

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA – Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie physico-chimique
Filière : Science Biologique
Option : Biochimie Appliquée



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER II

Biochimie appliquée

Thème

Activité antioxydante de mucilage purifié de
Cicer arietinum et *Vicia faba minor* utilisé
comme prébiotique

Présenté par :

BOUDJOU Adel

Soutenu le : **15 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

M^{me}. Hassissene N

Mr. Zaidi F

M^{me}. Bakdi

Invité : **M^{elle}**. Ould Saadi Lynda

MAA

Professeur

MAA

Présidente

Encadreur

Examinatrice

Invité

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Louange à Dieu, le miséricordieux, sans Lui rien de tout
Cela n'aurait pu être.

*Au terme de ce travail, il nous est agréable d'adresser nos remerciements à
tous ceux qui nous ont octroyé main vigoureuse pour sa réalisation à :*

Monsieur le professeur Zaidi. F

M^{lle} Ould Saadi. L

*Pour le temps et l'intention qu'ils ont bien voulu consacrer au bon
déroulement de ce travail.*

M^{me} Hassissene. N

De nous avoir fait l'honneur de juger le travail et présider le jury.

M^{me} BAKDI

Pour avoir acceptée de donner de son temps pour évaluer ce travail.

A toute l'équipe de laboratoire de Nutrition et Alimentation
spécialement :

Souhila, Rosa, hassina, Silya, Radia, Ghania, Karima, Lila et Biba.

*Nous tenons également à remercier toute personne ayant contribué de près
ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

Merci également à tous ceux qui, un jour ou l'autre, nous ont offert leur amitié
et des moments inoubliables tout au long de notre cursus universitaire.

BOUDJOU Adel

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents

A mon frère " Massinissa "

A mes sœurs

"Ouardia, Ouahiba et Nadjet "

A mes cousins et cousines spécialement :

Souhila, Yazid, Lamia, Narimane , Hichem, Lyes et Djamila

Et a toute la famille Ouabba spécialement :

"Razik, Mebrouk, Samir, Billel, Lahlou, Athman, Massenssen, Mourad,
Mehfoute et Abdenour".

A mes chers amis:

"Rahmani Sofiane et Toufik"

A tous mes amis (es) spécialement :

"Benmamar Salem, Remila Ghani ,Bellir Malek, Gheberiou Nassim,
Abdelli Jugo, Arezki Bachir et Hocine, Ouzani Samir, Tighremt
Mustapha, Idjouadiene Farid, Belkacemi Rabah, Boudjema Adada, Naït
Sedous Fatima , Quiqui, Kherdine Salima, Rachidouï Karim , Yu Ni,
Mokhtar et a tous les étudiants de ma promotion Master 2 Biochimie
Appliquée "

BOUDJOU Adel

Sommaire

Liste des Abréviations.

Liste des Figures.

Liste des Tableaux.

Introduction 1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les prébiotiques des légumineuses

I. Les prébiotiques des légumineuses	3
I.1. Définition	3
I.2. Source de Prébiotiques et leur efficacité	3
I.3. Différents types de prébiotiques	4
I.4. Les mucilages	6
I.5. Effets des prébiotiques	7
I.5.1. Effets entre les prébiotiques	7
I.5.2. Effets de prébiotiques sur la flore intestinale	7
I.6. Effets cliniques et mécanisme d'action de divers prébiotiques	8
I.7. Définition générale d'un probiotique	9

Chapitre II : Le kéfir

II.1. Le kéfir.....	10
II.1. Définition et origine du kéfir	10
II.2. Grain du kéfir	10

II.2.1. Composition microbienne des grains de kéfir	11
II.3. Les bienfaits du kéfir	12
II.3.1. La réparation de la muqueuse intestinale	12
II.3.1. Intolérance au lactose	13
II.4. Role préventif de kéfir	13
II.4.1. Sur les radicaux libres.....	13
II.4.2. Sur les fonctions hépatiques	13
II.5. Les symbiotiques	13
II.5.1. Définition	13
II.5.2. Intérêt de symbiotique.....	14

Chapitre III : Les composés phénoliques

III.1. Définition	15
III.1.1. Les acides phénoliques	15
III.1.2 Les flavonoides.....	16
III.1.3. Les falavonols.....	17
III.1.4. Les tanins	17
III.2. Propriétés biologiques des composés phénoliques	18

Partie pratique

Chapitre I: Matériel et Méthodes

I. Matériel végétal	20
I.1. Origine et provenance des Graines	20
I.1.2. Classification botanique des graines.....	20
I.1.3. Préparation des échantillons.....	20

I.2. Extraction des mucilages	21
I.2.1. Extraction des mucilages bruts.....	21
I.2.2. Purification des mucilages	21
I.3. Dosage des composés phénoliques	21
I.3.1. Dosage des polyphénols totaux	21
I.3.2. Dosage des flavonoïdes	22
I.3.3. Dosage des flavonols	23
I.4. Activités antioxydantes	23
I.4.1. Activités antiradicalaire en utilisant le DPPH.....	23
I.4.2. Pouvoir réducteur.....	24
I.5. Activité prébiotique.....	25
I.5.1. Préparations du kéfir.....	25
I.5.2. Analyses microbiologiques.....	25
I.5.3. Analyses physico-chimiques.....	26
I.6.3.1. Mesure du pH.....	26
I.6.3.2. Mesure de l'acidité.....	26
I.7. Extraction des composés phénoliques des kéfirs.....	27
I.8. Analyses statistiques	27

Chapitre II: Résultats et Discussion

II.1. Dosage des composés phénoliques.....	28
II.1.1. Les polyphénols totaux solubles.....	28
II.1.2. les flavonoïdes.....	29
II.1.3. Les flavonols.....	29
II.2. Activité Antioxydante des mucilages purifiés.....	30
II.2.1. L'activité anti-radicalaire du DPPH.....	30
II.2.2. Le pouvoir réducteur.....	32

II.3. Discussion générale.....	33
II.4. Activité prébiotique	35
II.4.1. Evolution du pH.....	35
II.4.2. Evolution de l'acidité titrable.....	36
II.4.3. Croissance et viabilité des colonies.....	37
II.5. Dosages des composés phénoliques des kéfirs.....	38
II.6. Discussion de l'activité prébiotique.....	39
Conclusion.....	42
References bibliographiques	
Annexe	

Liste des abréviations

ED : L'eau distillée

HCl : Acide chlorhydrique

Q : Quercétine

DO: Densité Optique

EAG: Equivalent Acide Gallique

UFC: Unité Formant Colonie

FOS : Les fructo-oligosaccharides

GOS : Gluco-oligosaccharides

LDL : Lipoprotéines de basse densité (mouvée cholestérol)

HDL: Lipoprotéines de haute densité (bon cholestérol)

ANOVA : Analyse de la variance

TTA : L'acidité titrable

CP : Composés phénoliques

PTS : Polyphénol totaux

H : heur

AOX : Antioxydants

EAA : Equivalent d'acide ascorbique

IOS : Isomalto-oligosaccharides

XOS : Xylo-oligosaccharides

EGA : Equivalent d'acide gallique

Liste des Figures

Figure 1 : Structure de galacto-oligosaccharides (GOS) de type- β 1,4.....	5
Figure 2 : Structure de l'inuline	6
Figure 3 : Concentration des bifidobactéries et des entérobactéries dans les selles de volontaires après ingestion de transgalacto-oligosaccharides.....	7
Figure 4 : Image de grain du Kéfir	10
Figure 5 : Illustration des grains de kéfir en grossissement de 7000 X.....	11
Figure 6 : Mode d'action d'un composé phénolique	15
Figure 7 : Squelette de base des flavonoïdes	17
Figure 8 : Exemples de structures chimiques d'un tanin hydrolysable et d'un tanin condensé.....	18
Figure 9 : Mécanisme de la réaction du chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes.....	22
Figure 10 : Mécanisme réactionnel de la réduction du radical DPPH.....	23
Figure 11 : Teneurs en polyphénols totaux dans le mucilage purifier.....	28
Figure 12 : Teneur en flavonoïdes des extraits de mucilage purifier	29
Figure 13 : Teneur en flavonols des extraits de mucilage purifier.....	30
Figure 14 : Activité antiradicalaire du DPPH.....	31
Figure 15 : Pouvoir réducteur des mucilages purifier	32
Figure 16 : Evolution du pH en fonction de temps de stockage a froids.....	35
Figure 17 : Evolution de l'acidité titrable en fonction de temps de stockage à froids	36
Figure 18 : Evolution des colonies des kéfirs en fonction de temps de stockage.....	37
Figure 19 : Teneurs des composéé phénoliques des kéfirs en fonction de jours de stockage.....	39

