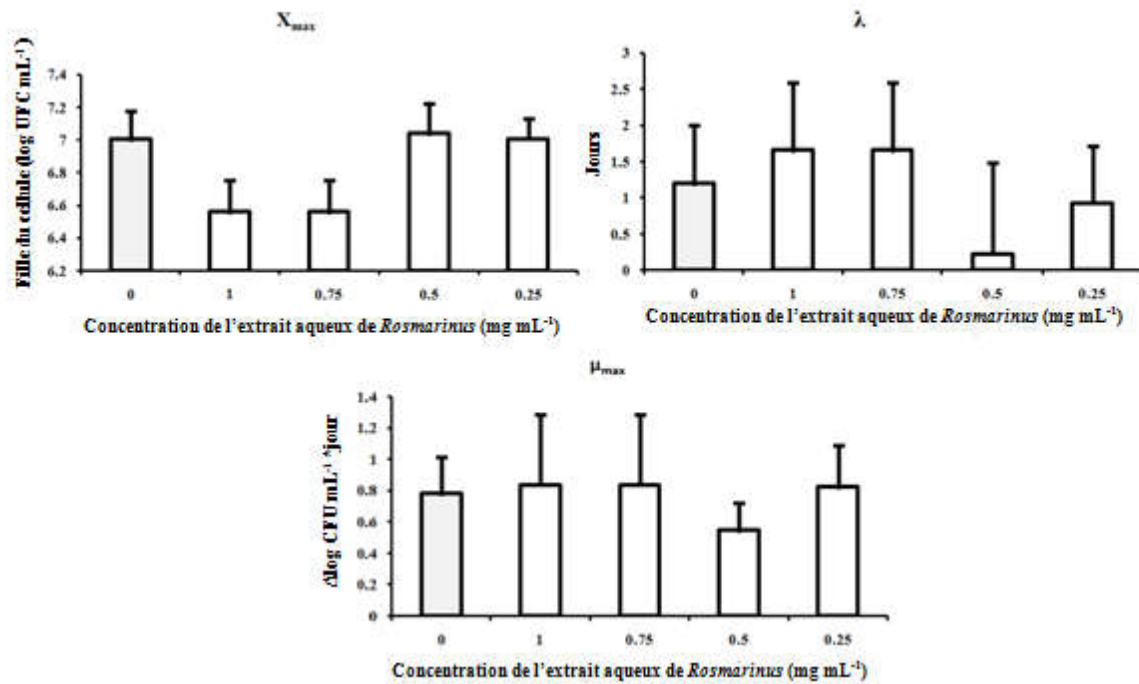
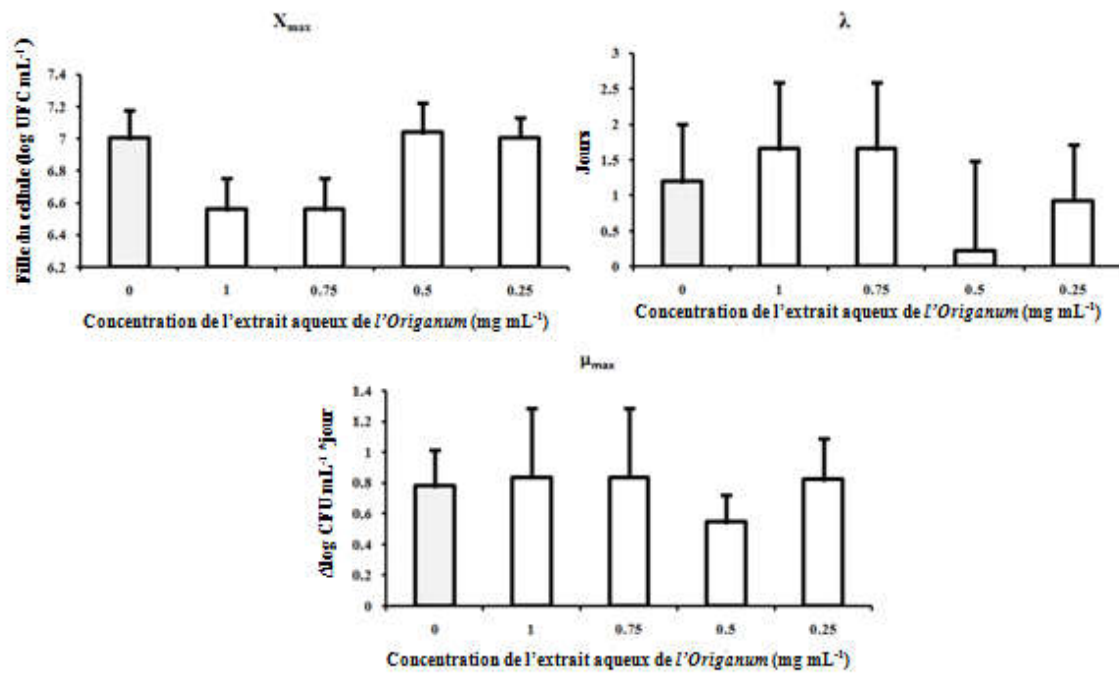


Figure 22 : Paramètres de croissance microbienne obtenus par Baranyi et Roberts Modèle de données de comptage moyen de bactéries viables totales dans du lait supplémenté avec différentes concentrations d'extrait aqueux de *Rosmarinus* et réfrigéré pendant 10 jours à 4 °C.



**Figure 23 :** Paramètres de croissance microbienne obtenus par le modèle Baranyi et Roberts des données de comptage moyen de bactéries viables totales dans le lait cru supplémenté avec différentes concentrations d'extrait aqueux d'*Origanum* et réfrigéré pendant 10 jours à 4 °C.

Les rendements d'extraction des extraits aqueux de *Rosmarinus* et d'*Origanum* ont donné respectivement 9 et 13 % ; la contamination microbienne initiale des laits a enregistré la valeur moyenne de 3,54 log UFC mL<sup>-1</sup> (3500 UFC mL<sup>-1</sup>) pour *Rosmarinus* et 3,19 log UFC. mL<sup>-1</sup> (1550 UFC mL<sup>-1</sup>) pour *Origanum*.

Pour la plante de romarin, les résultats ont montré un retard de croissance microbienne caractérisé par un allongement du temps de génération ( $\lambda$ ) de 11,04 h, allant de 1,2±0,80 jour (28,8 h) dans le lait sans supplémentation à 1,66±0,92 jour (39,84 h) dans les deux laits additionnés de 1 et 0,75 mg mL<sup>-1</sup> d'extrait aqueux de romarin. Cependant, les concentrations de 0,5 et 0,25 mg mL<sup>-1</sup> ont montré des temps de génération réduits de 0,22±1,26 et 0,92±0,78 jour respectivement. De plus, une diminution du niveau de croissance maximale (X<sub>max</sub>) a été remarquée à partir de 7,00±0,17 log UFC mL<sup>-1</sup> dans le lait non supplémenté jusqu'à 6,56±0,19 log UFC mL<sup>-1</sup> dans les deux laits additionnés de 1 et 0,75 mg mL<sup>-1</sup> d'extrait aqueux de romarin. Cependant, la croissance microbienne maximale dans les laits supplémentés avec 0,5 et 0,25 mg mL<sup>-1</sup> a atteint 7,04±0,18 et 7,00±0,12 log UFC mL<sup>-1</sup> respectivement, ces taux sont presque similaires à celui du lait non supplémenté. Une diminution du taux de croissance

maximum ( $\mu_{\max}$ ) a été observée à partir de  $0,78 \pm 0,23 \Delta \log \text{ UFC mL}^{-1} \cdot \text{jour}$  dans du lait non ajouté à  $0,55 \pm 0,17 \log \text{ UFC mL}^{-1} \cdot \text{jour}$  dans le lait supplémenté de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  d'extrait aqueux de *Rosmarinus*. Alors qu'une légère augmentation des taux de croissance maximale est observée dans les autres concentrations de *Rosmarinus* allant de  $0,82 \pm 0,26$  à  $0,84 \pm 0,44 \log \text{ UFC mL}^{-1} \cdot \text{jour}$ .

Pour la plante origan, les résultats ont montré aussi un retard de la croissance microbienne caractérisé par un allongement du temps de génération ( $\lambda$ ) avec 22,08 h, de  $4,12 \pm 0,11$  jours (98,88 h) dans le lait sans supplémentation à  $5,04 \pm 0,97$  jours (120,96 h) dans lait additionné de  $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$  d'extrait aqueux d'*Origanum*. Tandis que, la concentration  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  a donné un temps de génération de  $4,02 \pm 1,70$  (96,48 h) qui est presque similaire à celui du lait non ajouté. Cependant, les concentrations 3,75 et 2,5 ont enregistré un temps de génération réduit de  $1,93 \pm 6,52$  jours. Une diminution importante du niveau de croissance maximale ( $X_{\max}$ ) est observée pour l'ensemble des concentrations d'*Origanum*, enregistrant la valeur la plus faible de  $4,45 \pm 1,34 \log \text{ UFC mL}^{-1}$  aux concentrations 3,75 et 2,5  $\text{mg mL}^{-1}$  d'extrait aqueux, par rapport au lait sans supplémentation qui a enregistré un  $X_{\max}$  de  $6,29 \pm 0,03 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ . D'autre part, une diminution du taux de croissance maximal ( $\mu_{\max}$ ) a été observée dans la totalité des concentrations d'*Origanum*, enregistrant la valeur la plus faible de  $0,18 \pm 0,2 \Delta \log \text{ CFU mL}^{-1} \cdot \text{jour}$  aux concentrations 3,75 et 2,5  $\text{mg mL}^{-1}$  d'extrait aqueux, par rapport au lait sans addition qui a enregistré un  $\mu_{\max}$  plus élevé de  $0,71 \pm 0,02 \Delta \log \text{ UFC mL}^{-1} \cdot \text{jour}$ .

La charge microbienne initiale enregistrée a été inférieure à la limite d'hygiène pour les bactéries psychrotrophes dans le lait 4,69 ( $50\ 000 \text{ UFC mL}^{-1}$ ), cela reflète le bon niveau d'hygiène du troupeau et le respect des principes d'hygiène de traite et de stockage du lait (Cempírková, 2007; Cempírková et Mikulová, 2009). Le retard et la limitation de la croissance microbienne observés, suggèrent l'effet inhibiteur sur la croissance microbienne des composés bioactifs naturels présents dans les extraits de plantes supplémentés au lait. Il est important de signaler que les données sur la dynamique de la croissance microbienne dans le lait réfrigéré additionné d'extraits de plantes manquent dans la littérature.

Les extraits de romarin étaient les herbes les plus largement utilisées pour prolonger la durée de conservation du beurre (Oraon et al., 2017). Najgebauer et al. (2009) ont évalué la stabilité au stockage du beurre additionné de romarin séché; ils ont conclu que l'ajout d'herbe de romarin était efficace pour retarder la lipolyse. De plus, Ghalem et Zouaoui (2013) ont



complété le yaourt avec l'huile essentielle de *R. officinalis* conservé jusqu'à 21 jours et ont obtenus de bons scores pour le goût, la saveur et la texture du yaourt aux herbes. Marinho et al. (2015) ont fourni des preuves que l'enrobage du fromage avec des feuilles de romarin déshydratées améliorait les propriétés physiques et physico-chimiques du fromage fabriqué à partir de lait cru ou pasteurisé par rapport au fromage fabriqué sans enrobage. D'autre part, il a été démontré que l'extrait aqueux de *R. officinalis* était efficace pour inhiber et retarder la croissance d'un certain nombre de bactéries pathogènes, notamment *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. dysenteriae*, *S. typhimurium*, *Enterobacter sakazakii* et *E. coli* (Gram-négatif) et *B. subtilis*, *S. aureus* et *Listeria monocytogenes* (Gram-positif) (Lee et al., 2009; Abkhoo et Jahani, 2017).

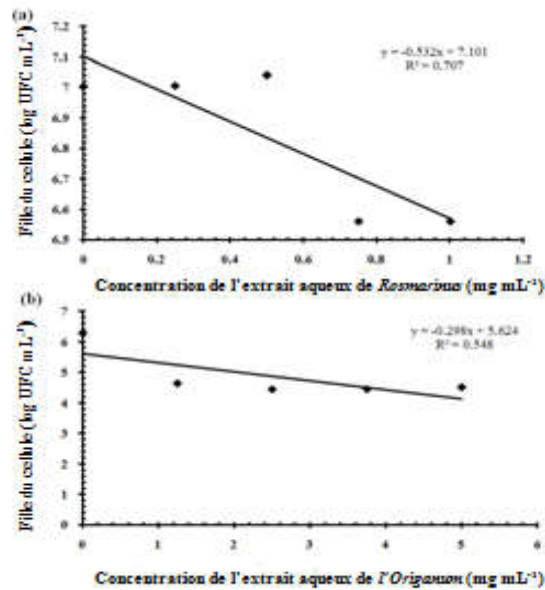
Selon Abdel-Hamied et al. (2009) une inhibition significative des micro-organismes psychrotrophes dans la viande conservée à 4 et -18 °C a été obtenue en utilisant un mélange d'extraits de romarin et de sauge. Hać-Szymańczuk et al. (2017) ont déterminé l'effet du romarin sur l'oxydation des lipides et la qualité microbienne de la viande de poulet conservée à -18 °C pendant quatre mois.

De plus, l'extrait d'origan a été considéré comme un composé inhibiteur efficace contre *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. typhimurium* et *E. coli* (Licina et al., 2013; Shahbazi et Shavisi, 2019). De plus, Bankova et Popova (2017) ont confirmé que les extraits aqueux des herbes d'origan séchées présentaient une activité antimicrobienne contre *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *Candida*. Martins et al. (2014) ont rapporté l'efficacité des extraits aqueux d'origan contre les micro-organismes à Gram-positif (*Staphylocoques*) et Gram-négatif (*Enterobacteria* et *P. aeruginosa*). L'extrait d'origan pourrait être utilisé comme composé naturel pour améliorer la durée de conservation du yaourt à des températures réfrigérées pendant 30 jours (Shahbazi et Shavisi, 2019). D'autre part, l'efficacité antibactérienne des extraits d'herbes d'origan ajoutés au fromage contre les agents pathogènes d'origine alimentaire a été démontrée (El-Sayed et Youssef, 2019 ; Ritota et Manzi, 2020).

### 2.1.3. Relation de régression linéaire

L'évaluation statistique de la relation entre les variations de la croissance maximale et les concentrations d'extraits aqueux des plantes a conduit aux équations de la droite de régression  $y = -0,532x + 7,101$  pour *Rosmarinus* et  $y = -0,298x + 5,624$  pour *Origanum*. Les coefficients

de corrélation ( $R^2$ ) ont enregistré les valeurs de 0,71 pour *Rosmarinus* et 0,55 pour *Origanum* (Figure 24).



**Figure 24** : La relation de régression linéaire entre la croissance microbienne maximale et les concentrations d'extraits aqueux de *Rosmarinus* (a) et d'*Origanum* (b) additionnés de lait réfrigéré à 4 °C.

Les résultats de la relation de régression linéaire entre les deux variables de croissance microbienne maximale et les concentrations d'extraits de plantes supplémentées au lait indiquent une corrélation négative modérée. Ce modèle de relation de régression linéaire pourrait s'expliquer par l'intervention de plus de deux variables responsables de l'activité antimicrobienne des plantes, en particulier celles de la diversité phytochimique et les différents mécanismes impliqués dans l'activité antimicrobienne des composés bioactifs des plantes. En effet, les composés phytochimiques représentent une source précieuse de composés bioactifs dotés d'activités antimicrobiennes puissantes qui exercent des activités antibactériennes potentielles contre des agents pathogènes sensibles et résistants via différents mécanismes d'action. Il existe de multiples cibles pour les agents antibactériens à savoir (I) la biosynthèse des protéines bactériennes ; (II) la biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne; (III) destruction de la membrane cellulaire bactérienne; (IV) réplication et réparation de l'ADN bactérien, (V) inhibition d'une voie métabolique et des pompes à efflux (EP) (Khameneh et al., 2019). Par rapport à la diversité phytochimique des plantes, le potentiel antimicrobien de l'origan a été attribué principalement au carvacrol, au thymol et à

l'acide rosmarinique (Bešta-Gajević et al., 2018). Alors que l'activité antibactérienne du romarin était associée à la présence de plusieurs diterpènes phénoliques, tels que l'acide carnosique, le carnosol, le rosmanol, la rosmariquinone et le rosmaridiphénol (Azizkhani et al., 2014 ; Silva et al., 2014).

**2.1.4. Evolution des bactéries lactiques**

Les valeurs de la croissance microbienne des bactéries lactiques spécialement celle du genre *Lactobacillus*, ont été enregistrées dans le lait réfrigéré additionné de différentes concentrations d'extraits aqueux de *Rosmarinus* (Tableau13) et *Origanum* (Tableau 14).

**Tableau 13 :** Les valeurs de la croissance microbienne de *Lactobacillus* dans le lait cru additionné de différentes concentrations d'extrait aqueux de *Rosmarinus* durant 10 jours de réfrigération à 4 °C.