Liste des Tableaux

Tableau I : Potentiel prébiotiques de quelques légumineuses.	4
Tableau II : Quelques bactéries et levures présentes dans le kéfir.	12
Tableau III : Exemple d'études sur l'efficacité des symbiotiques.	14
Tableau IV: Teneurs en acides phénoliques dans quelques légumineuses.	16
Tableau V: Teneur en flavonoïdes dans quelques légumineuses.	17
Tableau VI : Propriétés biologiques des composés phénoliques.	19
Tableau VII: Classification systématique de <i>Cicer arietinum</i> et <i>Vicia faba minor</i>	17
Tableau VIII : Formulations différentes de kéfir et leur codage.	17
Tableau IX : Coefficients de corrélations entre les Polyphénols totaux, Flavonoïdes, Flavonols et l'activité anti radicalaire.	32
Tableau X : Coefficients de corrélations entre les Polyphénols totaux, Flavonoïdes, Flavonols et pouvoir réducteur.	33

Introduction

Introduction

Les travaux de **Metchnikoff. (1907)** ont démontré que la consommation d'aliments fermentés permet de rétablir la flore intestinale en générant des effets bénéfiques sur la santé de l'Homme et des animaux. De nombreuses études scientifiques ont rapporté les propriétés prophylactiques et thérapeutiques de certains microorganismes présent dans les aliments fermentés notamment les bifidobactéries et lactobacilles (**Parker, 1974 ; Gibson et Fuller, 2000 ; Varcose et al., 2003 ; Marelli et al., 2004; Lin et al., 2005**).

Depuis une dizaine d'années, un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation de cultures lactiques (*Bifidobacterium, Lactobacillus*) à effets bénéfiques pour la santé ou «probiotique» pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou encore en alimentation animale. Dans la majorité des cas, les produits laitiers tels les yaourts, laits fermentés, fromages, laits en poudre et crèmes glacées ont été choisis comme véhicules privilégiés des cultures probiotiques (**Doleyres et al., 2002 et Jones ,2002**) à citer le kéfir comme un aliment probiotique dont l'originalité est l'utilisation d'un ferment particulier (grain de kéfir) qui est une symbiose de levures et de bactéries (**Rollan, 1988**).

Cependant, l'effet probiotique dépend du taux de survie de ces bactéries non seulement dans les aliments mais également dans le tractus gastro-intestinal (**Shah 2000; Marteau et al., 2003**).

Les prébiotiques peuvent être produits industriellement par hydrolyse des polysaccharides ou bien se retrouver naturellement dans les fruits et légumes. Plusieurs études ont prouvé le potentiel prébiotique des légumineuses : lentille (**Zare et al., 2011**) ; lentille, pois chiche et soja (**Zare et al., 2012**) ; lentille (**Agil et al., 2012**) ; Féverole (**Boudjou et al., 2013**).

Les légumineuses sont considérées comme un très bon composant prébiotique pour les produits laitiers et autres aliments contenant des probiotiques (**Saharan et al., 2002**), offrant la possibilité d'améliorer la formulation des laits fermentés d'un point de vue nutritionnel ainsi qu'une perspective d'amélioration de la croissance bactérienne. Les antioxydants naturels des légumineuses font l'objet de nombreuses recherches pour l'exploitation de leurs métabolites secondaires, particulièrement les polyphénols tant du point de vue santé vis-à-vis des maladies pernicieuses (cancer) que dans l'industrie agro-alimentaire (**Perez, 2008**). L'efficacité puissante de ces substances à stopper les réactions radicalaires en neutralisant les radicaux

libres, est principalement attribuée à leurs structures phénoliques avec la présence des groupements hydroxyles.

Cette étude porte sur la possibilité d'utilisation de mucilages de graines de légumineuses (*Vicia faba minor* et *Cicer arietinum*) comme source de prébiotique.

L'objectif de cette étude consiste dans un premiers temps à déterminer la teneur en composés phénoliques contenus dans les mucilages purifiés des deux légumineuses ainsi qu'une évaluation de leur activité antioxydante (activité antiradicalaire et pouvoir réducteur). La deuxième partie consiste à évaluer le potentiel prébiotique de ces mucilages en utilisant le kéfir comme modèle fermentaire avec un suivi pendant les 28 jours du stockage à froid de la viabilité microbienne, pH et acidité titrable et dosage des composés phénoliques.

Synthèse

bibliographique

Chapitre I :
Les prébiotiques des
légumineuses

I. Les prébiotiques des légumineuses

I.1. Définition

Le terme prébiotique a été défini pour la première fois en 1995 par Gibson et Roberfroid comme « ingrédient de nourriture non digestible qui affecte avantageusement l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'un ou un nombre limité de bactéries améliorant ainsi la santé du consommateur. »

Ainsi, cette définition a été mise à jour par les auteurs : « ingrédient sélectivement fermenté qui permet des changements spécifiques, de la composition et/ou activité dans le micro biote gastro-intestinal qui confère des avantages sur le bien-être et la santé des consommateurs. » (**Gibson *et al.*, 2004**).

I.2. Sources de Prébiotique et leur efficacité

Les prébiotiques peuvent se retrouver naturellement dans les légumineuses telles que la Fève, Fèverole, Lentille, Pois, Blé, Pois chiche (**Tableau I**) dans les fruits et les légumes. Ils représentent en moyenne 2% de leur poids.

Dans les deux dernières décennies, un bon nombre d'études ont été consacrées à la production d'oligosaccharides comme ingrédients favorisant un état de bien-être, et santé des consommateurs. Une attention particulière est attribuée aux types spécifiques d'hydrates de carbone diététiques, en tant que composés calorifiques non cardiogéniques, non digestibles stimulant la croissance et le développement du micro biote gastro-intestinal, (**Mussamatto et Mancilha, 2007**).

Ils peuvent être obtenus par extraction directe à partir de sources naturelles, ou produits par des processus chimiques (hydrolyse de polysaccharides), ou par synthèse enzymatique et chimique de disaccharides. Actuellement, les trans-galactooligosaccharides et les fructanes de type inuline sont ceux dont les effets prébiotiques sont reconnus (**Nugent, 2000; Mussamatto et Mancilha, 2007**).

Tableau I : Potentiel prébiotiques de quelques légumineuses (Vierling, 2008).

Composant Légumineuse	Glucides (%)	Amidon (%)	Fibres (%)	Cellulose (%)	Minéraux (%)
Fève	60,20	60	8	7,80	2,5
Fèverole	50	43	12	9	4
Lentille	60,80	42-50	10-12	3,10	3
Pois	60,10	46-48	12-16	2,7	6
Pois chiche	44.3	41.89	15.5	-	-

I.3. Différents types de prébiotiques

Du fait du métabolisme des bactéries lactiques et des différentes enzymes digestives, les prébiotiques ne peuvent être de nature protéinique ou lipidique mais plutôt glucidique (Cumings et MacFarlane, 2002). Les prébiotiques les plus utilisés actuellement sont les oligosaccharides (Delzenne, 2003). Le **Tableau III** résume les principaux prébiotiques commercialisés (annexe 1).

➤ Les fructo-oligosaccharides (FOS) :

Les Fructo-oligosaccharides ou les FOS se rapportent typiquement aux oligosaccharides à chaîne courte constitués de fructose et de glucose et contenant trois à cinq unités de monosaccharide. Les FOS, sont produits à l'échelle industrielle à partir du sucrose en utilisant une enzyme fongique « fructosyltransferase ». Deux classes de (FOS) sont produites commercialement : à base d'inuline ou bien à base de polyfructose (un polymère de résidus de D-fructose liés avec une liaison β (2-1) et le D-glucose liés avec une liaison α (1-2)) (Hartemink, 1999).

➤ **Isomalto-oligosaccharides IOS :**

Les Isomalto-oligosaccharides (IO) comportent un mélange d'oligomères de glucose liés par α -D-(l'isomaltose, le panose, l'isomaltotetraose, l'isomaltopentaose, le nigerose, le kojibiose, l'isopanose) embranchés aux oligosaccharides. Des Isomalto-oligosaccharides sont produits par divers processus enzymatiques. Ils stimulent la croissance des espèces de *Bifidobacterium* de *Lactobacille* dans le grand intestin (Rousseau, 2004).

➤ **Gluco-oligosaccharides GOS**

Les GOS appartiennent à la famille des glucanes. Ces derniers sont des polymères de glucose (Figure 01) liés par différents types de liaisons (α ou β ; 1→4, 1→6, 1→2 ou 1→3). Ils peuvent se trouver à l'état naturel sous forme par exemple d'amidon ou de glycogène jouant un rôle de réserve glucidique (Rousseau, 2004).