	Croissance microbienne (log UFC mL <sup>-1</sup> )	
	Concentrations de l'extrait aqueux de Romarin (mg mL <sup>-1</sup> )	
Jours	0	0.75
0	2.099	2.48
6	1.74	1.57
10	1.61	1.72

**Tableau 14 :** Les valeurs de la croissance microbienne de *Lactobacillus* dans le lait cru additionné de différentes concentrations d'extrait aqueux de *Origanum* durant 10 jours de réfrigération à 4 °C.

	Croissance microbienne (Log UFC mL <sup>-1</sup> )				
	Concentrations de l'extrait aqueux de l'origan (mg mL <sup>-1</sup> )				
Jours	0	5	3.75	2.5	1.25
0	1,8	2,18	2,74	2,7	2,58
6	2,24	2,47	2,88	2,76	2,57
10	2,96	2,51	2,66	3,05	2,97

Pour la plante de romarin, le premier jour (0), avant la réfrigération les *Lactobacillus* étaient déjà présentes. La contamination initiale par ces germes est 2.099 dans le lait sans addition de l'extrait alors que le lait additionné de 0.75 mg mL<sup>-1</sup> est 2.48 Log UFC mL<sup>-1</sup>. Dans la 6 et les 10 jours de réfrigération, les valeurs des *Lactobacillus* variaient de 1.74 et 1.61 Log UFC mL<sup>-1</sup> dans le lait sans extrait alors que dans le lait ajouté de 0.75 mg mL<sup>-1</sup> de l'extrait variait de 1.57 et 1.72 Log UFC mL<sup>-1</sup>

Pour la plante de l'origan, le premier jour (0), avant la réfrigération les *Lactobacillus* étaient déjà présentes. La contamination initiale par ces germes est 1.8 dans le lait sans addition de l'extrait alors que le lait additionné de différente concentration variaient de 2.18 et 2.74 Log UFC mL<sup>-1</sup>. Dans la 6 et les 10 jours de réfrigération, les valeurs des *Lactobacillus* variaient de 2.24 et 2.96 Log UFC mL<sup>-1</sup> dans le lait sans extrait alors que dans le lait ajouté de différente concentration de l'extrait variait de 2.47 et 3.05 Log UFC mL<sup>-1</sup>

Les bactéries lactiques possèdent un rôle important dans l'industrie alimentaire et laitières en raison de leurs caractéristiques métaboliques microbiennes, d'une part ils décomposent les substances macromoléculaires dans les aliments, y compris la dégradation des polysaccharides indigestes et la transformation des substances aromatiques indésirables et d'autre part ils augmentent la valeur nutritive des aliments, réduisent les substances nocives, augmentent la durée de conservation (Wang et al., 2021).

Sorhaug et Stepaniak (1997), suggère que l'activité enzymatique des bactéries psychrotrophes peut favoriser la croissance des bactéries lactique principalement *Lactobacillus* qui peuvent utiliser les peptides, les acides aminés et l'ammoniac accumulés dans le lait et produits par les bactéries psychrotrophes.

Les populations de *Lactobacillus* ont également montré un comportement psychrotrophique en milieu froid et ont été présentes pendant toute la durée de réfrigération. Lafarge et al. (2004) ont constaté que *Lactococcus lactis* était une espèce dominante dans dix échantillons de lait cru et que son abondance diminuait après réfrigération. Les espèces de bactéries lactiques présentent une activité protéolytique réduite et une très faible activité lipolytique. *Lactococcus lactis* a été confirmé comme une espèce majeure de lait cru (Hantsis-Zacharov et Halpern, 2007). Habituellement, *Lactobacillus* se développe comme mésophile et montre une croissance maximale à 37 Toqeer et al (2006). Cependant, il manifeste ici une adaptation physiologique inhabituelle à l'environnement froid.

### 2.2. L'analyse sensorielle

L'analyse sensorielle du lait cru de vache additionnée de l'extrait aqueux de romarin et de l'origan a révélé des appréciations par les consommateurs sur la couleur, l'odeur, la saveur et la texture (Tableau 20).

Pour la plante de romarin, les concentrations de 0,75 et 1 mg mL<sup>-1</sup> ont été sélectionnées pour l'analyse sensorielle parce qu'elles ont données les temps de génération ( $\lambda$ ) les plus longs de 1,66±0,92 jour (39,84 h) par rapport aux concentrations 0, 0,5 et 0,25 mg mL<sup>-1</sup>. Aussi, une diminution du niveau de croissance maximale ( $X_{max}$ ) a été remarquée dans les deux laits additionnés de 0,75 et 1 mg mL<sup>-1</sup> pour atteindre un niveau de 6,56±0,19 log UFC mL<sup>-1</sup>.

Pour la plante de l'origan, les concentrations de 1.25 et 5 mg mL<sup>-1</sup> ont été choisis parce qu'elles engendrer le temps de génération le plus long de 5,04±0,97 jour (120,96 h) ; 4,02±1,70 (96,48 h) respectivement par rapport aux concentrations 0, 2.5 et 3.75 mg mL<sup>-1</sup>. Aussi une diminution des niveaux de croissance maximale ( $X_{max}$ ) a été remarquée dans les deux laits additionnés de 1,25 et 5 mg mL<sup>-1</sup> pour atteindre un niveau de 4.65±0.24 et 4.526±0.205 log UFC mL<sup>-1</sup> respectivement.

### **2.2.1. Effet de l'addition du romarin sur la qualité sensorielle du lait**

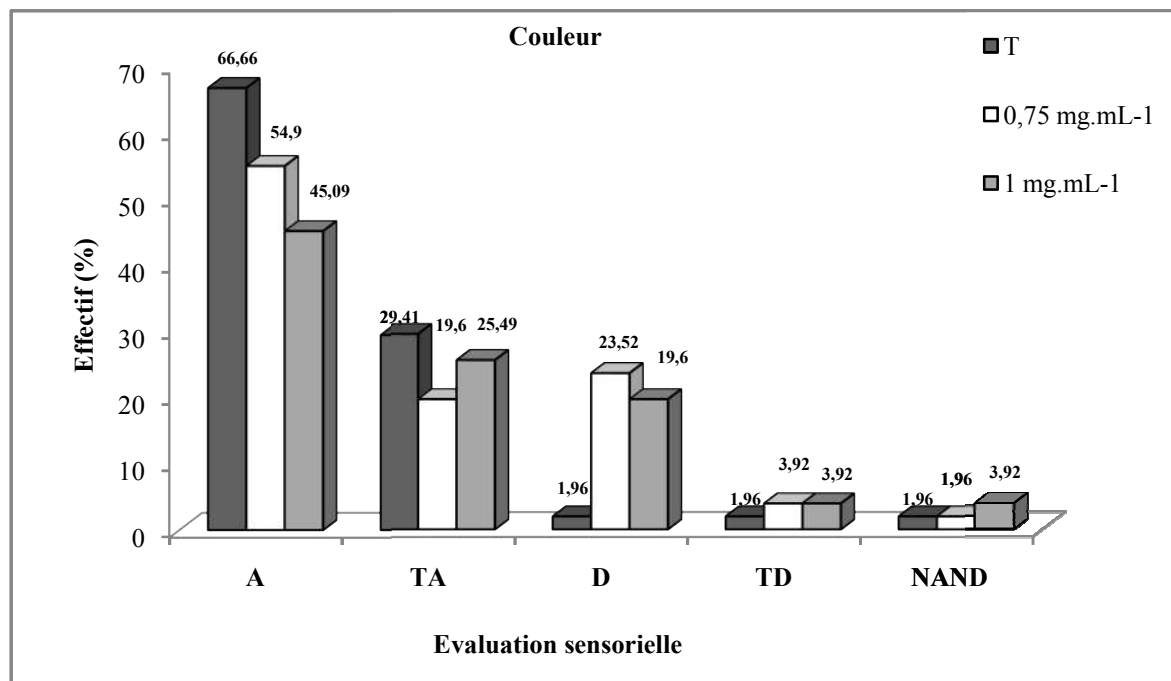
Les valeurs de l'analyse sensorielle du lait cru additionnée de l'extrait aqueux de romarin a révélé des appréciations par les dégustateurs sur la couleur, l'odeur, la saveur et la texture.

**Tableau 15 :** Les valeurs des appréciations de la couleur, l'odeur, la saveur et la texture par les consommateurs du lait cru additionner de l'extrait aqueux de romarin.

	<b>Romarin</b>			
	<b>Concentration Extrait Aqueux (mg mL<sup>-1</sup>)</b>			
		<b>0</b>	<b>0.75</b>	<b>1</b>
<b>Couleur</b>	<b>Agréable</b>	66,66	54,9	45,09
	<b>Très agréable</b>	29,41	19,6	25,49
	<b>Désagréable</b>	1,96	23,52	19,6
	<b>Très désagréable</b>	1,96	3,92	3,92
	<b>Ni agréable Ni désagréable</b>	1,96	1,96	3,92
<b>Odeur</b>	<b>Agréable</b>	58,82	45,09	47,05
	<b>Très agréable</b>	25,49	21,56	19,6
	<b>Désagréable</b>	9,8	25,49	25,49
	<b>Très désagréable</b>	3,92	1,96	1,96
	<b>Ni agréable Ni désagréable</b>	1,96	3,92	5,88
<b>Saveur</b>	<b>Agréable</b>	60,78	37,25	58,82
	<b>Très agréable</b>	27,45	25,49	13,72
	<b>Désagréable</b>	5,88	27,45	13,72
	<b>Très désagréable</b>	1,96	5,88	7,84
	<b>Ni agréable Ni désagréable</b>	0	5,88	5,88
<b>Texture</b>	<b>Agréable</b>	56,86	58,82	66,66
	<b>Très agréable</b>	33,33	29,41	21,56
	<b>Désagréable</b>	1,69	3,92	7,84
	<b>Très désagréable</b>	0	1,96	1,96
	<b>Ni agréable Ni</b>	7,84	5,88	3,92

	désagréable			
--	-------------	--	--	--

Les résultats de l'analyse sensorielle de la couleur du lait additionné de l'extrait aqueux de romarin sont présentés dans la Figure 25.

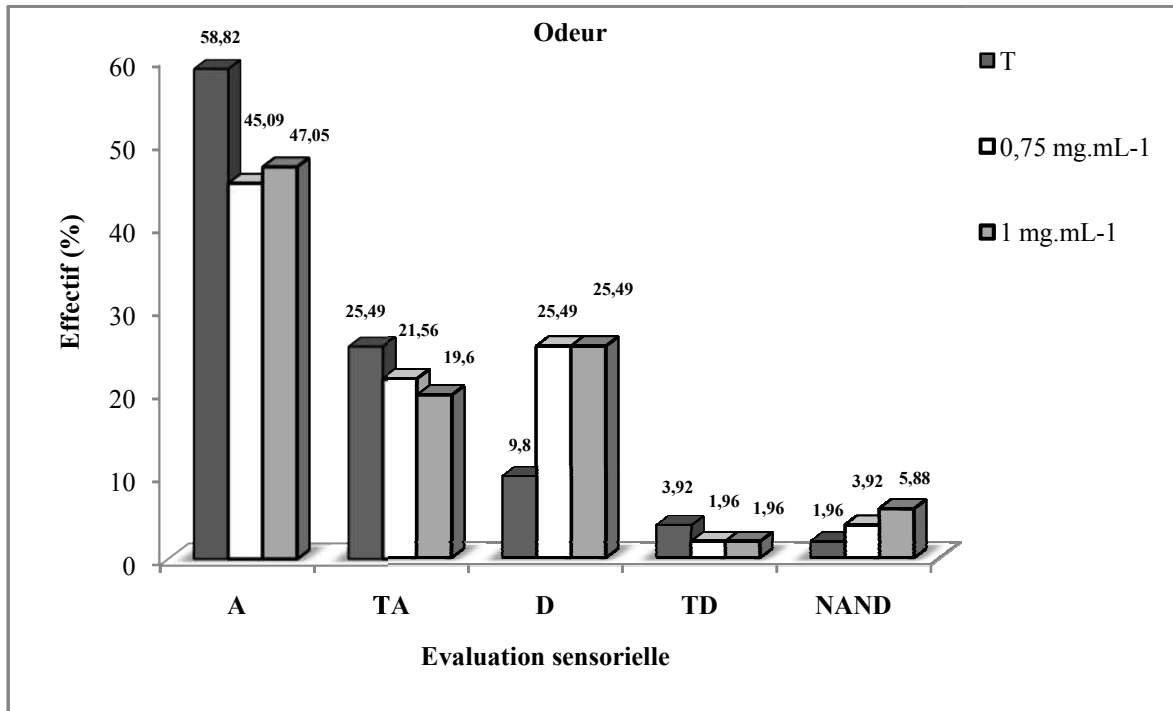


**Figure 25 :** Evaluation sensorielle de la couleur du lait cru additionner de l'extrait aqueux de *Rosmarinus officinalis* (0,75 mg mL<sup>-1</sup>, 1 mg mL<sup>-1</sup>). A : Agréable; TA : Très agréable; D : Désagréable; TD : Très désagréable; NAND : Ni agréable Ni désagréable.

La couleur a enregistré des pourcentages d'évaluation sensorielle agréable à 54,9 et 45,09 % pour les concentrations 0,75 et 1 mg mL<sup>-1</sup> respectivement.

Les résultats de l'analyse sensorielle de l'odeur du lait additionné de l'extrait aqueux de romarin sont présentés dans la Figure 26.

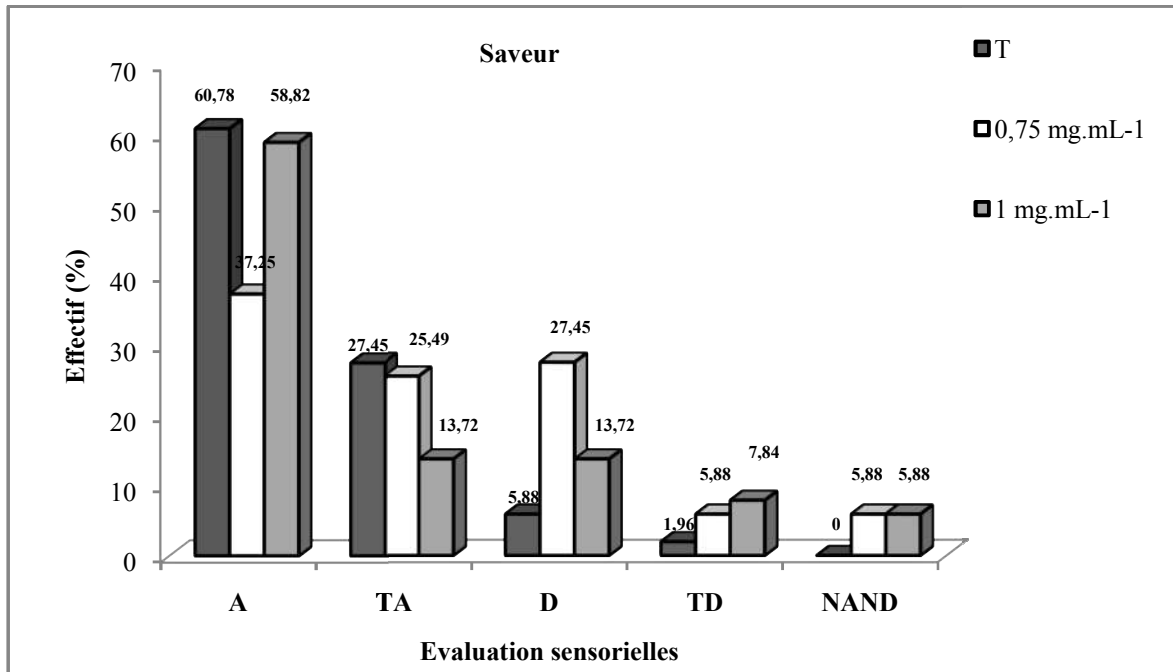




**Figure 26 :** Evaluation sensorielle de l'odeur du lait cru additionner de l'extrait aqueux de romarin ( $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A : Agréable; TA : Très agréable; D : Désagréable; TD : Très désagréable; NAND : Ni agréable Ni désagréable.

Pour l'odeur, il n'y a pas de différence significative entre les concentrations  $0,75$  et  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  qui ont enregistré  $45,09$  et  $47,05$  % respectivement d'appréciation agréable par les dégustateurs.

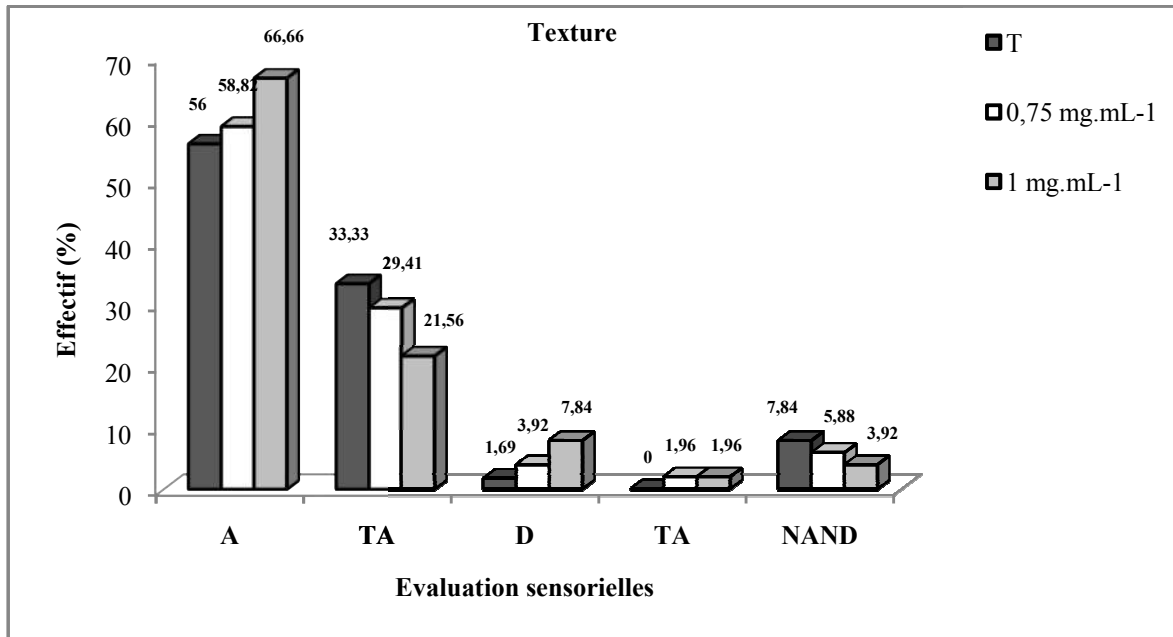
Les résultats de l'analyse sensorielle de la saveur du lait additionné de l'extrait aqueux de romarin sont présentés dans la Figure 27.



**Figure 27 :** Evaluation sensorielle de la saveur du lait cru additionner de l'extrait aqueux de romarin ( $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A : Agréable; TA : Très agréable; D : Désagréable; TD : Très désagréable; NAND : Ni agréable Ni désagréable.

Pour la saveur, elle est agréable à 58,82 % à la concentration  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  très proche du lait non additionné (60,78 %). Aussi, elle a été considérablement améliorée par rapport à la concentration  $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$  qui a donné seulement 37,25 % d'appréciation agréable.

Les résultats de l'analyse sensorielle de la texture du lait additionné de l'extrait aqueux de romarin sont présentés dans la Figure 28.



**Figure 28 :** Evaluation sensorielle de la texture du lait cru additionner de l'extrait aqueux de romarin ( $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A : Agréable; TA : Très agréable; D : Désagréable; TD : Très désagréable; NAND : Ni agréable Ni désagréable.

Pour la texture, l'évaluation sensorielle a montré une amélioration agréable de 58,82 et 66,66 % pour les concentrations  $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$  et  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  respectivement.

D'après les résultats de l'analyse sensorielle du lait cru supplémenté de l'extrait aqueux de *Rosmarinus* on peut conclure que la concentration  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  a donné la meilleure acceptabilité du produit par les dégustateurs.

### 2.2.2. Effet de l'addition de l'origan sur la qualité sensorielle du lait

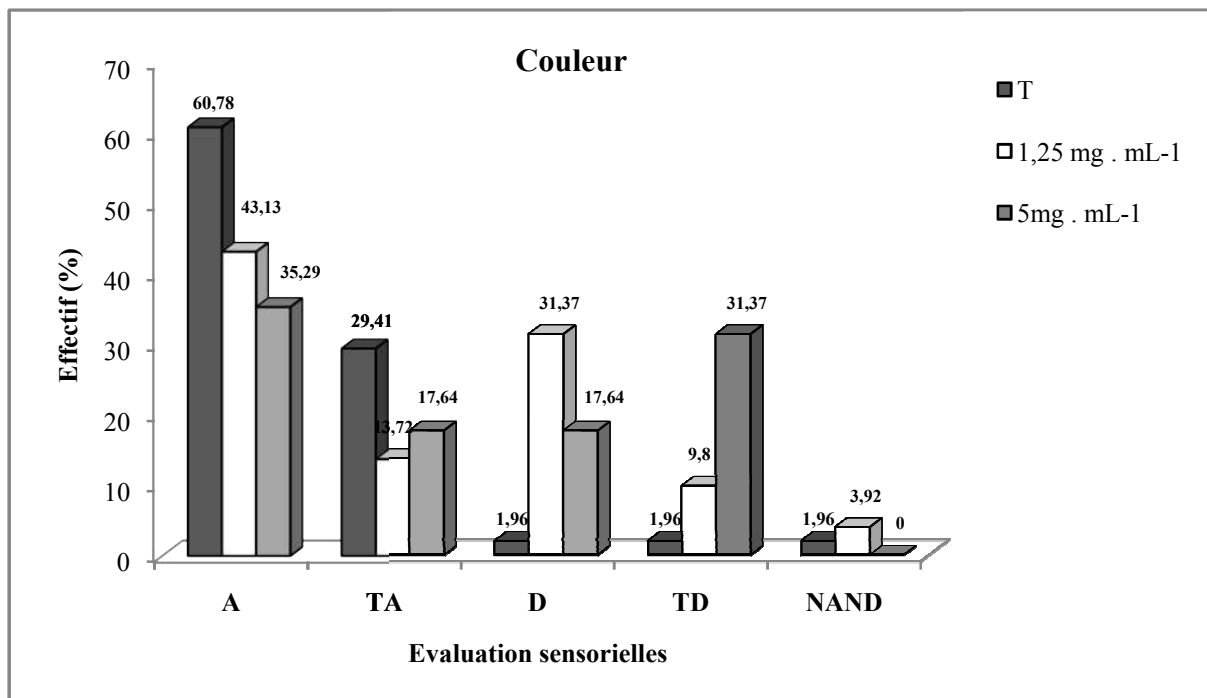
Les valeurs de l'analyse sensorielle du lait cru additionnée de l'extrait aqueux de l'origan a révélé des appréciations par les dégustateurs sur la couleur, l'odeur, la saveur et la texture (Tableau 16).

**Tableau 16.** Les valeurs des appréciations de la couleur, l'odeur, la saveur et la texture faites par les consommateurs du lait cru additionner de l'extrait aqueux de l'origan.

	<b>Origan</b>			
		<b>Concentrations Extrait Aqueux (mg mL<sup>-1</sup>)</b>		
		<b>0</b>	<b>1.25</b>	<b>5</b>
<b>Couleur</b>	<b>Agréable</b>	60,78	43,13	35,29
	<b>Très agréable</b>	29,41	13,72	17,64
	<b>Désagréable</b>	1,96	31,37	17,64
	<b>Très désagréable</b>	1,96	9,8	31,37
	<b>Ni agréable Ni désagréable</b>	1,96	3,92	0
<b>Odeur</b>	<b>Agréable</b>	49,01	52,94	35,29
	<b>Très agréable</b>	31,37	9,8	7,84
	<b>Désagréable</b>	9,8	21,56	33,33
	<b>Très désagréable</b>	1,96	7,84	21,56
	<b>Ni agréable Ni désagréable</b>	7,84	5,88	3,92
<b>Saveur</b>	<b>Agréable</b>	50,98	31,37	29,41
	<b>Très agréable</b>	37,25	9,8	3,92
	<b>Désagréable</b>	3,92	35,29	37,25
	<b>Très désagréable</b>	5,88	17,64	25,49
	<b>Ni agréable Ni désagréable</b>	1,96	1,96	1,96
<b>Texture</b>	<b>Agréable</b>	49,01	58,82	49,01
	<b>Très agréable</b>	41,17	13,72	15,68
	<b>Désagréable</b>	3,92	11,76	19,6
	<b>Très désagréable</b>	1,96	7,84	11,76
	<b>Ni agréable Ni</b>	5,88	7,84	5,88

	désagréable		
--	-------------	--	--

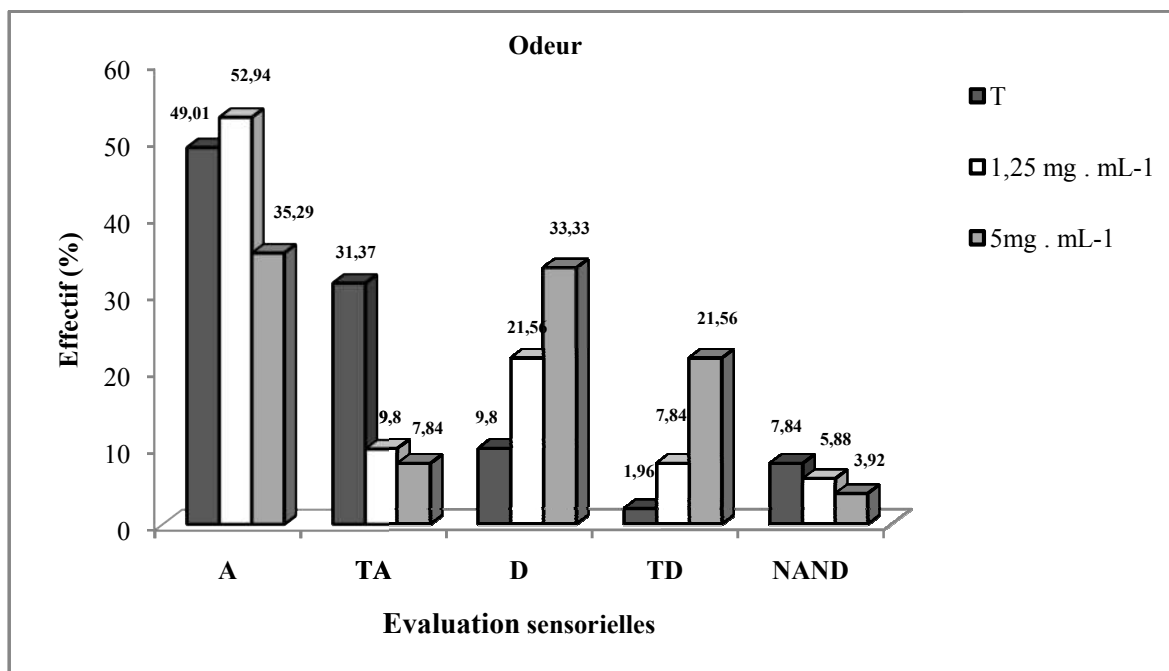
Les résultats de l'analyse sensorielle de la couleur de lait additionné de l'extrait aqueux d'origan sont présentés dans la Figure 29.



**Figure 29 :** Evaluation sensorielle de la couleur du lait cru additionner de l'extrait aqueux de l'origan (1,25 mg mL<sup>-1</sup>, 5 mg mL<sup>-1</sup>). A : Agréable; TA : Très agréable; D : Désagréable; TD : Très désagréable; NAND : Ni agréable Ni désagréable.

La couleur a enregistré des pourcentages d'évaluation sensorielle agréable à 43,13 et 35,29 % pour les concentrations 1,25 et 5 mg mL<sup>-1</sup> respectivement.

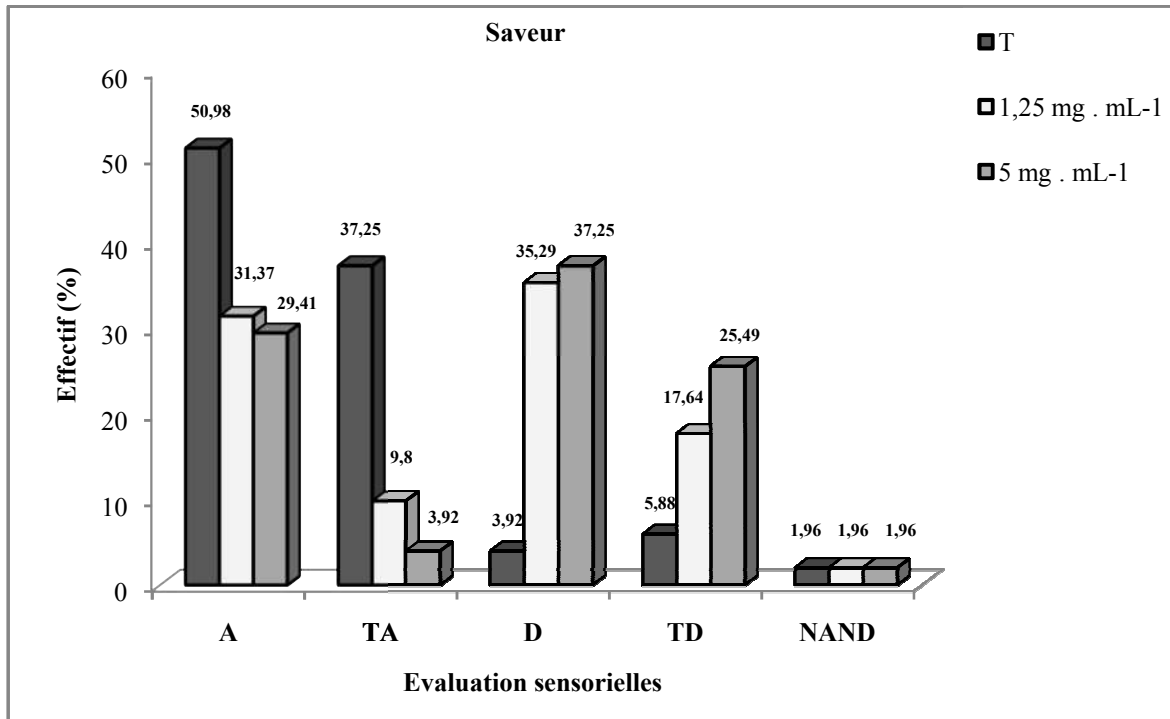
Les résultats de l'analyse sensorielle de l'odeur du lait additionné de l'extrait aqueux d'origan sont présentés dans la Figure 30.



**Figure 30 :** Evaluation sensorielle de l'odeur du lait cru additionner de l'extrait aqueux de l'origan ( $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A : Agréable; TA : Très agréable; D : Désagréable; TD : Très désagréable; NAND : Ni agréable Ni désagréable.

L'odeur a enregistré des pourcentages d'évaluation sensorielle agréable à 52,94 et 35,29 % pour les concentrations  $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$  et  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  respectivement.

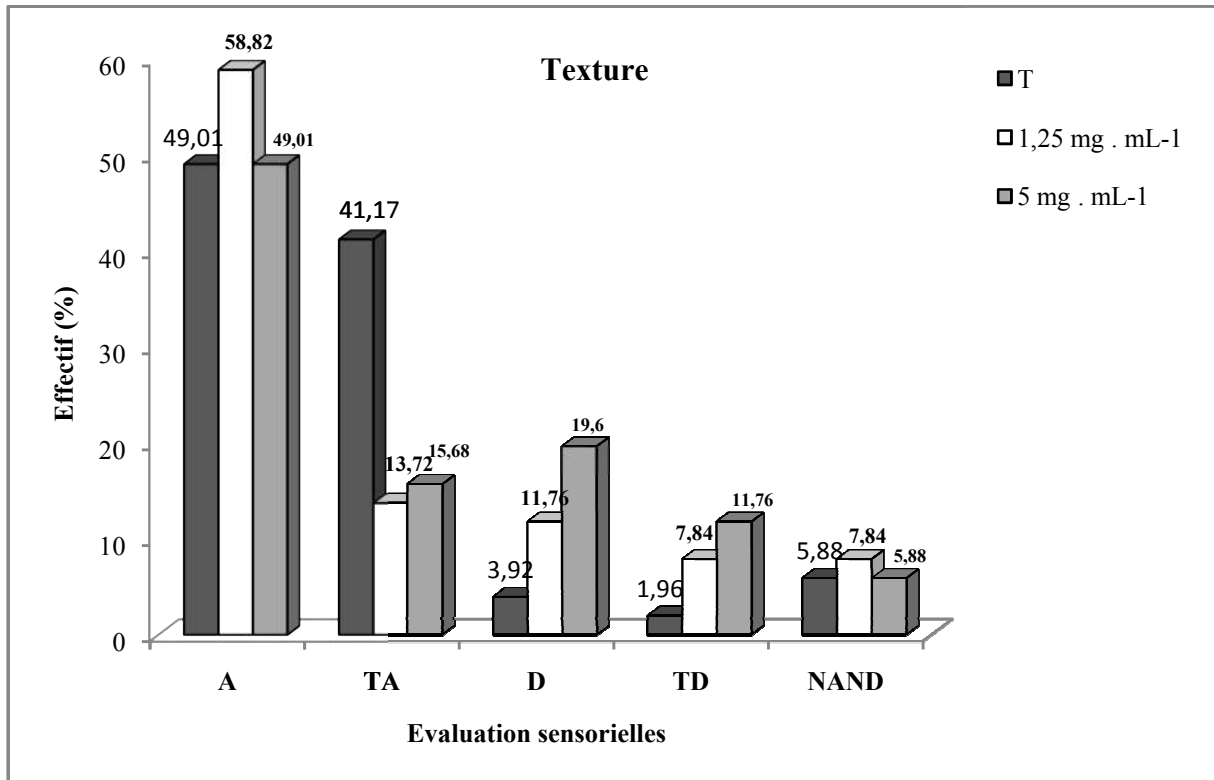
Les résultats de l'analyse sensorielle de la saveur du lait additionné de l'extrait aqueux d'origan sont présentés dans la Figure 31.