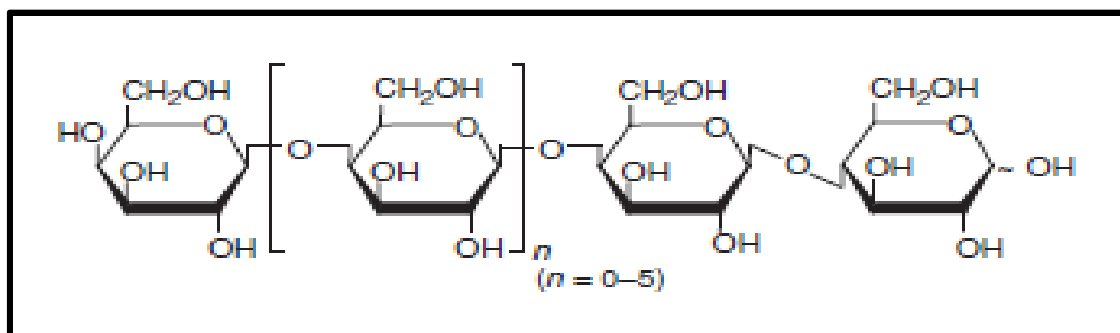


Figure 01 : Structure de galacto-oligosaccharides (GOS) de type- β 1,4 (Sako *et al.*, 2011).

➤ **Xylo-oligosaccharides XOS :**

Les Xylo-oligosaccharides (XOS) sont des polymères de xylose liés par des liaisons β (1→4). Leur degré de polymérisation est de deux à quatre. Les XOS sont obtenus par l'hydrolyse enzymatique du xylane (Priebe, 2002).

➤ **Fructans :**

Les Fructans sont un groupe de nature oligosaccharidique et fructo-oligosaccharidique trouvé en faible quantité (ordre du milligramme) dans les oignons, bananes, blé, artichauts, ail, et autres (Munjal, 2009). Ils sont également extraits à partir de la chicorée ou bien synthétisés industriellement. En dépit de leurs similitudes, les fructans demeurent distincts entre eux de par l'origine, structure, et caractéristiques de fermentation (Chow, 2002).

➤ Inuline

L'inuline appartient à une classe d'hydrates de carbone connus sous le nom de fructans dérivés des racines des topinambours de chicorée (*Cichorium intybus*) et d'artichaut de Jérusalem. Les inulines sont des polymères composés principalement d'une chaîne de fructoses se terminant par une liaison (2→1) reliant un α -D-glucose à cette chaîne. Les unités de fructose de l'inuline sont reliées (**figure 2**) par un lien glucosique β (2 → 1). Le degré moyen de polymérisation de l'inuline est de 10 à 12 (**Brugger, 2006**).

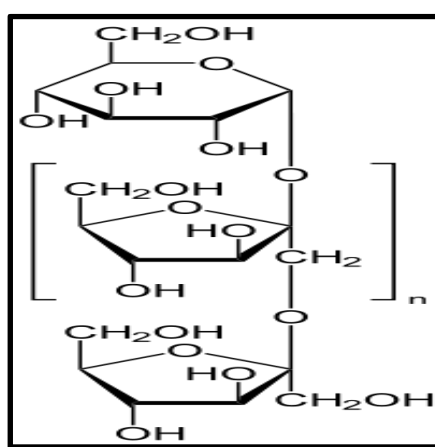


Figure 02: Structure de l'inuline (**Sako et al., 2011**).

I.4. Les mucilages :

Le mucilage est considéré comme un groupe d'hydrocolloïdes composés principalement de polysaccharides et de protéines qui interagissent fortement avec l'eau (**Malviya et al., 2011**). La composition des mucilages varie d'une plante à une autre ; ils sont généralement composés de monosaccharides et de polysaccharides pouvant être utilisés comme source de carbone par divers bactéries telles que le *Rhizobium* des légumineuses et *Pseudomonas Sp* (**Sun et al., 2011**).

Le mucilage est généralement localisé dans la paroi secondaire des couches externes des graines (**Daun et al., 2003**). Il représente environ 8% du poids totale de la graine. Il est facilement extrait par trempage dans l'eau. Plusieurs études ont démontré que le rendement d'extraction, la teneur en protéines ainsi que les propriétés physico chimiques dépendent à la fois de la procédure d'extraction et de la matière première utilisée (**Barbary et al., 2009**).

Les mucilages peuvent être employés dans les préparations d'aliments, produits pharmaceutiques et cosmétiques pour plusieurs applications telles que des modificateurs de

texture, épaississants, gélifiants, et agent de liaison (Deore *et Khadabadi*, 2008 ; Koocheki *et al.*, 2009 ; Lai *et Liang*, 2012).

I.5. Effets des prébiotiques

I.5.1. Effets entre les prébiotiques :

L'apport d'inuline et de FOS, chez l'adulte en raison de 10 g/jour, stimule la prolifération des bactéries lactiques, surtout des bifidobactéries, dans l'intestin. Selon Miller (1996) ces bactéries fermentent les fibres prébiotiques et les réduisent en acides gras à chaîne courte (acétate, butyrate, lactate et propionate). Le gradient osmotique dans le colon et donc la teneur en eau du contenu colique en sont augmentés, ce qui élève finalement le poids des selles et en ramollit la consistance (Schmelzle *et al.*, 2003).

En outre, le pH des selles est abaissé ce qui entraîne une meilleure solubilité des minéraux et des oligoéléments comme le calcium et le magnésium. Une étude clinique a démontré que l'absorption du calcium en est améliorée (Van den Heuvel *et al.*, 1999).

I.5.2. Effets de prébiotiques sur la flore intestinale :

Plusieurs évidences démontrent que l'administration des différents prébiotiques (inuline, fructo-oligosaccharides) induit une modification significative ($P < 0.05$) de la microflore intestinale, en augmentant le nombre de bifidobactéries et l'acide lactique (Bruzzese *et al.*, 2006). Bouhnik *et al.*, (2001) ont rapporté que l'ingestion de 10g de transgalacto-oligosaccharides pendant 21 jours stimule la croissance des bifidobactéries et augmente leur concentration au niveau du côlon ; elle n'a aucun effet sur les entérobactéries (Figure 03).

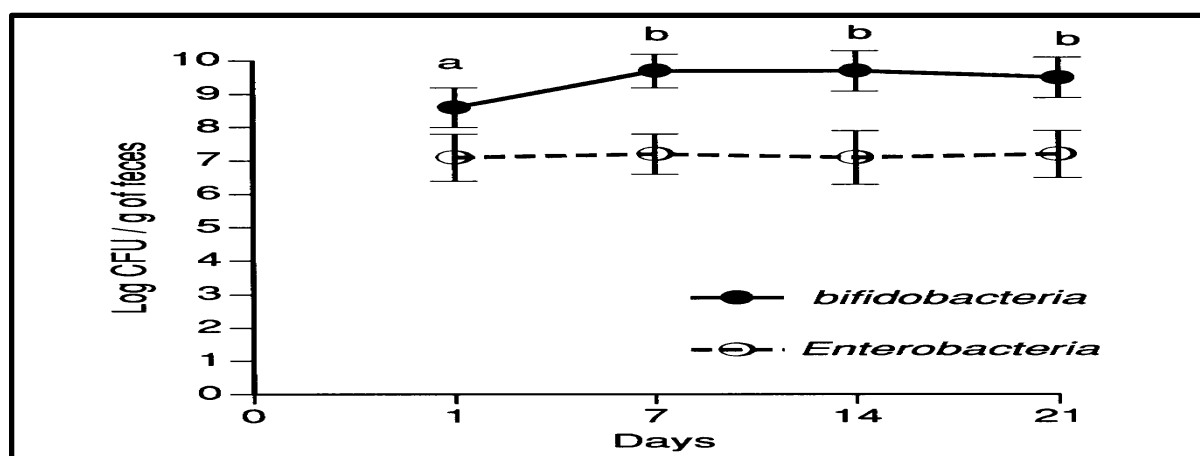


Figure 03 : Concentration des bifidobactéries et des entérobactéries dans les selles de volontaires après ingestion de transgalacto-oligosaccharides (Bouhnik *et al.*, 1997).

Les résultats indiquent que la concentration des bifidobactéries est significativement ($P < 0.05$) importante dans les 7^{ème}, 14^{ème}, et 21^{ème} jours en comparant avec le jour 1; elle est de $8,6 \pm 0,6$ log UFC/g dans le 1^{er} jour et de $9,7 \pm 0,6$ et $9,5 \pm 0,6$ dans les autres jours. Alors que la concentration des entérobactéries n'est pas affectée durant l'ingestion des transgalacto-oligosaccharides.

Des études ont prouvé qu'une combinaison d'inuline et d'oligofructose empêche le développement de la colite chez les animaux et une fois additionné avec un probiotiques, on constate une réduction de l'activité inflammatoire en raison de la diminution des cytokines pro-inflammatoires (Rowland, 1991).

I.6. Effets cliniques et mécanisme d'action de divers prébiotiques :

➤ Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne possible du prébiotique peut être due à la stimulation de la croissance des Bifidobactéries et des Lactobacilles. Ces bactéries peuvent renforcer la fonction de barrière de la muqueuse intestinale, aidant dans la prévention de l'attachement des bactéries pathogènes, essentiellement en les évinçant. Ces bactéries peuvent également produire des substances antimicrobiennes et stimuler des immuno-réactions spécifiques et non spécifiques d'antigène (Costalos *et al.*, 2008).

➤ Activité hypolipidémie :

Le prébiotique peut abaisser le taux des triglycérides, et également les niveaux totaux de cholestérol et de LDL-cholestérol. Le mécanisme de cet effet possible reste hypothétique. Le propionate, un produit de la fermentation d'oligosaccharide, peut empêcher la réductase de HMG-COA, limitant la synthèse du cholestérol (Hartemink, 1999).

➤ Prébiotiques et obésité :

Des travaux réalisés sur des souris rendues obèses par une alimentation riche en graisses ont démontré que plus le nombre de *Bifidobactéries*/g du contenu colique était élevé (effet prébiotiques), plus faible était l'augmentation du poids corporel et du tissu adipeux induits par le régime gras (Abrams *et al.*, 2007).

➤ **L'amélioration de l'absorption des minéraux :**

Les prébiotiques jouent un rôle important dans l'augmentation de l'absorption des minéraux, comme le montrent les résultats obtenus principalement dans des modèles animaux expérimentaux. Plusieurs études ont montré que l'absorption intestinale du calcium (Ca) et du magnésium (Mg) a été augmentée par l'utilisation de prébiotiques (**Boehm et Stahl, 2003**). Les données préliminaires ont montré que les fructanes à chaîne courte augmentent l'absorption de Mg, tandis que l'effet sur l'absorption du calcium est moins prononcé (**Bruzzese et al., 2006**).

I.7. Définition générale d'un probiotique

Les probiotiques sont des aliments qui contiennent des micro-organismes bénéfiques pour la santé (**Salminen et al., 1998**). Un probiotique est un complément alimentaire microbien vivant utilisé dans les produits laitiers fermentés et fromages qui affecte avantageusement l'hôte en améliorant l'équilibre microbien (**Garrote et al., 2001**). Sur la base des dernières avancées dans ce domaine, une définition révisée a été proposée: «Tout microorganisme vivant, une fois ingéré en une certaine quantité, exerce des effets bénéfiques au-delà des fonctions nutritionnelles de base » (**Salminen 1999 ; Gusils, 2002**).

Le kéfir est actuellement considéré comme un exemple de mélange de probiotiques de bactéries et de levures (**Rodrigues et al., 2005**).

Chapitre II

Le kéfir

II. Le kéfir

II.1. Définition et origine du kéfir :

Le kéfir est un lait fermenté originaire de l'Europe de l'Est, il est considéré comme étant le yaourt du 21^{ème} siècle (**Guzel, 2000**). Les informations sur les propriétés salutaires du kéfir et sa valeur nutritionnelle ont encouragé les consommateurs à l'accepter comme aliment adéquat et les fabricants à accroître sa production en raison de ses propriétés sensorielles uniques et de sa longue histoire, associées à ses effets bénéfiques sur la santé humaine (**Marshall, 1993 et Earnworth, 1999**). Le kéfir est produit à l'aide d'une microflore unique appelé grain de kéfir, de couleur blanche ou jaune, gélatineuse et de forme irrégulière (**Guzel-Seydim et al., 2000**). Les grains de kéfir renferment diverses espèces microbiennes : les Lactobacilles représentent la plus grande portion (65-80%) de la population microbienne et les Lactococcus et les levures constituent le reste des microorganismes présents dans le grain de kéfir (**Assadi et al., 2000**).

II.2. Grain du Kéfir :

Les grains de kéfir (**Figure 4**) ressemblent à de petits fleurons de chou-fleur : de 1 à 3 cm de longueur, lobés, de forme irrégulière et de couleur blanc à jaune, avec une texture ferme gluante (**Hosono et al., 1990**).

Ces grains doivent être entretenus d'une façon quotidienne pour maintenir leur viabilité en les transférant dans du lait frais chaque 20 heures afin de leur permettre de se développer et augmenter leur masse de 25% (**Libudzisz et Piatkiewicz, 1990**).



Figure 04 : Image de grain du Kéfir (**Semih et al., 2003**).

II.2.1. Composition microbienne des grains de kéfir :

Les grains de kéfir ont une composition microbiologique complexe et variable comprenant des espèces de levures et de bactéries lactiques représentées dans la figure 5, Les différents microorganismes et polysaccharide « *Kefiran* » qui composent les grains de kéfir ont été décrits comme une communauté symbiotique conférant des propriétés uniques au kéfir (Margulis, 1996).

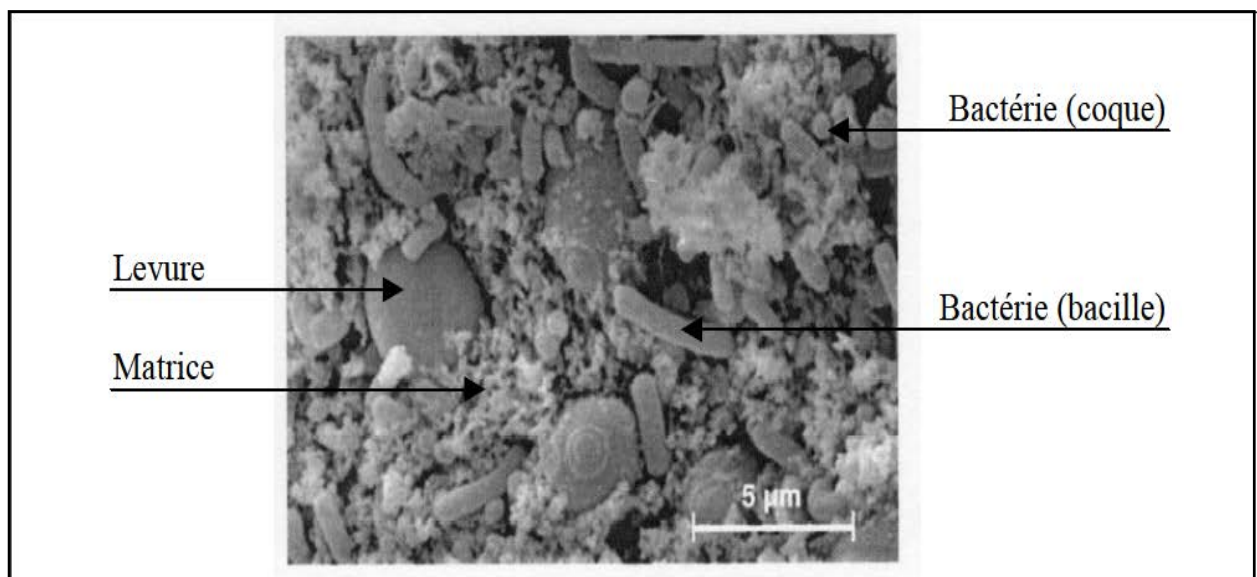


Figure 05 : Illustration des grains de kéfir en grossissement de 7000 X (Gusils *et al.*, 2002).

Les données de la bibliographie montrent que la composition microbienne des grains de kéfir diffère d'un auteur à un autre, cette diversité peut être due à la variabilité des sources de laits utilisés, l'origine des grains ainsi que la méthode de culture (Pintado *et al.*, 1996). Généralement les bactéries d'acide lactique sont plus nombreuses que les levures et les bactéries d'acide acétique dans les grains de kéfir (Guzel *et al.*, 2000). Le **tableau II** représente quelques exemples de bactéries et levures isolées dans le kéfir.

Tableau II : Quelques bactéries et levures présentes dans le kéfir

Bactéries	Levures
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus lactis cremoris</i>	<i>Saccharomyces florentinus</i>
<i>Lactobacillus casei subsp. casei</i>	<i>Saccharomyces pretoriensis</i>
<i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i>	<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>
<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Candida valida</i>
<i>Lactobacillus casei subsp.</i>	<i>Hanseniaspora yalbensis</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Candida lambica</i>
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	<i>Candida colliculosa</i>
<i>Lactobacillus keranofaciens</i>	<i>Toruspola delbruechii</i>
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Candida inconspicua</i>
<i>Lactobacillus collinoides</i>	<i>Candida magnoliae</i>
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<i>Candida famata</i>
<i>Lactococcus lactis subsp. Cremoris</i>	<i>Candida kefir</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp.</i>	<i>Kluyveromices lactis</i>

D'après Waldherr *et al.*, (2010).