**Figure 31 :** Evaluation sensorielle de la saveur du lait cru additionner de l'extrait aqueux de *l'Origanum vulgare* (1,25 mg mL<sup>-1</sup>, 5 mg mL<sup>-1</sup>). A : Agréable; TA : Très agréable; D : Désagréable; TD : Très désagréable; NAND : Ni agréable Ni désagréable.

Pour la saveur, elle est agréable à 31,37 % à la concentration 1,25 mg mL<sup>-1</sup> alors que la concentration 5 mg . mL<sup>-1</sup> a donné 29,41% d'appréciation agréable.

Les résultats de l'analyse sensorielle de la texture du lait additionné de l'extrait aqueux d'origan sont présentés dans la Figure 32.



**Figure 32 :** Evaluation sensorielle de la texture du lait cru additionner de l'extrait aqueux de l'*Origanum vulgare* (1,25 mg mL<sup>-1</sup>, 5 mg mL<sup>-1</sup>). A : Agréable; TA : Très agréable; D : Désagréable; TD : Très désagréable; NAND : Ni agréable Ni désagréable.

Pour la texture, l'évaluation sensorielle a montré une amélioration agréable de 58,82 et 49,01% pour les concentrations 1,25 et 5 mg mL<sup>-1</sup> respectivement.

D'après les résultats de l'analyse sensorielle du lait cru supplémenté de l'extrait aqueux de l'*Origanum* on peut conclure que la concentration 1,25 mg mL<sup>-1</sup> a donné la meilleure acceptabilité du produit par les dégustateurs.

L'évaluation sensorielle est essentielle pour chaque application de lait et il est nécessaire de comprendre les qualités sensorielles du lait à cause de sa familiarité de consommation et son profil sensoriel typique. Aussi, l'évaluation sensorielle de la saveur et de l'arôme du lait peut identifier des problèmes de manipulation ou de production avant sa transformation (Lefebvre, 2003; Drake, 2007; Schiano et al., 2017).

Ces résultats de l'analyse sensorielle sont semblables à ceux réalisés par Santos et al. (2012) sur l'ajout de l'extrait brut de romarin et de l'origan au fromage frais. Les échantillons avec l'extrait d'origan ont été les plus acceptés à un indice d'acceptation de 91,1 %, alors que



les échantillons contenant de l'extrait de romarin ont montré un pourcentage d'acceptation de 76,0%. Les deux échantillons ont été soumis à une évaluation d'attributs, tels que la couleur, le goût amer, l'acidité, la saveur salée et la texture fermeté.

Aussi Shahbazi et Shavisi (2019) ont étudié l'effet sensorielle du l'ajout de l'extrait de l'origan sur les échantillons de yogourt non traité pour l'acceptabilité globale de leur apparence et arôme. Les résultats de l'évaluation sensorielle des échantillons de yogourt conservés au réfrigérateur ont indiqué qu'il n'y'a aucune différence significative entre l'apparence et l'arôme des échantillons traités avec l'extrait d'origan aux concentrations de 0,75 %, 1 % et 1,5 %. Cependant, des différences significatives étaient observés dans les scores hédoniques de l'arôme et l'aspect des échantillons contenant l'extrait d'origan aux concentrations de 0,75%, 1% et 1,5% par rapport au groupe témoin.

Zantar el al. (2013), ont étudié les effets de l'incorporation des huiles essentielles (HE) de *Thymus*, *Rosmarinus*, *Origanum* et *Myrtus* sur la qualité du fromage frais et semi-affiné de chèvre. L'étude sensorielle a montré une différence entre l'acceptabilité des fromages frais. Le fromage aromatisé au thym à 0,5 ml/kg a été le plus accepté par le panel de dégustation. Les fromages frais aromatisés à l'origan ont été moins acceptables que le témoin. L'étude sensorielle du fromage semi-affiné de chèvres a montré l'existence de différence notable liée à l'attribut odeur de chèvre. Pour les attributs goût acide, salé, arôme et arrière goût il n'y avait aucune différence.

Dans une étude réalisée par Ghalem et Zouaoui (2013) sur l'ajout d'extrait de romarin sur les propriétés sensorielles du yaourt. L'analyse sensorielle a indiqué que la saveur, le goût et la texture les plus élevés des deux types de yaourt ajoutés étaient avec 0,14 g L<sup>-1</sup> d'huile essentielle parmi les échantillons de yaourt, les résultats ont montrés que l'ajout de romarin a amélioré la qualité du yaourt.

D'autres travaux ont été menés sur l'ajout d'autres extraits de plantes aux produits laitiers. En effet, une analyse sensorielle réalisée par Pandhi et Poonia (2021) sur un dahi (un produit laitier produit par la fermentation bactérienne du lait) enrichi au lait de pois incorporé au extrait de graines de jamun. Les paramètres sensoriels étudiés sont la couleur, le corps, la texture, la saveur, l'acidité et l'ensemble acceptabilité. L'échelle d'évaluation en 9 points arrangée de telle sorte qui : aime extrêmement-9, aime beaucoup-8, aime modérément-7, aime légèrement-6, ni aime ni n'aime pas-5, n'aime pas légèrement-4, n'aime pas modérément-3,

n'aime pas beaucoup-2, n'aime pas énormément-1. Les résultats de l'évaluation sensorielle révèle que il n'y-a pas de différence entre les consistances de corps et de texture du dahi développé et du dahi control, alors que la couleur, la saveur et l'acidité du dahi est affecté significativement par l'incorporation d'extrait et l'enrichissement du lait de pois dans le dahi.

Une autre étude sur le dahi effectué par Chowdhury et Bhattacharyya (2014) par l'ajout de l'extrait de noix de muscade, feuilles de menthe, ail et ajwain. L'analyse sensorielle de dahi est réalisée par le pourcentage de 5% de l'extrait aqueux de différentes herbes par rapport au contrôle pour juger les paramètres de réglage et de saveur de dahi.

Duckova et al (2018), ont effectué une étude sur la qualité sensorielle de yaourt additionné de différentes concentrations de thym (*Thymus vulgaris*), huile essentielle de thym (un yaourt témoin, yaourt avec 0,45 % de sel et 0,25 % de thym, yaourt avec 0,90 % de sel et 0,50 % de thym, yaourt avec 0,45 % de sel et 0,004 % d'HE de thym, yaourt avec 0,90 % de sel et 0,008 % d'HE de thym. Les concentrations les plus élevée de thym et d'HE de thym ont donné aux yaourts un goût amer. La consistance dense des yaourts diminue avec l'ajout de thym et huile essentielle de thym. Le meilleur score d'analyse sensorielle des échantillons de yaourts avec des concentrations plus faibles de thym ou d'huile essentielle de thym et de sel.

***Conclusion***

### Conclusion

En face au retour mondiale croissant aux produits naturels bio, la surveillance et le développement de la qualité sanitaire et sensorielle des denrées alimentaires deviennent de plus en plus une nécessité et un souci à prendre en charge pour respecter les nouvelles tendances et préférences du consommateur. Les pouvoirs publics et les industriels commencent à donner de l'importance aux besoins des consommateurs pour cerner leurs attentes, exigences et revendications tout à fait crédibles.

Les résultats du présent travail ont montré que la supplémentation d'extraits aqueux de *Rosmarinus* et *Origanum* au lait a engendré des modifications des paramètres de croissance microbienne durant le stockage réfrigéré, se traduisant dans certaines concentrations par une prolongation de la durée de la phase de latence et une limitation de la croissance microbienne. Les concentrations recommandées d'extraits aqueux de plantes permettant de prolonger la durée de la phase de latence et de limiter la croissance microbienne sont de  $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$  pour le romarin et de  $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$  pour l'origan.

D'autres parts, les résultats de l'analyse sensorielle ont montré que le lait additionné de l'extrait aqueux de *Rosmarinus* et *Origanum* subit aussi des modifications évaluées et signalées objectivement par les dégustateurs, certaines concentrations ont démontré une qualité sensorielle acceptable avec quelques limitations. Pour la plante de *Rosmarinus*  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  donne la meilleure acceptabilité du produit par les dégustateurs alors que pour l'*Origanum* la concentration de  $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$  donne la meilleure acceptabilité.

Par rapport au choix de la nature de l'extrait, le procédé industriel et la charge économique liée à la production, il est intéressant d'utiliser industriellement les extraits aqueux des plantes pour diminuer le coût d'extraction par les solvants en grande quantité, limiter le risque lié à leur toxicité, aussi de profiter des potentiels effets synergiques des différentes fractions de l'extrait brut.

Les résultats de cette étude encouragent donc l'utilisation d'extraits aqueux de romarin et d'origan pour prolonger la durée de conservation du lait dans des conditions de réfrigération sans traitement thermique ni ajout chimique.

Comme perspective d'amélioration de cette étude, on doit élargir le nombre de dégustateurs et toucher aussi d'autres catégories d'individus dans la société pour diversifier les profils des dégustateurs. En parallèle, la qualité des questionnaires d'analyse sensorielle doit

être améliorée pour obtenir plus d'informations sur l'acceptabilité du produit par le consommateur.

A l'ombre des résultats développés dans la présente étude les recommandations qui peuvent être suggérées sont:

- L'encouragement de l'utilisation des plantes médicinales aromatiques comme additifs alimentaires naturels alternatifs des additifs chimiques et l'élimination ou la réduction du traitement thermique, par la sensibilisation des gestionnaires du secteur agroalimentaire et les actions de vulgarisation de proximité des hommes d'affaires et investisseurs
- Mener une étude socio-économique sur la potentialité régionale et nationale en végétations aromatiques comestibles et à vertus thérapeutiques, ainsi que l'évaluation des conduites et modes d'interaction alimentaire entre consommateur/plante et consommateur/biopréserveurs
- Aussi, une étude des possibilités du lancement d'une agriculture intensive des plantes aromatiques à potentiel bioconservateur est très utile.

# *Références Bibliographiques*

Références bibliographiques

- 01. Abdel-Hamied A. A., Nassar A. G., El-Badry N. (2009).** Investigation on antioxidant and antibacterial activities of some natural extracts. *Word J Dairy Food Sci* 4: 1-7.
- 02. Abdel-Massih R., Abdou E., Baydoun E., Daoud Z. (2010).** Antibacterial Activity of the Extracts Obtained from *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, and *Trigonella foenum-graecum* on Highly Drug-Resistant Gram Negative *Bacilli*. *Journal of Botany* Volume 2010, Article ID 464087, 8 pages .
- 03. Abkhoo J., Jahani S. (2017).** Antibacterial Effects of Aqueous and Ethanolic Extracts of Medicinal Plants Against Pathogenic Strains. *Int J Infect*4(2):e42624.
- 04. Adam S. I. Y., Ahmed A.A.Y., Omer A.K.M., Bashir A.M.A., Abdel Rahman O.A.M., Abdelgadir W.S. (2014).** In vitro Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* leave extracts. *J. Agri-Food & Appl. Sci.*, 2 (1): 15-21.
- 05. Ahmed El Sayed H.S., Aly M.M. (2014).** Antibacterial Activities of Six Medicinal Plants Used Traditionally by Saudi People to Treat Common Diseases. *British Biotechnology Journal*, 4(4): 499-510.
- 06. Alagawany M., Abd El-Hack M. E., Farag M. R., Shaheen H. M., Abdel-Latif M. A, Noreldin A. E., Khafaga A. F. (2020).** The applications of *Origanum vulgare* and its derivatives in human, ruminant and fish nutrition. *Ann Anim Sci* 20: 389-407.
- 07. Alnamer R., Alaoui K., El Boudida H., Benjouad A., Cherrah Y. (2012).** Toxicity and psychotropic activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Lavandula officinalis* from Morocco. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, vol. 14, pp. 262–272, 2012.
- 08. Al-Turki A. I., El-Ziney M. G., Abdel-Salam A. M. (2007).** Chemical and anti-bacterial characterization of aqueous extracts of oregano, marjoram, sage and licorice and their application in milk and labneh. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.6(1) : 39-44.

- 09. Agence National des Ressources en eau (A.N.D.I.). (2013).** Investissement en Algérie, wilaya de Mila.
- 10. Anthony C.B.P., Graham W.G. (2000).** Microbiological safety and quality of food, springer science and business media, 2000, 2024.
- 11. Arcila-Lozano C. C., Loarca-Pina G., Lecona-Urbe S., Gonzalez deMejia E. (2004).** Oregano: properties, composition and biological activity. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2004; 54:100-111.
- 12. Augustin J.C., Garry P. (2005).** Comportement de *Listeria monocytogenes* dans les produits de charcuterie. Fédération Française des Industriels Charutiers, traiteurs, Transformateurs de Viandes, 26p.
- 13. Avanzini I.C., Mantelet F., Aoussat A. (2017).** Elaboration d'une méthodologie de conception collaborative sur la qualité perçue en intégrant la méthode d'ingénierie sensorielle: une application au marché du luxe. Laboratoire de conception de produits et innovation. Paris. 1-13.
- 14. Avramescu A.M., Bazzaro F., Mahdjoub M., Sagot J.C., Simion I. (2014).** Elaboration d'une approche d'analyse sensorielle tactile des matériaux bio-sources, U.P.B. Sci. Bull., Series B, Vol. 76, Iss.1. 236- 245.
- 15. Azizkhani M., Tooryan F. (2014).** Antioxidant and Antimicrobial Activities of Rosemary Extract, Mint Extract and a Mixture of Tocopherols in Beef Sausage during Storage at 4 °C. J Food Saf 35: 128-136. doi: 10.1111/jfs.12166.
- 16. Baba Aissa F. (1991).** Les plantes médicinales d'Algérie: identification, description, principes actifs, propriétés et usage traditionnel des plantes communes en Algérie. Ed. Bouchène et Ad. Diwan, Alger. p: 121.
- 17. Baines D., Seal R. (2012).** Natural food additives, ingredients and flavorings. Cambridge, UK: Wood head publishing.
- 18. Bankova R., Popova. P.T. (2017).** Antimicrobial Activity *in vitro* of Aqueous Extracts of Oregano (*Origanum vulgare* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.). Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci (2017) 6(3): 1-12.



19. **Baranyi J., Roberts T A., McClure P. (1993).** A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, 1993, 10, 43-59.
20. **Baranyi J., Roberts T.A. (1994).** Adynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23(1994) 277-294.
21. **Baranyi J., Roberts T.A. (1995).** Mathematic of predictive food microbiology. *Int J Food Microbiol* 26: 199-218.
22. **Bearth A., Cousin M., Siegrist M. (2014).** The consumer's perception of artificial food additives: Influences on acceptance, risk and benefir perceptions. *Food Quality and Preference*, 38, 14e23.
23. **Benavides V., D'Arrigo G., Pino J. (2010).** Effects of aqueous extract of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) on the preimplantational mouse embryos. *Rev. peru. biol.* 17(3): 381 – 384.
24. **Bendifallah L., Tchoulak Y., Djouabi M., Oukili M., Ghezraoui R. (2015).** Phytochemical Study and Antimicrobial Activity of *Origanum Vulgare* L. (Lamiaceae) in Boumerdes Mountainous Region. *Journal of Medical and Bioengineering* Vol. 4, No. 6.
25. **Besta-Gajevic R., Karalija E., Jerkovic-Mujkic A., Karadza D., Smajlovic-Skenderagic L., Dahija S. (2018).** Antimicrobial and antioxidant activity of the extracts from *Origanum vulgare* L. growing wild in Bosnia and Herzegovina. *J Appl Genet* 2: 62-66.
26. **Bitric S., Dussort P., Pierre F., Bily A. C., Roller M. (2015).** Carnosic acid. *Phytochemistry*, 115, 9e19.
27. **Bornert G. (2000).** Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Rev Méd. Vét.*, 151(11) :1003-1010.
28. **Boubendir A., Hamidechi M. A., Mostakim M., El abed S., Ibsouda k. S.(2011).** Incidence de *Listeria* spp. Et autres bactéries psychrotrophes dans le lait cru bovin dans le Nord Est Algérien. *Revue Méd. Vét*162(5) : 265-269.
29. **Boubendir A., Elabed S., Hamidechi M.A., Yahia A., Koraichi S . I. (2015).** Interactions in milk psychrotrophic bacterial populations. *Journal of Food Safety and Food Quality* 66, Heft 6 (2015), Seiten 157–184.