Les interactions entre les différents éléments qui composent le kéfir sont complexes et ne sont pas encore totalement comprises par les microbiologistes qui s'y intéressent. Cependant, tous reconnaissent l'évident pouvoir probiotique du kéfir ainsi que ses multiples bienfaits sur la santé (Hallé *et al.*, 1994).

II.3. Les bienfaits du kéfir

II.3.1. Réparation de la Muqueuse Intestinale :

Le kéfir et les produits kéfirés jouent un rôle modulateur dans la formation des villosités (Goldman, 2000) et dans le mécanisme de communication croisée entre les bactéries symbiotiques et les cellules épithéliales (Cebra, 1999). Ils régénèrent donc rapidement la muqueuse intestinale et comme le kéfir possède un fort potentiel antioxydant (Fotouhinia *et al.*, 2001), la réparation ne laissera pas de dommages importants.

II.3.2. Intolérance au lactose :

La capacité du kéfir à améliorer la digestion a été démontrée chez les sujet adultes après incorporation de 20g de lactose et une quantité du kéfir, ce dernier contient une souche de bactéries probiotiques qui contribue à la décomposition du lactose présent dans le lait (**Diniz et al., 2003**).

II.4. Rôle préventif de kéfir:

II.4.1. Sur les radicaux libres :

La production endogène de radicaux libres est un phénomène "physiologique" et c'est lorsque la quantité libérée augmente et dépasse les mécanismes de protection qu'ils deviennent pathologiques. Le Kéfir contient des substances qui ont montré leurs efficacités sur la diminution des radicaux libres oxygénés tels que la vitamine E, vitamine A, Cuivre-Zinc, glutathion (**Bermond, 1991 ; Tison, 1992**). Le Kéfir contient surtout du *sélénio-méthionine* qui est un antioxydant n'existant pas sous forme libre dans les aliments et qui est synthétisé lors de la fermentation des grains (**Fotouhinia et al ., 2001**).

II.4.2. Sur les fonctions hépatiques :

Le Kéfir diminue le taux de cholestérol exogène circulant en limitant la formation des protéines de transport (**Vujcic, 1992**), il régule la fabrication de cholestérol endogène par action sur l'enzyme HMG COA (**Richardson, 1979**) et donc diminue la cholestérolémie. Le Kéfir améliore le cycle entéro-hépatique des sels biliaires et de ce fait limite l'obstruction de la voie biliaire (lithiase) (**Ward, 1987**). Mais le phénomène le plus intéressant est la suppression de l'*hypertension portale* qui a pour effet direct une meilleure circulation au niveau hépatique (**Nieper, 1985**) et pour effet indirect une amélioration des problèmes hémorroïdaires, variqueux et une diminution des troubles veineux (jambes lourdes, station debout prolongée) (**Rollan, 1991**).

II.5. Les Symbiotiques

II.5.1. Définition

Un symbiotique est un mélange de prébiotiques et de probiotiques, dans lequel le composé prébiotique soutient la croissance des microorganismes probiotiques ou d'autres bactéries bénéfiques pour l'hôte. Il est de plus en plus utilisé pour exprimer la relation synergique entre

les microorganismes bénéfiques et viables et leurs substrats sélectifs (**Francisco Guarner et al ., 2008**)

II.5.2. Intérêt des symbiotiques

L'intérêt d'utilisation d'un symbiotique est de favoriser la croissance des probiotiques par la fourniture de substrat spécifique pour la fermentation. En absence de ce dernier, d'autres bactéries se développeront au détriment des probiotiques en créant des conditions (pH, oxygène, température) défavorable à ces derniers (**Francisco Guarner et al ., 2003**).

Peu d'études ont été menées sur l'efficacité des symbiotiques (**Tableau III**) sur la santé. Les résultats restent limités et nécessitent de nouvelles enquêtes et études sur l'alimentation humaine.

Tableau III: Exemple d'études sur l'efficacité des symbiotiques

Symbiotique	Observations	Références
Inuline + <i>Bifidobacterium Sp,</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation supplémentaire du nombre de bifidobactéries. 	Bouhnik et al.,(1997)
<i>L. acidophilus</i> + 2,5% de FOS	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution des taux sériques de cholestérol. • Diminution des lipoprotéines de basse densité (LDL). 	Kieran et al.,(2003)
<i>L. acidophilus et B. longum</i> + FOS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Amélioration significative du rapport (LDL / HDL) cholestérol. 	Kieran et a.l.(2003)

Chapitre III
Les Composés
phénoliques

III. Les Composés phénoliques

III.1. Définition :

Les composés phénoliques, également dénommés polyphénols, sont des molécules spécifiques du règne végétal. L'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupements hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction (**Hennebelle *et al.*, 2004**). La figure 06 montre le mode d'action d'un composé phénolique sur un radical libre.

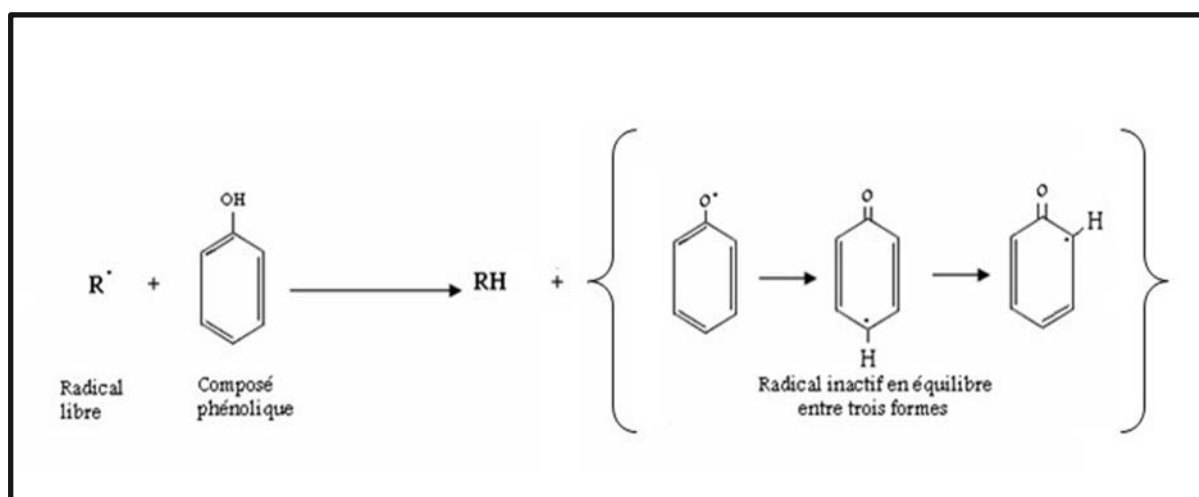


Figure 06: Mode d'action d'un composé phénolique (**Akiyama *et al.*, 2001** ; **Rodriguez-Vaquero *et al.*, 2007**).

III.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques se divisent en deux sous-catégories : les dérivés de l'acide benzoïque (acides protocatéchique, gallique, ...etc.) qui existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides et les dérivés de l'acide cinnamique (acides coummarique, caféique et férulique,) qui sont rarement présents à l'état libre et existent généralement sous forme d'esters (avec le glucose, l'acide tartrique,) ou de glycosides. Les structures des acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques sont représentées dans les figures 2 et 4 (**annexe 2**). (**Benbrook, 2005** ; **Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**). Les teneurs en acides phénoliques dans quelques légumineuses sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau IV : Teneurs en acides phénoliques dans quelques légumineuses (**Nick et al., 2010**).

Les acides phénoliques (Ug/100g poids frais)	La fève	Pois chiches	Lentilles	Haricots
<i>Acide caféique</i>	29.4	128.7	32.1	38.4
<i>L'acide chlorogénique</i>	16.0	87.9	----	----
<i>L'acide cinnamique</i>	22.8	35.3	----	10.3
<i>Acide coumarique</i>	40.0	----	33.6	88.1
<i>Acide p-coumarique</i>	32.0	90.4	70.8	86.1
<i>L'acide férulique</i>	44.5	125.7	36.3	229.6
<i>Acide gallique</i>	16.2	----	24.3	18.3
<i>p-hydroxybenzoïque</i>	15.8	27.5	17.0	29.9
<i>p-hydroxyphénylacétique</i>	9.7	----	8.9	11.3
<i>L'acide Phloretic</i>	14.0	----	16.3	17.2
<i>Acide protocatéchique</i>	8.8	----	30.0	14.8
<i>L'acide sinapique</i>	43.2	115.7	----	83.4
<i>L'acide vanillique</i>	14.1	56.9	16.4	15.7
<i>Somme des acides phénoliques</i>	306.5	668.1	285.7	657.2

III.1.2. les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les représentants les plus nombreux des composés phénoliques (plus de 5 000 molécules isolées) et sont quasiment universels chez les plantes vasculaires on les trouve dans les légumineuses. Ce sont des dérivés benzo- γ -pyranne, constitués de deux noyaux aromatiques (A et B) reliés par un hétérocycle oxygéné (C) (**figure 7**) les principaux groupes sont les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavanols, les isoflavones et les anthocyanidines (**Luthar, 1992 ; Škergeta et al, 2005**).

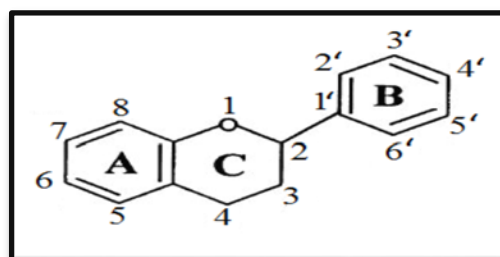


Figure 07 : Squelette de base des flavonoïdes (Ghedira, 2005).

Le tableau suivant représente les teneurs en flavonoïdes présents dans quelques légumineuses.

Tableau V : Teneur en flavonoïdes dans quelques les légumineuses (Nick *et al.*, 2010).

Les flavonoïdes (Ug/100g poids frais)	La fève	Pois chiches	Lentilles	Haricots
Catéchine	76.9	152.7	745.2	----
Chrysin	33.8	169.7	26.1	28.9
Epicatéchine	76.2	88.3	687.2	----
Genistein	21.7	91.7	20.5	26.7
Kaempférol	24.2	----	25.2	25.4
La quercétine	----	101.6	24.1	----
Somme des flavonoïdes	232.8	604.0	1528.3	81.0

III.1.3. Les Flavonols

Les flavonols sont les flavonoïdes les plus courants dans les aliments, la quercétine et le kaempférol étant largement les plus abondants (Manach *et al.*, 2004). Ces polyphénols sont presque toujours présents sous formes glycosylées.

IV.2.3. Les Tannins

Les tannins sont des composés à poids moléculaire élevé (500 à 3000 Da) contenant des groupes hydroxy phénoliques permettant des combinaisons stables avec les protéines, les polysaccharides, acides nucléiques et stéroïdes. Ils sont présents dans les feuilles, les fleurs et les graines des plantes (Hedqvist, 2004). Les tannins sont classés selon leur structure en deux groupes majeurs comme illustrés dans la **figure 8** : les tannins hydrolysables et les tannins

condensés (Özacar *et al.*, 2004).

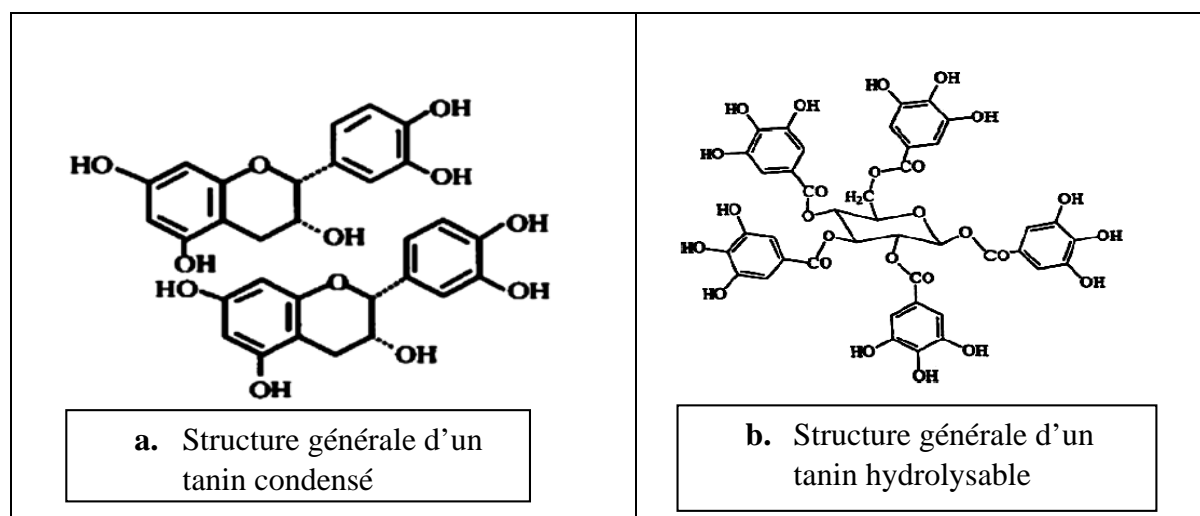


Figure 08 : Exemples de structures chimiques d'un tanin hydrolysable (b) et d'un tanin condensé (a) (Lorenz, 2011).

III.2. Propriétés biologiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques ont été en grande partie étudiés pour leur forte capacité antioxydante. Leur intervention se fait à différents niveaux : piégeage de radicaux libres, chélation de métaux et inhibition de certaines enzymes (Püssa *et al.*, 2008).

La relation entre la structure chimique des composés phénoliques et leur activité antioxydante a reçu un intérêt considérable dans la recherche. Il a été observé que l'activité antioxydante dépend essentiellement du nombre des radicaux hydroxyles et de leurs positions à l'intérieur de la structure des composés phénoliques (Derbel et Ghedira, 2005).

De plus en plus d'études indiquent que les polyphénols pourraient diminuer le risque de survenue d'un certain nombre de pathologies, en particulier celles liées au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives) (Leong et Shui, 2002 ; Derbel et Ghedira, 2005).

Les différentes propriétés biologiques des composés phénoliques sont représentées dans le tableau VI.

Tableau VI : Propriétés biologiques des composés phénoliques.

Composés phénoliques	Propriétés biologiques	Références
Les acides phénoliques	-Propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés. -Propriétés antitumorales, activités antioxydantes et antiradicalaires.	Ekoumou, (2003) Hennebelle <i>et al.</i>, (2004)
Flavonoïdes	-Prévention des cancers, inflammations et allergies. -Activité chélatrice des métaux. -Protecteurs vasculaires et veinotoniques. -Inhibent l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. - Activités antihypertensive, antibactérienne, antivirale et antihépatotoxique.	Curtay et Robin, (2000) Ekoumou, (2003) Jiangrong et Yueming, (2007)
Tannins	-Fonctions antibactérienne, antitumorales, antivirale et antimutagène. -Activités cardioprotectrice, anti-inflammatoire et anti-thrombotique.	Luthar, (1992) Derbel et Ghedira, (2005)

*Partie
pratique*

*Matériel et
méthodes*

I. Matériel végétal

I.1. Origine et provenance des Graines

2 graines de légumineuses, récolté en juin 2013 ont été utilisés :

- Fèverole « *Vicia faba minor* »: provenant de la wilaya de Skikda.
- Pois chiche « *Cicer arietinum* »: provenant d'Amizour (wilaya de Bejaia).

I. 1.2. Classification botanique des graines

Tableau VII : Classification systématique de *Cicer arietinum* et *Vicia faba minor* (Akroum, 2005).

	Pois chiche	Fevrole
Règne	Plantae	Plantae
Sous règne	Tracheobionta	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Sous classe	Rosidae	Rosidae
Ordre	Fabales	Fabales
Famille	Fabaceae	Fabaceae
Genre	Cicer	<i>Vicia L.</i>
Espèce	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Vicia faba L.</i>

I.1.3. Préparation des échantillons

Les graines de féverole ont été triées et séparées en téguments et cotylédons à l'aide d'un moulin de pierre traditionnel. Tous les échantillons de féverole (entières, cotylédons et téguments) et pois chiche ont été broyés au moyen d'un moulin à café électrique (de marque Moulinex), puis tamisés à l'aide d'une tamiseuse (Tap sieve shaker AS 200; Retsch GmbH, Haan) afin d'obtenir des particules de 500 µm de diamètre. Les poudres obtenues ont été conservées au réfrigérateur dans des sacs en plastiques hermétiques.

I.2. Extraction des mucilages

Les mucilages ont été extraits en utilisant la méthode décrite par **HadiNezhad *et al.*, (2013)**.