- 30. Boubendir A., Serrazanetti D. I., Hamidechi M. A., Vannini L., Guerzoni M. E. (2016).** Changes in bacterial populations in refrigerated raw milk collected from a semi-arid area of Algeria. *Ann Microbiol* 66: 777-783.
- 31. Branger A., Richer M., Roustel S. (2007).** Alimentation, Sécurité et Contrôle Microbiologique. Ouvrage Collectif. 131p.
- 32. Carocho M., Barreiro M. F., Morales P., Ferreira I. C. F. R. (2014).** Adding molecules to Food, pros and cons: a review of synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 377e399.
- 33. Carocho M., Morales P., Ferreira I.C.F.R. (2015).** Natural food additives: *Quo vadis?*.
- 34. Cempírková R. (2007).** Contamination of cow's raw milk by psychrotrophic and mesophilic microflora in relation to selected factors. *Czech J. Anim. Sci.*, 52: 387–393.
- 35. Cempírková R., Mikulová M. (2009).** Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 54 (2): 65–73.
- 36. Chen-Yen-Su A., Assemat S., Davrieux F., Descroix F., Meile J.C., Petit T., Shum Cheong Sing A. (2016).** L'analyse sensorielle: Un outil de mesure de la qualité du cacao de l'océan Indien. *Actualités de la Recherche en Sciences de l'Éducation dans l'océan Indien*. 48- 56.
- 37. Chowdhury S. R., Bhattacharyya A. K. (2014).** Production, characterisation and value addition of dahi made from raw, pasteurized and double pasteurized milk. *IJRET: I J of Rin E and T*. eISSN: 2319-1163 pISSN: 2321-7308.
- 38. Clautriaux J.J. (2001).** Considérations sur l'analyse statistique de données sensorielles. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5 (3): 155- 158.
- 39. Daniele A., Jessica A. W., Vincenzina C., Riccardo V., Azzurra A. Tormod N., Paula V. (2017).** Making sense of the “clean label” trends: a review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. *Food Res Int* 99: 58-71.
- 40. Darke M. A. (2007).** Sensory analysis of dairy foods. Vol 90, N° 11.

41. De Jonghe V., Coorevits A., Hoorde K.V., Messens W., Landschoot A.V., De Vos P., Heyndrickx M. (2011). Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Appl Environ Microbiol* 77:460-470.
42. Delhalle L., Daube G., Adolphe Y., Crevecoeur S., Clinquart A. (2012). Les modèles de croissance en microbiologie prévisionnelle pour la maîtrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16(3) : 369-381.
43. Deneulin P., Pfister R. (2013). Méthodologie en analyse sensorielle. Objectif N° 79. 19- 31.
44. Diane M., Barrett, John C., Beaulieu., Shewfelt R. (2010). Color, Flavor, Texture, and Nutritional Quality of Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Desirable Levels, Instrumental and Sensory Measurement, and the Effects of Processing. Taylor and Francis Group, LLC. University of California. 50: 369- 389.
45. Doudach L., Meddah B., Alnamer R., Faouzi M., Chibani F., Abdelhakim E., Cherrah Y. (2012). *In vitro* Antibacterial Potential Activity of the Methanolic and Aqueous Extracts of *Corrigiola telephiifolia* Pourr. and *Mesembryanthemum nodiflorum*.
46. Dubois J., Henri M., Albert D. (2006). Dictionnaire étymologique et historique du français, Editions Larousse, 2006.
47. Duckova V., Krocko M., Knazovicka V., Canigova M. (2018). Evaluation of yoghurts with thyme, thyme essential oil and salt. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 66(2): 365–369.
48. Duizer L.M., Walker S.B. (2016). The Application of Sensory Science to the Evaluation of Grain-Based Foods. University of Guelph, Guelph, ON, Canada (Elsevier).
49. El Gendy A. N., MicheleLeonardi M., Linda Mugnaini L., FabrizioBertelloni F., Valentina V .E., Simona Nardoni S. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild and cultivated *Origanum syriacum* plants grown in Sinai, Egypt. *Industrial Crops and Products*. 2015; 67: 201-207.

- 50. El-Saadany K. M., El-Dakhakhny E. A., Hassan A. M., Morsy N. S. (2017).** Effectiveness of Selected Essential oil Plant Extracts as Bio-Preservatives in Fermented Dairy Products. *J Appl Sci Res* 13: 1-9.
- 51. El-Sayed S. M., Youssef A. M. (2019).** Potential application of herbs and spices and their effects in functional dairy products. *Heliyon* 5: e01989.
- 52. Erdogan O.I., Belhattab R. (2010).** Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Ind. Crop. Prod.* 32: 566–71.
- 53. Fajardo P., Martins J.T., Fuciños C., Pastrana L., Teixeira J.A., Vicente A.A. (2010).** Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, 101, 349-356.
- 54. Fox P. F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A. (2015).** Heat-Induced Changes in Milk. In: *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer, Cham, 345-375.
- 55. Furtuna N. (2011).** L'analyse sensorielle du vin: approches methodologiques. Université Technique de Moldavie. 82- 85.
- 56. Gad A. S., Sayd A. F. (2015).** Antioxidant Properties of Rosemary and Its Potential Uses as Natural Antioxidant in Dairy Products -A Review. *Food Nutr Sci* 6: 179-193.
- 57. Gargouri A., Hamed H., Elfeki A. (2013).** Analysis of raw milk quality at reception and during cold storage: combined effects of somatic cell counts and psychrotrophic bacteria on lipolysis. *J Food Sci* 78:M1405-M1411.
- 58. Ghalem B. R., Zouaoui B. (2013).** Microbiological, physico-chemical and sensory quality aspects of yoghurt enriched with *Rosmarinus officinalis* oil. *Afr J Biotechnol* 12: 192-198. doi: 10.5897/AJB12.1257.
- 59. Gibson A., Roberts T. A. (1986).** The effect of pH, sodium chloride, sodium nitrite and storage temperature on the growth of *Clostridium perfringens* and faecal streptococci in laboratory media. *International Journal of Food Microbiology*, v. 3, p. 195-210.

- 60. Gibson A., Bratchell N., Roberts T.A. (1988).** Predicting microbial growth: growth responses of *Salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology*, v. 6, p. 155-178.
- 61. Goetz P. (2012).** *Rosmarinus officinalis (Lamiaceae)* Romarin. *Phytothérapie antiinfectieuse*© Springer-Verlag France, Paris).
- 62. Guezlane-Tebibel N., Kahlouche B., Athmani G.S. (2010).** *Microbiologie. Travaux pratiques, office des publications universitaires, 3ème édition corrigé n° 4973,139.*
- 63. Guignard J.L. (1996).** *Abrégés en botanique. 10 ème éd. Ed. Masson, Paris. 278 p.*
- 64. Guiraud J.P. (1998).** *Microbiologie alimentaire. Edition Dunod.Paris . 652 p.*
- 65. Gunasekera T.S., Sorensen A., Attfield P.V., Sorensen S.J., Veal D.A. (2002).** Inducible Gene Expression by Nonculturable Bacteria in Milk after Pasteurization. *Applied And Environmental Microbiology*. 68:1988–1993.
- 66. Hać-Szymańczuk E., Cegiělka A., Lipińska E.,Piwowarek K. (2017).** Application Of Rosemary For The Prolongation Of Microbial And Oxidative Stability In Mechanicallydeboned Poultry Meat From Chickens. *Ital. J. Food Sci.*, Vol 29.
- 67. Hamidpour R., Hamidpour S., Elias G. (2017).** *Rosmarinus Officinalis* (Rosemary): A Novel Therapeutic Agent for Antioxidant, Antimicrobial, Anticancer, Antidiabetic, Antidepressant, Neuroprotective, AntiInflammatory, and Anti-Obesity Treatment. *Biomed J Sci & Tech Res*. 2574-1241.
- 68. Hantsis-Zacharov E., Halpern M. (2007).** Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Traits.*Appl.Environ.Microbial*.73:7162-7168.
- 69. Herbert S. (2018).** Example food: What are its sensory properties and why is that important?. *npj Science of Food*. Published in partnership with Beijing Technology and Business University.
- 70. Jain V., Gupta K. (2005).** Food and nutritional analysis. *Encyclopedia of analytical science*.

71. **Kandasamy M., Nasimuddin S., Gnanadesikan S., Nithyalakshmi J., Vennimalai S. (2017).** Antibacterial activity of aqueous infusion and decoction of dried leaves of oregano (*Origanum vulgare*) on clinical bacterial isolates. *Indian J Microbiol Res* 2017;4(4):442-447.
72. **Kaptan B., Sivri G.T. (2018).** Utilization of Medicinal and Aromatic Plants in Dairy Products. *J Adv Plant Sci.* 1(205): 2- 6.
73. **Khameneh B., Iranshahy M., Soheili V., Bazzaz B. S. F. (2019).** Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrob Resist Infect Control* 8: 118.
74. **Khribch J., Nassiks., El Houadfi M., Zrira S., Oukessou M. (2018).** Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'origan et du carvacrol sur des souches d'*Escherichia coli* d'origine aviaire. *Rev. Mar. Sci. Agron. Vét.* 6 (3): 300- 307.
75. **Kintzios S.E.( 2002).** Profile of the multifaceted prince of the herbs. In: Kintzios S.E. *Oregano – The Genera Origanum and Lippia.* Ed. Taylor & Francis, London. pp: 3–8.
76. **Kumuda M., Dhanapal K., Sravani K., Madhavi K., Sofi F.R ., Praveen Kumar G. (2017).** Studies on the Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosemarinus officinalis*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Extracts. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2017) 6(12): 3253-3261.
77. **Lacroix C. (2011).** Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation. Woodhead Publishing, Cambridge, UK.
78. **Lafarge V., Ogier J.C., Girard V., Maladen V., Leveau J.Y., Gruss A.,Delacroix-Buchet A.(2004).** Raw cow milk bacterial pollution shifts attributable to refrigeration. *Appl Environ Microbiol* 70 : 5644-5650.
79. **Lan X. Y., Wang J. Q., Bu D P., Shen J. S., Zheng N., Sun P. (2010).** Effects of heating temperatures and addition of reconstituted milk on the heat indicators in milk. *J Food Sci* 75: C653-8.
80. **Lee S.Y., Gwon S.Y., Kim S.J., Moon B.K. (2009).** Inhibitory Effect of Commercial Green Tea and Rosemary Leaf Powders on the Growth of Foodborne Pathogens in Laboratory Media and Oriental-Style Rice Cakes. *J. Food Prot., Vol. 72, No. 5.*

- 81. Lefebvre A., Bassereau J.F. (2003).** L'analyse sensorielle, une méthode de mesure au service des acteurs de la conception: ses avantages, ses limites, ses voies d'amélioration. Application aux emballages. Belfort – France. 3- 11.
- 82. Légana P., Avventuroso E., Romano G., Gioffré M.E., Patané P., Parisi S., Moscato U., Delia S. (2017).** Chemistry and hygiene of food additives. Springer Briefs in Molecular Science Chemistry of Foods. 1- 46 p.
- 83. Licina B.Z., Olgica D., Stefanovic., Sava M. V., Ivana D., Radojevic., Milan S. Dekic., Ljiljana R. Comic. (2013).** Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. Food control 33 498 – 504.
- 84. Linke B., Casagrande T., Cardoso L. (2018).** Food additives and their health effects: A review on preservative sodium benzoate . Industrial Biotechnology Program University. Paraná, Brazil.
- 85. Liu Q., Meng X., Li Y., Zhao C.N., Tang G. Y., Li H.B.(2017).** Antibacterial and Antifungal Activities of Spices. Int. J. Mol. Sci. 2017, 18, 1283; doi:10.3390/ijms18061283.
- 86. Mac Leod P., Sauvageot F. (1986).** Base neurophysiologique de l'évaluation sensorielle des produits alimentaires Ed. Tec. Et Doc. Lavoisier, Paris. 7- 115.
- 87. Makhloufi A. (2013).** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. These Doctorat. Université de tlemcen.134p.
- 88. Marinho M. T., Zielinsk A. A. F., Demiate I. M., Bersot L. D. S, Granato D., Nogueira A. (2015).** Ripened semihard cheese covered with lard and dehydrated rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves: processing, characterization and quality traits. J Food Sci 80: S2045-S2054.
- 89. Martins N., Barros L., Santos-Buelga C., Henriques M., Silva S., Ferreira I. C. F. R. (2014).** Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. Food Chem 158: 73-80.

90. **Mcceekin T.A., Olley J.N., Ross T., Ratkowsky D.A. (1993).** Predictive Microbiology. Wiley Chichester, UK.
91. **McClements J. M. J., Patterson M. F., Linton M. (2001).** The Effect of Growth Stage and Growth Temperature on High Hydrostatic Pressure Inactivation of Some Psychrotrophic Bacteria in Milk. *Journal of Food Protection*, Vol. 64, No. 4, 2001, Pages 514–522.
92. **Moreno S., Scheyer T., Romano C.S., Vojnov A.N.A. (2006).** Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research* 40(2): 223–231.
93. **Msagati T. A. M. (2013).** Chemistry of food additives and preservatives. West Sussex, UK: John Wiley & Sons.
94. **Najgebauer L. D., Grega T., Sady M. (2009).** The quality and storage stability of butter made from sour cream with addition of dried sage and rosemary. *Biotechnol Anim Husb* 25: 753-761.
95. **Naveena B.M., Vaithyanathan S., Muthukumar M., Sen A. R., Kumar Y. P., Kiran M. (2013).** Relationship between the solubility, dosage and antioxidant capacity of carnosic acid in raw and cooked ground buffalo meat patties and chicken patties. *Meat Science*, 96,195e202.
96. **Negi P.S. (2012).** Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology* 156.7–17.
97. **Nieto G., Ros G., Castillo J. (2018).** Antioxidant and Antimicrobial properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines (Basel)*. 2018 Sep; 5(3): 98.
98. **Ocana-Fuentes A., Arranz-Gutiérrez E., Senorans F.J., Reglero G. (2010).** Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essential oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. *Food Chem. Toxicol*, 48, 1568–1575.
99. **Oka Y., Nacar S., Putievsky E., Ravid U., Yaniv Z., Spiegel Y. (2000).** Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology*; 90:710–715.



- 100. Oliveira T.M., Soares N.F.F., Pereira R.M., Fraga K.F. (2007).** Development and evaluation of antimicrobial natamycin-incorporated film in gorgonzola cheese conservation. *Packaging Technology and Science*, 20, 147-153.
- 101. Oliveira G. B., Favarin L., Luchese R.H., McIntosh D. (2015).** Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know?. *Brazilian Journal of Microbiology* 46, 2, 313-321.
- 102. Oraon L., Atanu J., Prajapati P. S., Suvera P. (2017).** Application of herbs in function dairy products -a review. *J Dairy Vet Anim Res* 5: 109-115.
- 103. Pal M., Mulu S., Tekle M., Pintoo S.V., Prajapati J.P (2016).** Bacterial Contamination of Dairy Products. *Dairy Processing and Operations*, SMS College of Dairy Science, Anand Agricultural University, Anand-3888110, Gujarat, India.
- 104. Pandhi S., Poonia A. (2021).** Formulation of pea milk fortified *dahi* incorporated with jamun seed extract. *Indian J Dairy Sci* 74(1): 80-88..
- 105. Prescott L.M ., Harley j.P., Mlein D.A. (2003).** *Microbiologie. de boeck université rue des minmes* 39,2ème édition, 2003 ,1138.
- 106. Prieur D., Geshin C., Payan C. (2011).** *Minimanuel de microbiologie*.Dunod, paris. 210.
- 107. Rahmani Gohar M., Moslemi H. R., Kafshdouzan K. H., Mazaheri Nezhad Fard R. (2016).** Antibacterial Activity of *Origanum vulgare* on *Staphylococcus aureus* in a Rat Model of Surgical Wound Infection. *J Med Plants* 15: 19-24
- 108. Resa C.P.O., Jagus R.J., Gerschenson L.N. (2014b).** Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems and on cheese surfaces. *Food Control*, 35, 101-108.
- 109. Richmy C. B. A., Aïssi M. V., Youssao . K. I., Soumanou M. M. (2016).** Caractéristiques physico-chimiques du fromage Peulh produit dans les conditions optimales de coagulation à partir du lait de deux races de vaches du Bénin. *Nature and Technology. B-Sciences Agronomiques et Biologiques*, n° 14/ Janvier 2016, Pages 37 - 43.

- 110. Ritota M., Manzi P. (2020).** Natural preservatives from plant in cheese making. *Animals* 10: 749.
- 111. Ruiz-Capillas C., Herrero A.M., Pintado T., Pando G.D. (2021).** Sensory Analysis and Consumer Research in New Meat Products Development. Institute of Food Science, Technology and Nutrition. Madrid, Spain. *Foods*. 10, 429: 1-15.
- 112. Saeed S., Tariq P. (2009).** Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* Linn.) against gram positive bacteria. *Pak J Pharm Sci.* 2009 Oct;22(4):421-4.
- 113. Samah M. El-Sayed., Ahmed M Youssef. (2019).** Potentiel application of herbs and spices and their effects in functional dairy products. *Heliyon* 5 e01989.
- 114. Samarzija D., Zamberlin S., Pogacíc T. (2012).** Psychrotrophic bacteria and milk quality. *Mljekarstvo* 62(2):77–95.
- 115. Santiago-Silva P., Soares N.F.F., Nóbrega J.E., Júnior M. A.W., Barbosa K.B.F., Volp A.C.P., Zerdas E.R.M.A., Würlitzer N.J. (2009).** Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*, 20, 85-89.
- 116. Santos R.D., Shetty K., Cecchini A.L., Miglioranza L.H. (2012).** Phenolic compounds and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extracts and its use in cheese spread. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 33, n. 2, p. 655-666.
- 117. Schiano A. N., Harwood W., Drake S. M.A.(2017).** Department of Food Bioprocessing and Nutrition Sciences, Southeast Dairy Foods Research Center, North Carolina State University, Raleigh 27695.
- 118. Shahbazi Y., Shavisi N. (2019).** Effects of Oregano Methanolic Extract on the Chemical, Microbial, and Sensory Properties of Yogurt. *J Nutrition Fasting Health.* 7(3): 138-145.
- 119. Sharma M., Rajput A., Rathod C., Sahu S. (2018).** Food Chemicals Induces Toxic Effect on Health. *UK J Pharm Biosci* 6: 34.