I.2.1. Extraction des mucilages bruts

Les poudres moulues ont été extraites avec de l'eau distillée (10 : 400, poids/volume), sous agitation pendant 3h à 60°C, les extraits ont été refroidis à température ambiante, puis centrifugés avec une centrifugeuse (Sigma Laborzentrifugen D-37520 Osterode Harz-Germany) à 4000 g pendant 20 minutes; les surnageants obtenus correspondent aux mucilages bruts.

I.2.2. Purification des mucilages

Pour obtenir le mucilage pur, une α -amylase et une protéase (10 μ L de chacune pour 50 ml d'extrait) ont été ajoutés au mucilage brut pour éliminer l'amidon et les protéines. L'extrait a été agité pendant 24h à 37°C, refroidi, centrifugé (Sigma Laborzentrifugen D-37520 Osterode Harz-Germany) à 2500 g pendant 20 minutes à température ambiante. Le surnageant a été dialysé avec une membrane (biotechnologique en ester cellulosique (EC) 3,5-5 kDa) pendant 6h avec de l'eau distillée comme solution de contre dialyse. Le mucilage pur a été rassemblé et conservé au réfrigérateur pour utilisation ultérieures.

I.3. Dosage des composés phénoliques des mucilages

I.3.1. Dosage des polyphénols totaux

a. Principe

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydo-réduction. Le réactif de Folin Ciocalteu, est un acide de couleur jaune, constitué de poly hétérocycles acides contenant du molybdène et du tungstène (**Gervaise, 2004**).

La méthode consiste à réduire le mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La présence de carbonates de sodium rend le milieu légèrement alcalin. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982**).

b. Mode opératoire :

La teneur en polyphénols totaux des extraits a été déterminée selon la méthode rapportée par **Hosseinian et Mazza (2009)**. 1 ml d'extrait a été additionné de 1,9 ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 1/10. Après 6 à 8 min, 1,9 ml de la solution de 60 g/l de carbonate de sodium (Na_2CO_3 à 7,5 %) ont été ajoutés, l'ensemble a été incubé à température ambiante (25C) pendant 2 heures à l'abri de la lumière. L'absorbance est ensuite lue à 725 nm.

Les teneurs en polyphénols totaux sont estimées en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique. Les résultats ont été exprimés en mg équivalent d'acide gallique (EAG) /g.

I.3.2. Dosage des flavonoïdes**a. Principe**

Le chlorure d'aluminium forme des complexes jaunâtres avec les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes comme le montre la **figure 9 (Ribéreau-Gayon, 1968)**.

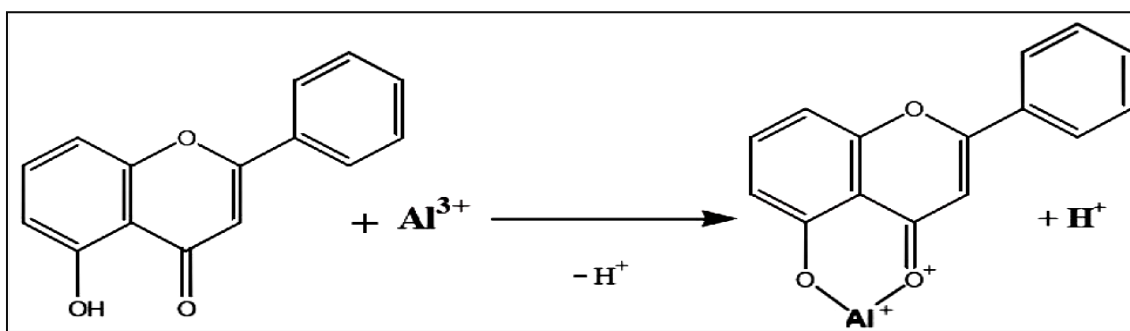


Figure 09 : Mécanisme de la réaction du chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

b. Mode opératoire :

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de **Djeridane et al. (2006)**.

Un volume d'extrait (1 ml) a été additionné du même volume de chlorure d'aluminium (AlCl_3 à 2 % dans le méthanol). L'absorbance du mélange a été mesurée à 410 nm après 10 min d'incubation.

Les concentrations en flavonoïdes ont été estimées en se référant à une courbe d'étalonnage préparée avec la quercétine (voir annexe 3). Les résultats ont été exprimés en

mg équivalent de quercétine (EQ) /g.

I.3.3. Dosages des flavonols

Le dosage des flavonols a été réalisé selon la méthode **d'Adedapo *et al.*, (2008)**. 1ml de chlorure d'aluminium (AlCl₃ 2 %) et 1,5 ml d'acétate de sodium (50 g / l) ont été ajoutés à 1 ml d'extrait. L'absorbance a été mesurée à 440 nm, après 2H 30 min d'incubation à T° ambiante.

Les concentrations en flavonols ont été estimées en se référant à la courbe d'étalonnage préparée avec la quercétine et les résultats exprimés en mg EQ /g.

I.4. Activités antioxydantes

I.4.1. Activité antiradicalaire en utilisant le DPPH

a. Principe

La molécule du 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre synthétique n'existant pas dans l'organisme (**Iqbal *et al.*, 2005**). Il est capable de capter un proton ou un électron (**Wang *et al.*, 2007 ; Hseu *et al.*, 2008**), afin de revenir à une molécule stable (**Gülçin *et al.*, 2003 ; Kumaran et Karunakaran, 2007**).

L'activité inhibitrice du radical DPPH est déterminée par la diminution de l'absorbance à 517 nm par sa réduction en présence d'un antioxydant (AH), responsable de la perte de la couleur violet foncé du DPPH (**Molyneux, 2004 ; Villaño *et al.*, 2007 ; Maisuthisakul *et al.*, 2008**), selon la réaction suivante :

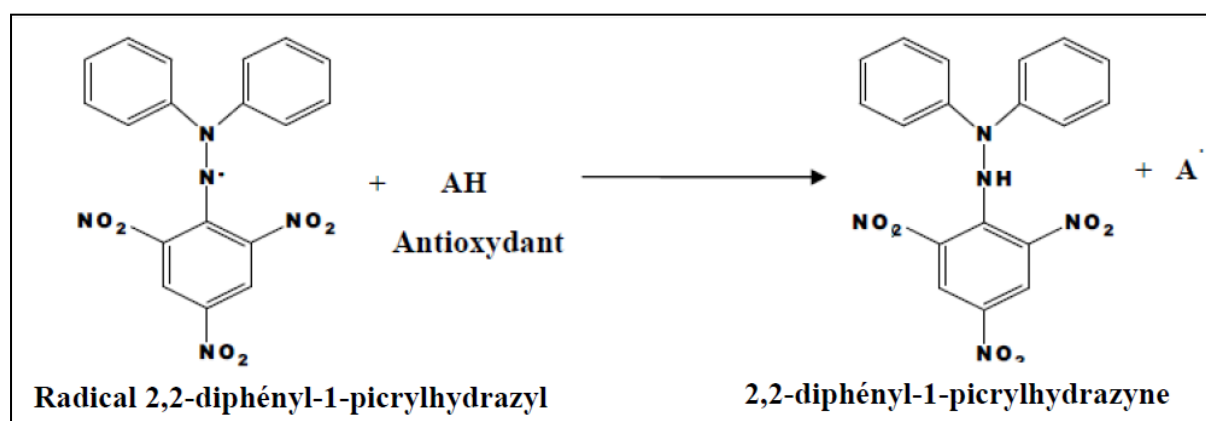


Figure 10 : Mécanisme réactionnel de la réduction du radical DPPH (**Molyneux, 2004**).

b. Mode opératoire :

L'activité antiradicalaire envers le radical DPPH a été mesurée selon la méthode de **brand- william (1995)**. 50 µl d'extrait ont été mélangés avec 1950 µl de la solution méthanolique du DPPH (65 µM/l) fraîchement préparée. Agitation au Vortex puis incubation à 30 min à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 515 nm.

$$\% \text{Inhibition} = \frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

- **Abs contrôle** : correspond à l'absorbance du contrôle

- **Abs échantillon** : correspond à l'absorbance de l'échantillon

Ainsi plus la perte de couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un Antioxydant fort.

I.4.2. : Pouvoir réducteur**a. Principe**

Le pouvoir réducteur est estimé par l'aptitude des antioxydants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) du complexe ferricyanure en fer ferreux (Fe^{2+}). La forme réduite de ce complexe donne une couleur verte qui est proportionnelle aux concentrations des extraits (**Öztürk et al., 2007**).

b. Mode opératoire :

Le pouvoir réducteur a été estimé selon la méthode décrite par (**Li et al., 2009**) . 200 µl d'extrait a été additionné de 500 µl de tampon phosphate à 0,2M, pH 6,6 et de 500 µl de solution aqueuse de ferricyanure de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$]. Après agitation, l'ensemble a été incubé à 50°C pendant 20 min, puis 500 µl de trichloracétique (TCA 10 %) ont été ajoutés. Centrifugation à 500 tr/min pendant 10 min. 1 ml de surnageant a été prélevé est dilué dans 1 ml d'eau distillée puis 200 µl de chlorure ferrique (0,1 % P/V) ont été additionnés. L'absorbance a été mesurée à 700 nm.