- 120. Silva A. M. O. E., Machado I. D., Santin J. R., de Melo I. L. P., Pedrosa G. V., Genovese M. I., Farsky S. H. P., Mancini-Filho J. (2014).** Aqueous Extract of *Rosmarinus officinalis* L. Inhibits Neutrophil Influx and Cytokine Secretion. *Phytother Res* 29: 125-133.
- 121. Smith J., Hong-Shum L. (2011).** Food additives data book. Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- 122. Sorhaug., Stepaniak. (1997).** Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products quality aspects *Trends Food Sci. Technol.* 8 : 35-40.
- 123. Tarnavölgyi G. (2003).** Analysis of Consumers' Attitudes towards Food Additives Using Focus Group Survey. *Agric Conspec Sci* 68: 193-196
- 124. Teixeira B., Marques A., Ramos C., Serrano C., Matos O., Neng N. R., Nogueira J.M. F., Saraiva J .A., Nunes M .L. (2013).** Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *J Sci Food Agric* (2013).
- 125. Toqeer A., Kanwal R., Avub N. (2006).** Influence of temperature on growth pattern of *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cermoris* and *Lactococcus acidophilus* isolated camel milk. *J Biotechnol* 5 :481-488.
- 126. Toussaint F. (2003).** Les étapes de l'analyse sensorielle. *Technologie Appliquée*. Site web: [TechnoResto.org](http://TechnoResto.org).
- 127. Wang Y., Wu J., Lv M., Shao Z., Hungwe M., Wang J., Bai X., Xie J., Wang Y., Geng W. (2021).** Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front. Bioeng. Biotechnol.* <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- 128. Watts B.M., Ylimaki G.L., ffery L.E.J., Elias L.G. (1991).** Méthodes de base pour l'évaluation sensorielle des aliments. Département de l'alimentation et de la nutrition, Faculté d'écologie humaine. Centre de recherches pour le développement international, Ottawa, Canada. p145.
- 129. Weber F. (1985).** Réfrigération du lait à la ferme et organisation des transports. 1985, 216.

- 130. Yang J., Lee J. (2019).** Application of Sensory Descriptive Analysis and Consumer Studies to Investigate Traditional and Authentic Foods. *Foods*. Department of food science and nutrition, pusan national university, Busan 26241, Korea. 8 (54): 2-17.
- 131. Yuan L., Sadiq F.A., Burmolle M., Wang N., Guoqing H. E. (2019).** Insights into Psychrotrophic Bacteria in Raw Milk: A Review. *Journal of Food Protection*, Vol. 82, No. 7, 2019, Pages 1148–1159.
- 132. Zantar S., Zerrouk H.M., Zahar M., Saidi Notfia B.Z., Laglaoui A., Larbi T., Chentouf M. (2013).** Effet de l'utilisation des huiles essentielles (du thym, du romarin, de l'origan et du myrte) sur les propriétés physicochimiques, microbiologiques et sensorielles du fromage de chèvre frais et semi-affiné. *Technology creation and transfer in small ruminants: roles of research, development services and farmer associations*. N:108.
- 133. Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M., van't Riet K. (1990).** Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* 56:1875–1881.

# *Annexes*

## Les annexes

## Annexe 1. Fiche des résultats de questionnaire d'analyse sensorielle

Produits /Caractéristiques	<i>Rosmarinus Officinalis</i>			<i>Origanum Vulgare</i>		
	Témoin	75	100	Témoin	25	100
<b>Pourcentage (%)</b>						
<b>Couleur</b>						
Agréable	34	28	23	31	22	18
Très agréable	15	10	14	15	7	9
Désagréable	2	14	10	1	16	10
Très désagréable	1	2	2	1	5	16
Ni agréable Ni désagréable	1	1	2	1	2	0
<b>Odeur</b>						
Agréable	30	23	26	25	27	18
Très agréable	13	11	10	16	5	4
Désagréable	5	13	13	5	11	17
Très désagréable	2	1	1	1	4	11
Ni agréable Ni désagréable	1	2	3	4	3	2
<b>Saveur</b>						
Agréable	31	20	30	26	16	15
Très agréable	14	13	7	19	5	2
Désagréable	3	14	7	2	18	19
Très désagréable	1	3	4	3	9	13
Ni agréable Ni désagréable	0	3	3	1	1	1
<b>Texture</b>						
Agréable	29	30	34	25	30	25
Très agréable	17	15	11	21	7	8
Désagréable	1	2	4	2	6	10
Très désagréable	0	1	1	1	4	6
Ni agréable Ni désagréable	4	3	2	3	4	3
<b>Produite préféré</b>		33	18		39	13

## Annexe 2. Moyenne de trois répétitions du dénombrement, écart types et valeurs de log UFC de la plante de romarin.

Témoïn	UFC/ml	0j			2j			4j			6j			8j			10j		
		7600	7300	7100	200000	189000	178000	4500000	8000000	2700000	1E+07	5200000	4800000	17700000	8400000	17900000	17700000	8400000	17900000
	Moyenne	7333.33			189000			5066667			6700000			14666667			14666667		
	Ecartype	251.661			11000			2695057			2951271			54228014			5428014		
	Log UFC	3.8653			5.2764			6.7047			6.8260			7.1663			7.17		
100%	UFC/ml	9500	6500	9700	120000	110000	118000	300000	300000	2500000	300000	300000	250000	6900000	4300000	57000000	9500000	7700000	5200000
	Moyenne	8566.67			116000			2833333			2833333			5633333			7466666.67		
	Ecartype	1792.58			5291.5			288675			288675			1301281			2159475.24		
	Log UFC	3.9328			5.0644			6.4523			6.4523			6.7507			6.9777		
75%	UFC/ml	9000	9800	7800	119000	258000	129000	2000000	1730000	2580000	2190000	2070000	3030000	6300000	7400000	4000000	2000000	1870000	1800000
	Moyenne	8866.67			168667			2103333			2430000			5900000			1890000		
	Ecartype	1006.64			77526.3			434319			523068			1734935			101488.92		
	Log UFC	3.9477			5.2270			6.3229			6.3856			6.7708			6.27		
50%	UFC/ml	6200	6700	9700	300000	268000	235000	1330000	3000000	2970000	1.6E+07	1.5E+07	2.5E+07	8700000	7300000	8400000	7300000	6600000	7000000
	Moyenne	7533.33			267667			2433333			1.9E+09			8133333			6966666.67		
	Ecartype	1892.97			32501.3			955632			5828379			737111.5			351188.458		
	Log UFC	3.8769			5.4275			6.3862			7.2695			6.9102			6.8633		
25%	UFC/ml	6400	6200	6000	370000	300000	283000	6000000	7000000	8300000	8800000	5300000	8700000	10000000	16100000	15100000	1100000	13200000	14400000
	Moyenne	6200			317667			7100000			7600000			13733333			12866666.7		
	Ecartype	200			46112.2			1153256			1992486			3271595			1724335.62		
	Log UFC	3.7923			5.5019			6.8512			6.8808			7.1377			7.0413		

## Annexe 3. Moyenne de trois répétitions du dénombrement, écart types et valeurs de log UFC de la plante de Origan.

Témoïn	UFC/ml	0j			2j			4j			6j			8j		
		210	2950	320	800	740	730	11700	17900	22000	190000	450000	500000	2000000	1870000	1800000
	Moyenne	1160			756.6667			17200			380000					
	Ecartype	1551.16086			37.859389			5185.55686			166433.17			101488.916		
	Log UFC	3.1906			1.5781			3.7147			5.2212			5.0064		
100%	UFC/ml	14300000	11800000	13700000	30000000	28500000	30000000	21600000	24500000	28000000	11000000	9000000	5200000	300000000	240000000	284000000
	Moyenne	1326666.7			29500000			24700000			8400000			274666667		
	Ecartype	1305118.05			866025.404			3204684.04			2946183.97			31069813.9		
	Log UFC	6.1156			5.9375			6.5057			6.4692			7.4923		
75%	UFC/ml	13300000	15900000	15900000	22000000	24000000	21800000	64000000	77000000	98000000	146000000	167000000	150000000	162000000	99000000	167000000
	Moyenne	15033333.3			22600000			79666666.7			154333333			142666667		
	Ecartype	1501110.7			1216552.51			17156145.6			11150485.8			37898988.9		
	Log UFC	6.1764			6.0851			7.2344			7.0472			7.5786		
50%	UFC/ml	7800000	9700000	8800000	18700000	16700000	20000000	50000000	55000000	60000000	100000000	90000000	95000000	73000000	118000000	132000000
	Moyenne	8766666.67			18466666.7			55000000			95000000			107666667		
	Ecartype	950438.495			1662327.69			5000000			5000000			30827476.9		
	Log UFC	5.9779			6.2207			6.6989			6.6989			7.4889		
25%	UFC/ml	1570000	1970000	2650000	7800000	7500000	9100000	6700000	7200000	3800000	31000000	30000000	29000000	35000000	32500000	30000000
	Moyenne	2063333.33			8133333.33			5900000			30000000			32500000		
	Ecartype	546015.873			850490.055			1835755.98			10000000			25000000		
	Log UFC	5.7372			5.9296			6.2638			7			7.3979		

# Effect of Rosemary and Oregano Aqueous Extracts Supplementation on Microbial Growth during Refrigerated Storage of Milk

---

Asma SERRER  
Abdelhafid BOUBENDIR (✉)  
Khadidja BOUCHAIR  
Saber BOUTELLAA

## Summary

---

The aim of the present study is to evaluate the effect of adding rosemary and oregano aqueous extracts to raw cow milk on the dynamics of microbial growth during milk refrigeration. The aqueous extracts from plants leaves were prepared and supplemented to milk samples at different concentrations: 0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg mL<sup>-1</sup> for rosemary and 0, 1.25, 2.5, 3.75, 5 mg mL<sup>-1</sup> for oregano. The evolution of microbial growth was monitored at regular intervals of times during ten days of refrigerated storage at 4 °C. The enumeration of the microbial flora was conducted by the culture methods. The supplementation of the two plants extracts to refrigerated milk generated a prolongation of the lag phase duration and limited microbial growth. For rosemary, the lag phase length ( $\lambda$ ) in milks without supplementation (0 mg mL<sup>-1</sup>) was prolonged from 1.2 ± 0.80 day (28.8 h) to 1.66 ± 0.92 day (39.84 h) in milks added with 0.75 and 1 mg mL<sup>-1</sup> while the maximum cell load ( $X_{\max}$ ) diminished from 7.00 ± 0.17 log CFU mL<sup>-1</sup> in non-supplemented milks to 6.56 ± 0.19 log CFU mL<sup>-1</sup> in milks added with the same concentrations. For oregano,  $\lambda$  was delayed from 4.12 ± 0.11 day (98.88 h) in milks without supplementation to 5.04 ± 0.97 day (120.96 h) in milks added with 1.25 mg mL<sup>-1</sup>. A decrease of  $X_{\max}$  was remarked for the whole of the concentrations, registering the lowest value of 4.45 ± 1.34 log CFU mL<sup>-1</sup> at 2.5 and 3.75 mg mL<sup>-1</sup>. The use of rosemary and oregano aqueous extracts as natural additives during refrigeration could offer opportunities as biopreservatives in the milk industry, to reduce heat pretreatment and the addition of chemical additives.

## Key words

---

biopreservatives, cold storage, microbial dynamics, plants extracts, psychrotrophic bacteria

Laboratory of Natural Sciences and Materials, University Centre Abdelhafid Boussouf, RP.26, Mila 43000, Algeria

✉ Corresponding author: a.boubendir@centre-univ-mila.dz

Received: October 31, 2021 | Accepted: February 7, 2022



## Introduction

Worldwide, the major concern for consumers, food industries and regulatory agencies is the microbial safety of foods (Negi, 2012; Kumuda et al., 2017; Ritota and Manzi, 2020). Commonly, food additives are known to be a source of health risks to consumers such as nausea, headaches and weakness. Also, they can cause dangerous health risks such as allergy, hypersensitivity, asthma, neurological damage, hyperactivity and cancer. These factors motivate consumers to pay particular attention to healthy food products (Tarnavölgyi, 2003; Daniele et al., 2017; Sharma et al., 2018). Although milk is considered as a heat-stable system, some chemical and physico-chemical changes can appear during milk heat treatment. These modifications include non-enzymatic browning (Maillard), denaturation of whey proteins, damage to the creaming properties and eventually a heat-induced coagulation and hydrolysis of the caseins (Lan et al., 2010; Fox et al., 2015). Therefore, there is an increasing demand for alternatives to chemical antimicrobial additives, this leading to the exploration of novel natural compounds used as biopreservatives to reduce partially or totally chemical additives. A variety of natural products deriving from animals, plants and microorganisms can be used in biopreservation to extend foods shelf life (El-Saadany et al., 2017; Liu et al., 2017).

Since distant past, plants have been used in food not only for flavorings, but also for their therapeutic and preservative effects. There is a close association between food pattern and disease prevention. The literature documented well the effects of food on cardiovascular and hypertension disease, obesity, diabetes and osteoporosis (Abdel-Massih et al., 2010; Martins et al., 2014; Abkhoo and Jahani, 2017). The genus *Origanum* is used as food flavoring and seasoning. Due to its bioactive components, oregano exhibits antiparasitic, antimicrobial, antispasmodic, stomachic, diuretic and immunomodulator activities (Bendifallah et al., 2015; Rahmani Gohar et al., 2016; Alagawany et al., 2020). Moreover, *Rosmarinus* genus is a traditional medicinal aromatic herb widely used as a food ingredient for flavoring and is also recognized for its therapeutics benefits and strong antioxidant, antimutagenic, antimicrobial, anti-inflammatory, antirheumatic and antialgesic properties (Shama et al., 2014; Gad and Sayd, 2015; Hać-Szymańczuk et al., 2017). Consequently, the application of herbs in the production of food could improve their nutritional and medicinal values (Oraon et al., 2017; Shahbazi and Shavisi, 2019).

The refrigerated storage of raw milk controls efficiently the proliferation of mesophilic spoilage populations, while it favors simultaneously the growth of psychrotrophic flora. The psychrotrophic bacterial populations developing in milk are represented mainly by Gram-negative genera including *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* and *Serratia* and a minor number of Gram-positive genera including *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Microbacterium* (Oliveira et al., 2015; Boubendir et al., 2016). Ahmed El-Sayed and Aly (2014) investigated the antibacterial and antitumor activities of *Rosmarinus* extracts. The inhibitory effect of aqueous extract against a number of pathogenic bacteria registered minimum inhibitory concentrations values for the species of *Pseudomonas aeruginosa* (0.15 mg mL<sup>-1</sup>), *Staphylococcus aureus* (0.15 mg mL<sup>-1</sup>),

*Escherichia coli* (0.1 mg mL<sup>-1</sup>), *Shigella dysenteriae* (0.1 mg mL<sup>-1</sup>), *Klebsiella pneumoniae* (0.1 mg mL<sup>-1</sup>), *Micrococcus roseus* (0.15 mg mL<sup>-1</sup>) and *Bacillus subtilis* (0.15 mg mL<sup>-1</sup>). Licina et al. (2013) evaluated the antimicrobial activity of *Origanum* extracts against bacteria and fungi. The aqueous extract demonstrated the best inhibitory effect against the bacterial species tested such as *P. aeruginosa* (5 mg mL<sup>-1</sup>), *E. coli* (5 mg mL<sup>-1</sup>), *Proteus mirabilis* (0.3 mg mL<sup>-1</sup>), *K. pneumoniae* (2.5 mg mL<sup>-1</sup>), *Salmonella typhimurium* (5 mg mL<sup>-1</sup>), *S. aureus* (0.6 mg mL<sup>-1</sup>), *Enterococcus faecalis* (5 mg mL<sup>-1</sup>) and *Bacillus cereus* (0.3 mg mL<sup>-1</sup>). Also, the antimicrobial activity of rosemary and oregano was tested at a concentration of 5 mg mL<sup>-1</sup>. The two plants extracts showed an inhibitory activity against *P. fluorescens*, *E. coli*, *S. typhium*, *B. subtilis* and *S. aureus* (Kumuda et al., 2017). The data on the dynamics of microbial growth during the refrigerated storage of raw milk added by plants extracts is missing in the literature. The aim of the present study is to evaluate the effect of the supplementation of rosemary and oregano aqueous extracts to refrigerated milk on microbial growth dynamics.

## Material and Methods

### Plant Material

The leaves of *Rosmarinus* and *Origanum* used were collected in the region of Mila (36° 27' N / 6° 16' E) located in the North East of Algeria. The plant material was harvested during the period of February-April 2018. The leaves were then cleaned, dried in the open air and protected from the light for eight to 15 days at room temperature, finally ground into fine powder and stored for microbial analysis.

### Milk Sampling

Raw milk samples were collected in a dairy farm located at the same region. A total of ten milk samples were taken from healthy cows breed "Française Frisonne Pie noir". The cows were fed by bran, barley, oats and hay. At the time of sampling, the teat ends were cleaned, the first jets were discarded and 25 mL of raw milk samples were gathered from the four udders (i.e., a total of 100 mL per cow) in a sterile bottle and shaded. The samples were transported to the laboratory at a temperature of 4 °C.

### Preparation of Aqueous Extracts

To prepare the aqueous extract, 100 g of dry powder of each plant was dissolved in sterile distilled water (570 mL) and warmed at 40-50 °C. The maceration was conducted by a moderate stirring at 100 Hz during 48 h. The resulting extracts were filtered two times using standard filter paper. The filtrate obtained was spread on Petri dishes and left to dry for a week; the dried extract was recuperated, ground into a powder and stored in the refrigerator until use. The extraction yields were determined following the equation: Yield (%) =  $W_1 / W_2 * 100$ .  $W_1$  is the weight of the extract after drying and  $W_2$  is the weight of plant powder.

### Preparation of the Aqueous Extract Stock Solution

Two aqueous extract stock solutions were prepared by adding 1 g of rosemary and 5 g of oregano extracts to 50 mL of sterile distilled water, the solutions were mixed and kept in the refrigerator until use. In order to obtain varied concentrations

of plants extracts in milk, serial dilutions were calculated ( $C_1 V_1 = C_2 V_2$ ) and different volumes from the stock solutions were supplemented to milk. The selected concentrations were: 1, 0.75, 0.5, 0.25 and 0 mg mL<sup>-1</sup> for rosemary and 5, 3.75, 2.5, 1.25 and 0 mg mL<sup>-1</sup> for oregano.

### Bacterial Culture

Raw milk samples were stored at 4 °C to promote the growth of the psychotropic flora in the microbiota and different concentrations of plants aqueous extract were added initially (day 0<sup>st</sup>) to milk samples. The evolution of microbial growth was controlled at regular intervals of time: 0, 2, 4, 6, 8, 10 days. The samples were diluted ( $10^{-1}$  -  $10^{-5}$ ) and 1 mL of each dilution was spread onto the surface of Standard Plate Count (SPC) agar, a standard medium corresponding to the American Public Health Association formulation for milk, water, food, and dairy products (Oxoid CM0463; Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). The plates were incubated at 37 °C for 48 h, those with the number of colonies 30 to 300 were considered for counting. The whole of the experiments was completed in three replications per milk sample at each time point and the results were expressed as arithmetic mean values.

### Biomathematical Analysis

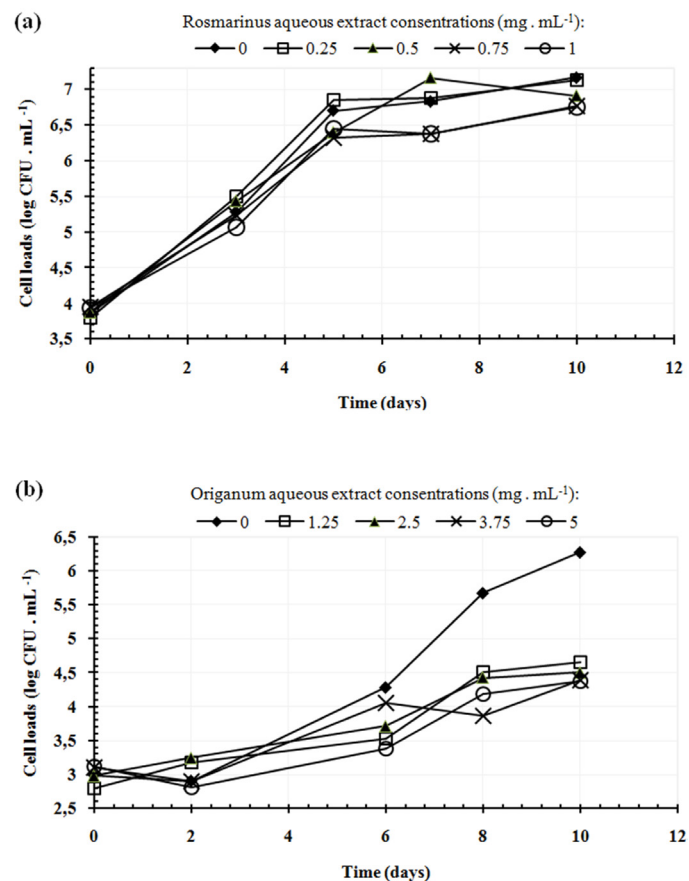
The predicted values of the microbial growth parameters, i.e., maximum growth rate ( $\mu_{max}$ ), lag phase length ( $\lambda$ ) and maximum cell load attained ( $X_{max}$ ), were obtained using Baranyi and Roberts Model (Baranyi and Roberts, 1995).

### Results

The microbial growth curves of refrigerated milk supplemented with different concentrations of rosemary and oregano aqueous extracts are shown in (Fig. 1). The results of microbial growth parameters ( $X_{max}$ ,  $\mu_{max}$  and  $\lambda$ ) obtained using Baranyi and Roberts Model, are represented in (Fig. 2) for *Rosmarinus* and (Fig. 3) for *Origanum*. The linear regression relationship between the maximum microbial growth and *Rosmarinus* and *Origanum* aqueous extracts concentrations is given in Fig. 4. The extraction yields of rosemary and oregano aqueous extracts gave 9 and 13 % respectively and the initial microbial contamination of milks registered the mean value of 3.54 log CFU mL<sup>-1</sup> (3500 CFU mL<sup>-1</sup>) for rosemary and 3.19 log CFU mL<sup>-1</sup> (1550 CFU mL<sup>-1</sup>) for oregano.

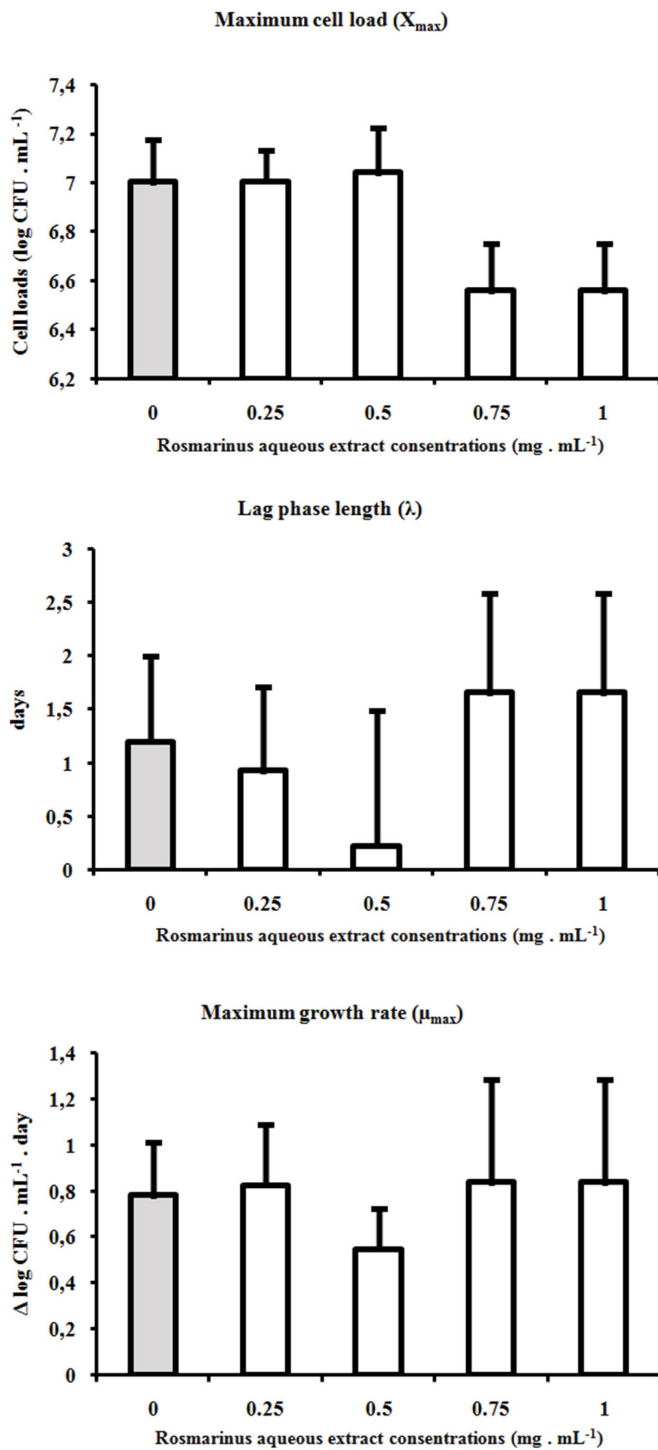
For rosemary plant, the results showed a delay in microbial growth characterized by a prolongation of the generation time ( $\lambda$ ) with 11.04 h, from  $1.2 \pm 0.80$  day (28.8 h) in milk without supplementation to  $1.66 \pm 0.92$  day (39.84 h) in both milks enriched with 1 and 0.75 mg mL<sup>-1</sup> of rosemary aqueous extract. However, the concentrations 0.5 and 0.25 mg mL<sup>-1</sup> showed reduced generation times of  $0.22 \pm 1.26$  and  $0.92 \pm 0.78$  day respectively. In addition, a slight diminution in the maximum growth level ( $X_{max}$ ) was remarked from  $7.00 \pm 0.17$  log CFU mL<sup>-1</sup> in non-supplemented milk to  $6.56 \pm 0.19$  log CFU mL<sup>-1</sup> in both milks enriched with 1 and 0.75 mg mL<sup>-1</sup> of rosemary aqueous extract. However, the maximum microbial growth in milks supplemented with 0.5 and 0.25 mg mL<sup>-1</sup> reached  $7.04 \pm 0.18$  and  $7.00 \pm 0.12$  log CFU mL<sup>-1</sup> respectively. These rates are almost similar to the ones of non-supplemented milk. A decrease in the maximum growth rate ( $\mu_{max}$ ) was observed from  $0.78 \pm 0.23$   $\Delta$ log CFU mL<sup>-1</sup> day in non-added milk to  $0.55 \pm 0.17$   $\Delta$ log CFU mL<sup>-1</sup> day in milk

supplemented with 0.5 mg mL<sup>-1</sup> of rosemary aqueous extract, while a slight increase in maximum growth rates was remarked in the other concentrations ranging from  $0.82 \pm 0.26$  to  $0.84 \pm 0.44$   $\Delta$ log CFU mL<sup>-1</sup> day.

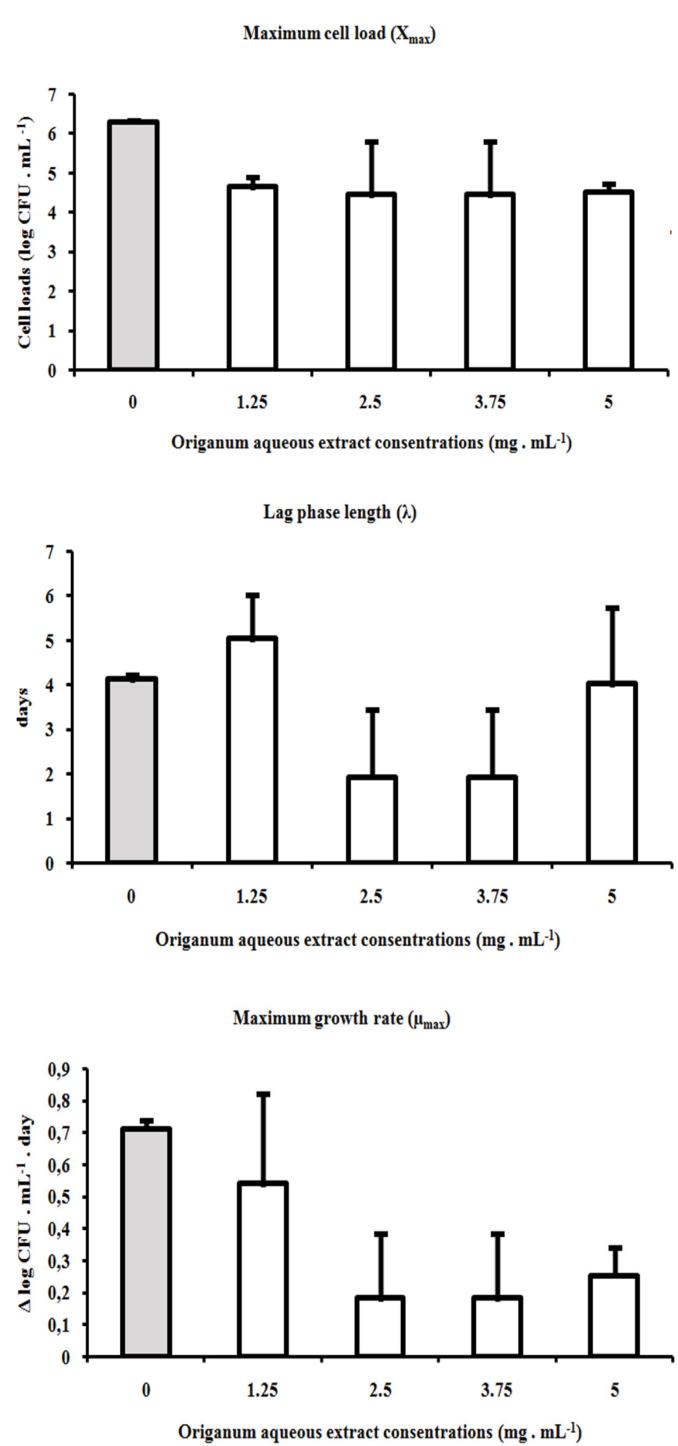


**Figure 1.** Growth curves of total bacterial count in raw milk supplemented with different concentrations of *Rosmarinus* (a) and *Origanum* (b) aqueous extracts and refrigerated during 10 days at 4 °C

For oregano plant, the results showed a delay in microbial growth characterized by a prolongation of the generation time ( $\lambda$ ) with 22.08 h, from  $4.12 \pm 0.11$  day (98.88 h) in milk without supplementation to  $5.04 \pm 0.97$  day (120.96 h) in milk supplemented with 1.25 mg mL<sup>-1</sup> of oregano aqueous extract while the concentration 5 mg mL<sup>-1</sup> gave a generation time of  $4.02 \pm 1.70$  (96.48 h), which is almost similar to the one of non-added milk. However, the concentrations 2.5 and 3.75 registered a reduced generation time of  $1.93 \pm 6.52$  day. An important diminution in the maximum growth level ( $X_{max}$ ) was remarked for the whole of oregano concentrations, registering the lowest value of  $4.45 \pm 1.34$  log CFU mL<sup>-1</sup> with the concentrations 2.5 and 3.75 mg mL<sup>-1</sup> of aqueous extract, compared to the milk without supplementation which registered an  $X_{max}$  of  $6.29 \pm 0.03$  log CFU mL<sup>-1</sup>. On the other hand, a decrease in the maximum growth rate ( $\mu_{max}$ ) was observed in the totality of concentrations, registering the lowest value of  $0.18 \pm 0.2$   $\Delta$ log CFU mL<sup>-1</sup> day with the concentrations 2.5 and 3.75 mg mL<sup>-1</sup> of aqueous extract, compared to the milk without addition which registered a higher  $\mu_{max}$  of  $0.71 \pm 0.02$   $\Delta$ log CFU mL<sup>-1</sup> day.

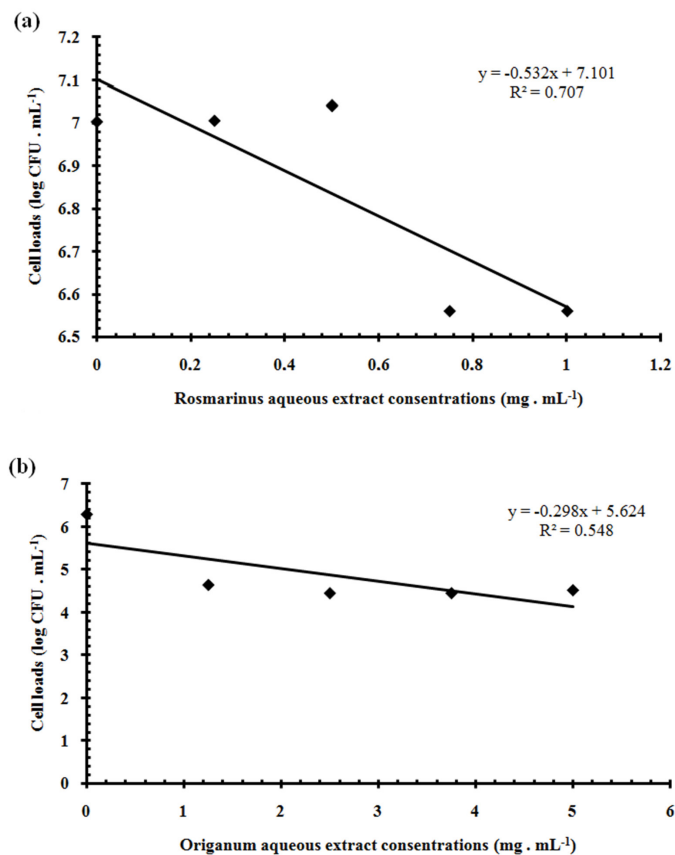


**Figure 2.** Microbial growth parameters obtained by Baranyi and Roberts Model of mean count data of total bacteria in raw milk supplemented with different concentrations of *Rosmarinus* aqueous extract and refrigerated during 10 days at 4 °C. The mean values are expressed with the standard deviation.



**Figure 3.** Microbial growth parameters obtained by Baranyi and Roberts Model of mean count data of total bacteria in raw milk supplemented with different concentrations of *Origanum* aqueous extract and refrigerated during 10 days at 4 °C. The mean values are expressed with the standard deviation.

The statistical evaluation of the relation between  $X_{\max}$  variations and plants aqueous extracts concentrations resulted in the equations of the regression line  $y = -0.532x + 7.101$  for rosemary and  $y = -0.298x + 5.624$  for oregano. The correlation coefficients ( $R^2$ ) registered the values of 0.71 and 0.55 for rosemary and oregano respectively.



**Figure 4.** The linear regression relationship between the maximum microbial growth and *Rosmarinus* (a) and *Origanum* (b) aqueous extract concentrations supplemented to refrigerated raw milk at 4 °C

## Discussion

The initial microbial contamination registered is under the hygiene limit for psychrotrophic bacteria in milk 4.69 (50 000 CFU mL<sup>-1</sup>), which reflects the good level of hygiene of the herd and the respect hygienic principles of milk acquisition and storage (Cempírková, 2007; Cempírková and Mikulová, 2009). The delay and the limitation of microbial growth remarked, suggest the inhibiting effect on microbial growth of the natural bioactive compounds present in the plants extracts supplemented to milk. It is important to notify that the data on the dynamics of microbial growth in refrigerated milk to which plants extracts have been added is missing in the literature.

Rosemary extracts have been the most widely used herbs for prolonging the shelf life of butter (Oraon et al., 2017). Najgebauer et al. (2009) evaluated the storage stability of butter added with dried rosemary; they concluded that the addition of rosemary herb was effective in delaying lipolysis. Also, Ghalem and Zouaoui

(2013) supplemented yoghurt with *R. officinalis* essential oil kept up to 21 days and good scores for taste, flavor and texture of the herbal yoghurt were obtained. Marinho et al. (2015) provided evidence that coating of cheese with dehydrated rosemary leaves improved the physical and physicochemical properties of cheese made from raw or pasteurized milk as compared to cheese made without coating. On the other hand, it was demonstrated that the aqueous extract of *R. officinalis* was effective in inhibiting and delaying the growth of a number pathogenic bacteria, including *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. dysenteriae*, *S. typhimurium*, *Enterobacter sakazakii* and *E. coli* (Gram-negative) and *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. roseus* and *Listeria monocytogenes* (Gram-positive) (Lee et al., 2009; Abkhoo and Jahani, 2017). According to Abdel-Hamied et al. (2009) a significant inhibition of psychrotrophic microorganisms in meat preserved at 4 and -18 °C was obtained using a mixture of rosemary and salvia extracts. Hać-Szymańczuk et al. (2017) determined the effect of rosemary on lipids oxidation and the microbial quality of chicken meat kept at -18 °C for four months.

Moreover, oregano extract is considered to be an effective inhibitory compound against *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. typhimurium* and *E. coli* (Licina et al., 2013; Shahbazi and Shavisi, 2019). Furthermore, Bankova and Popova (2017) confirmed that water extracts of the dried oregano herbs exhibited antimicrobial activity against *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *Candida*. Martins et al. (2014) reported the efficiency of oregano water extracts against Gram-positive (Staphylococci) and Gram negative (Enterobacteria and *P. aeruginosa*) microorganisms. Oregano extract could be used as a natural compound to improve the shelf life of yogurt at refrigerated temperatures for 30 days (Shahbazi and Shavisi, 2019). In addition, the antibacterial effectiveness of oregano herbs extracts added to cheese against foodborne pathogens was demonstrated (El-Sayed and Youssef, 2019; Ritota and Manzi, 2020).

The results of the linear regression relationship between the two variables of maximum microbial growth and the concentrations of plants extracts supplemented to milk indicate a moderate negative correlation. This pattern of linear regression relationship could be explained by the intervention of more than two variables responsible for the plant antimicrobial activity, especially those of phytochemical diversity and the several mechanisms involved in antimicrobial activity of plants bioactive compounds. Indeed, phytochemicals represent a valuable source of bioactive compounds with potent antimicrobial activities and have exerted potential antibacterial activities against sensitive and resistant pathogens via different mechanisms of action. There are multiple targets for the antibacterial agents that comprise (I) bacterial protein biosynthesis; (II) bacterial cell-wall biosynthesis; (III) bacterial cell membrane destruction; (IV) bacterial DNA replication and repair; (V) inhibition of a metabolic pathway and efflux pumps (EPs) (Khameneh et al., 2019). The antimicrobial potential of oregano has been attributed mainly to carvacrol, thymol and rosmarinic acid (Bešta-Gajević et al., 2018), while the antibacterial activity of rosemary was associated with the presence of several phenolic diterpenes, such as carnosic acid, carnosol, rosmanol, rosmariquinone and rosmaridiphenol (Azizkhani and Tooryan, 2014; Silva et al., 2014).

## Conclusion

We have demonstrated here that the supplementation of rosemary and oregano aqueous extracts to refrigerated milk generates a prolongation of the lag phase duration and a limitation of microbial growth. According to the results, the recommended concentrations of plants aqueous extracts providing a prolongation of the lag phase duration and a limitation of microbial growth are 0.75 mg mL<sup>-1</sup> for rosemary and 1.25 mg mL<sup>-1</sup> for oregano. Although this study is preliminary, the data obtained encourage the use of rosemary and oregano aqueous extracts to extend milk shelf life under refrigeration conditions without heat treatment or chemical addition. These two plants could be proposed as potential candidates for the biopreservation of milk. In perspective, a sensory analysis study will be performed to evaluate the acceptability of the products by the consumer.

## Acknowledgements

The authors express their gratitude to all members of the Laboratory of Natural Sciences and Materials, University Centre Abdelhafid Boussouf, Mila, Algeria. The study was financially supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, Project PRFU number D01N01CU430120180001.

## References

- Abdel-Hamied A. A., Nassar A. G., El-Badry N. (2009). Investigation on Antioxidant and Antibacterial Activities of Some Natural Extracts. *Word J Dairy Food Sci.* 4: 1-7
- Abdel-Massih R., Abdou E., Baydoun E., Daoud Z. (2010). Antibacterial Activity of the Extracts Obtained from *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana* and *Trigonella foenum-graecum* on Highly Drug-Resistant Gram Negative Bacilli. *J Botany* 464087: 8. doi: 10.1155/2010/464087
- Abkhoo J., Jahani S. (2017). Antibacterial Effects of Aqueous and Ethanolic Extracts of Medicinal Plants against Pathogenic Strains. *Int J Infect.* 4: e42624. doi: 10.5812/iji.42624
- Ahmed El-Sayed H. S., Aly M. M. (2014). Antibacterial Activities of Six Medicinal Plants Used Traditionally by Saudi People to Treat Common Diseases. *Int J Biotechnol.* 4: 499-510. doi: 10.9734/BBJ/2014/8532
- Alagawany M., Abd El-Hack M. E., Farag M. R., Shaheen H. M., Abdel-Latif M. A., Noreldin A. E., Khafaga A. F. (2020). The Applications of *Origanum vulgare* and Its Derivatives in Human, Ruminant and Fish Nutrition. *Ann Anim Sci.* 20: 389-407. doi: 10.2478/aoas-2020-0004
- Azizkhani M., Tooryan F. (2014). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Rosemary Extract, Mint Extract and a Mixture of Tocopherols in Beef Sausage during Storage at 4 °C. *J Food Saf* 35 (1): 128-136. doi: 10.1111/jfs.12166
- Bankova R., Popova T. P. (2017). Antimicrobial Activity *in vitro* of Aqueous Extracts of Oregano (*Origanum vulgare* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 6: 1-12. doi: 10.20546/ijcmas.2017.603.001
- Baranyi J., Roberts T. A. (1995). Mathematic of Predictive Food Microbiology. *Int J Food Microbiol.* 26: 199-218. doi: 10.1016/0168-1605(94)00121-L
- Bendifallah L., Tchoulak Y., Djouabi M., Oukili M., Ghezraoui R. (2015). Phytochemical Study and Antimicrobial Activity of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) in Boumerdes Mountainous Region. *J Med Bioeng.* 4: 471-474. doi: 10.12720/jomb.4.6.471-474
- Bešta-Gajević R., Karalija E., Jerković-Mujkić A., Karadža D., Smajlović-Skenderagić L., Dahija S. (2018). Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Extracts from *Origanum vulgare* L. Growing Wild in Bosnia and Herzegovina. *J Appl Genet.* 2: 62-66
- Boubendir A., Serrazanetti D. I., Hamidechi M. A., Vannini L., Guerzoni M. E. (2016). Changes in Bacterial Populations in Refrigerated Raw Milk Collected from a Semi-Arid Area of Algeria. *Ann Microbiol.* 66: 777-783. doi: 10.1007/s13213-015-1163-5
- Cempirková R. (2007). Contamination of Cow's Raw Milk by Psychrotrophic and Mesophilic Microflora in Relation to Selected Factors. *Czech J Anim Sci.* 52: 387-393. doi: 10.17221/2325-CJAS
- Cempirková R., Mikulová M. (2009). Incidence of Psychrotrophic lipolytic Bacteria in Cow's Raw Milk. *Czech J Anim Sci.* 54: 65-73. doi: 10.17221/1667-CJAS
- Daniele A., Jessica A. W., Vincenzina C., Riccardo V., Azzurra A. Tormod N., Paula V. (2017). Making Sense of the "Clean label" Trends: A Review of Consumer Food Choice Behavior and Discussion of Industry Implications. *Food Res Int.* 99: 58-71. doi: 10.1016/j.foodres.2017.07.022
- El-Saadany K. M., El-Dakhkhny E. A., Hassan A. M., Morsy N. S. (2017). Effectiveness of Selected Essential oil Plant Extracts as Bio-Preservatives in Fermented Dairy Products. *J Appl Sci Res.* 13: 1-9
- El-Sayed S. M., Youssef A. M. (2019). Potential Application of Herbs and Spices and Their Effects in Functional Dairy Products. *Heliyon* 5: e01989. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01989
- Fox P. F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A. (2015). Heat-Induced Changes in Milk. In: *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer, Cham, pp. 345-375. doi: 10.1007/978-3-319-14892-2
- Gad A. S., Sayd A. F. (2015). Antioxidant Properties of Rosemary and Its Potential Uses as Natural Antioxidant in Dairy Products - A Review. *Food Nutr Sci.* 6 (1): 179-193. doi: 10.4236/fns.2015.61019
- Ghalem B. R., Zouaoui B. (2013). Microbiological, Physico-Chemical and Sensory Quality Aspects of Yoghurt Enriched with *Rosmarinus officinalis* oil. *Afr J Biotechnol.* 12: 192-198. doi: 10.5897/AJB12.1257
- Hać-Szymańczuk E., Cegiełka A., Lipińska E., Piwowarek K. (2017). Application of Rosemary for The Prolongation of Microbial and Oxidative Stability in Mechanically Deboned Poultry Meat from Chickens. *Ital J Food Sci.* 29: 329-342. doi: 10.14674/1120-1770/ijfs.v581
- Khameneh B., Iranshahy M., Soheili V., Bazzaz B. S. F. (2019). Review on Plant Antimicrobials: A Mechanistic Viewpoint. *Antimicrob Resist Infect Control* 8: 118. doi: 10.1186/s13756-019-0559-6
- Kumuda M., Dhanapal K., Sravani K., Madhavi K., Sofi F. R., Praveen Kumar G. (2017). Studies on the Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Extracts. *Int J Cur Microbiol Appl Sci.* 6: 3253-3261. doi: 10.20546/ijcmas.2017.612.378
- Lan X. Y., Wang J. Q., Bu D P., Shen J. S., Zheng N., Sun P. (2010). Effects of Heating Temperatures and Addition of Reconstituted Milk on the Heat Indicators in Milk. *J Food Sci.* 75: C653-8. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01802.x
- Lee S. Y., Gwon S. Y., Kim S. J., Moon B. K. (2009). Inhibitory Effect of Commercial Green Tea and Rosemary Leaf Powders on the Growth of Foodborne Pathogens in Laboratory Media and Oriental-Style Rice Cakes. *J Food Prot.* 72: 1107-1111. doi: 10.4315/0362-028x-72.5.1107
- Licina B. Z., Olgica D., Stefanovic Sava M. V., Ivana D, Radojevic Milan S. D., Ljiljana R. C. (2013). Biological Activities of the Extracts from Wild Growing *Origanum vulgare* L. *Food Control* 33: 498-504
- Liu Q., Meng X., Li Y., Zhao C. N., Tang G. Y., Li H. B. (2017). Antibacterial and Antifungal Activities of Spices. *Int J Mol Sci.* 18: 1283. doi: 10.3390/ijms18061283
- Marinho M. T., Zielinsk A. A. F., Demiate I. M., Bersot L. D. S, Granato D., Nogueira A. (2015). Ripened Semihard Cheese Covered with Lard and Dehydrated Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Leaves: Processing, Characterization and Quality Traits. *J Food Sci.* 80: S2045-S2054. doi: 10.1111/1750-3841.12988
- Martins N., Barros L., Santos-Buelga C., Henriques M., Silva S., Ferreira I. C. F. R. (2014). Decoction, Infusion and Hydroalcoholic Extract of *Origanum vulgare* L.: Different Performances Regarding Bioactivity and Phenolic compounds. *Food Chem.* 158: 73-80. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.02.099

- Najgebauer L. D., Grega T., Sady M. (2009). The Quality and Storage Stability of Butter Made from Sour Cream with Addition of Dried Sage and Rosemary. *Biotechnol Anim Husband.* 25: 753-761
- Negi P. S. (2012). Plant Extracts for the Control of Bacterial Growth: Efficacy, Stability and Safety Issues for Food Application. *Int J Food Microbiol.* 156: 7-17. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006
- Oliveira G. B., Favarin L., Luchese R. H., McIntosh D. (2015). Psychrotrophic Bacteria in Milk: How Much Do We really Know?. *Braz J Microbiol.* 46: 313-321. doi: 10.1590/S1517-838246220130963
- Oraon L., Atanu J., Prajapati P. S., Suvera P. (2017). Application of Herbs in Function Dairy Products -A Review. *J Dairy Vet Anim Res.* 5: 109-115. doi: 10.15406/jdvar.2017.05.00145
- Rahmani Gohar M., Moslemi H. R., Kafshdouzan K. H., Mazaheri Nezhad Fard R. (2016). Antibacterial Activity of *Origanum vulgare* on *Staphylococcus aureus* in a Rat Model of Surgical Wound Infection. *J Med Plants.* 15: 19-24
- Ritota M., Manzi P. (2020). Natural Preservatives from Plant in Cheese Making. *Animals* 10: 749. doi: 10.3390/ani10040749
- Shahbazi Y., Shavisi N. (2019). Effects of Oregano Methanolic Extract on the Chemical, Microbial, and Sensory Properties of Yogurt. *J Nutr Fasting Health* 7: 138-145. doi: 10.22038/jnfh.2019.39732.1189
- Shama I. Y., Adam, Abdullah A. Y., Ahmed, Adam K. M. Omer, Aldai M. A. Bashir, Omer A. M. Abdel Rahman and Warda S. Abdelgadir (2014). *In vitro* Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* Leave Extracts. *J Agric Food Appl Sci.* 2: 15-21
- Sharma M., Rajput A., Rathod C., Sahu S. (2018). Food Chemicals Induces Toxic Effect on Health. *UK J Pharm Biosci.* 6: 34. doi: 10.20510/ukjpb/6/i4/177338
- Silva A. M. O. E., Machado I. D., Santin J. R., de Melo I. L. P., Pedrosa G. V., Genovese M. I., Farsky S. H. P., Mancini-Filho J. (2014). Aqueous Extract of *Rosmarinus officinalis* L. Inhibits Neutrophil Influx and Cytokine Secretion. *Phytother Res.* 29: 125-133. doi: 10.1002/ptr.5238
- Tarnavölgyi G. (2003). Analysis of Consumers' Attitudes towards Food Additives Using Focus Group Survey. *Agric Conspec Sci.* 68 (3): 193-196

---

aCS88\_8