Le pouvoir réducteur a été déterminé en se référant à la courbe d'étalonnage préparée avec l'acide ascorbique (voir annexe 3). Les résultats ont été exprimés en mg équivalent d'acide ascorbique (EAA) /g.

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif.

I.5. Activité prébiotiques

I.5.1. Préparation du kéfir

Nous avons suivi la méthode décrite par **HadiNejad et al., (2013)**.

Du lait Tchic Lait Candia (3.5% de matière grasse) a été pasteurisé à 85°C pendant 15 mn sur une plaque chauffante puis refroidi dans un bain marie à 42°C (**Espírito Santo et al., 2010**). Une partie aliquote a été transférée dans des tubes stériles de 50 ml. La culture lyophilisée de kéfir (kéfir-type B-hétérofermentatif culture sans production de CO₂, contenant *Lb. lantarum* and *Lb. rhamnosus*, *Lactococcus lactis* and *L. cremoris*, and *Leuconostoc cremoris*, biasa Inc., Saint Hyacinthe, Québec, Canada) a été additionnées à 2g/L de poudre du kéfir. 10 ml des mucilages et d'inuline ont été additionnés à 40ml de lait comme décrit dans le tableau VIII. Les lots de kéfirs ont été préparés en triples et incubés à 42 °C pendant 24h puis stockés à 4 °C pendant 28 jours.

Tableau VIII : Formulations différentes de kéfir et leur codage

Code	Ingrédients exprimés par 1 Litre de lait			
	Poudre de kéfir	Inuline (ml)	Mucilage pur	-
K+Mp Fe	2	-	10	-
K+Mp Cf.	2	-	10	-
K+Mp Tf	2	-	10	-
K+Mp PC	2	-	10	-
K+In	2	10	-	-

K: Kéfir type B –hétérofermentative culture ; **In** : Inuline ; **Fe** : Féverole entière;
Cf : Cotylédon de féverole; **Tf** : Tégument de féverole ; **MP** : Mucilage pur ; **Pc** : pois chiche

I.5.2. Analyses microbiologiques

Le dénombrement des colonies (détermination en triple) a été effectué au 1^{er}, 7^{ème}, 14^{ème}, 21^{ème} et 28^{ème} jour pour chaque lot à différentes dilutions (quatre à cinq séries de dilutions de

1/10). 100 μ l de chacune des trois dernières dilutions ont été étalés par la méthode des stries sur des boîtes de Pétri contenant la gélose MRS puis incubées à 40°C pendant 48h.

Le nombre de colonies a été converti en log UFC/ml.

I.5.3. Analyses physico-chimiques des kéfirs

I.5.3.1. Mesure du pH

➤ **Principe :**

Le pH par définition est une mesure de l'activité des ions H⁺ contenus dans une solution.

Les valeurs du pH ont été mesurées avec un pH mètre 211 HANNA.

I.5.3.2. Mesure de l'acidité

➤ **Principe**

L'acidité titrable représente la somme des acides minéraux et organiques présents dans le produit. Elle a été exprimée en fonction de l'acide dominant et titrée avec une solution d'hydroxyde de sodium 0.1N en présence de la phénolphthaléine comme indicateur coloré.

➤ **Mode opératoire**

Dans un bécher, 1ml de kefir a été additionné de 9 ml d'eau distillée (**10⁻¹**), quelques gouttes de phénolphthaléine ont été ajoutées à l'aide d'une pipette en plastique. Suivi d'une titration avec la solution NaOH (0,1N) jusqu'à la persistance de la couleur rose et noter le volume du NaOH.

Le volume de l'acidité titrable est calculée chaque semaine jusqu'au 28^{ème} jour.

➤ **Expressions des résultats**

L'acidité titrable (TTA%) a été exprimée en pourcentage, et calculée selon la formule :

$$\text{TTA}(\%) = V_{\text{NaOH}} \times 0,1 \times 100 \times 0,009 \times 10$$

Où :

V_{NaOH} : Volume de NaOH en ml utilisé pour la titration.

0,1 : représente la concentration du NaOH (0,1N).

10 : est le facteur de dilution (10⁻¹).

100 : le pourcentage.

0.0090 : Coefficient correspondant à l'acide lactique.

I.6. Extraction des composés phénoliques des kéfirs

Nous avons suivi la méthode décrite par **Pereira *et al.*, (2013)**. 1ml de kéfir a été extrait avec 20 ml d'éthanol-eau (80 : 20 , v/v) sous agitation à 25 °C pendant 1 h suivi d'une centrifugation (Sigma Laborzentrifugen D-37520 osterode Harz-Germany) à 4000 g pendant 10 min. Après filtration sur papier Whatman n° 2, le surnageant est récupéré puis stocké à 4°C.

I.7. Analyse statistique

Toutes les données représentent la moyenne de trois essais. L'analyse statistique des résultats est effectuée avec l'application de l'analyse de la variance (ANOVA) à l'aide des logiciels (STATISTICA 5.5 et Graph Pad prism 5.0) et la comparaison des données est prise à la probabilité $P < 0,05$.

*Résultats et
discussions*

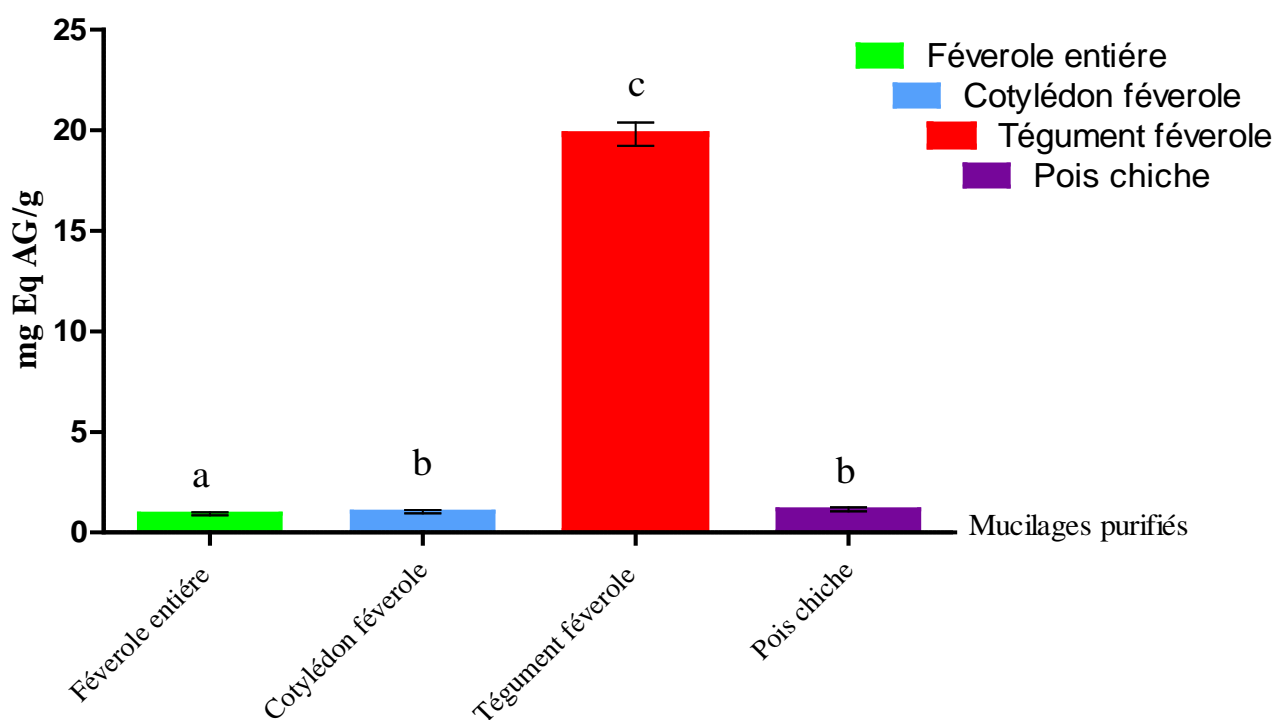
II. Résultats et Discussions

II.1. Dosage des composés phénoliques

II.1.1. Les polyphénols totaux :

Les résultats de dosage des composés phénoliques (PTS) révèlent une variabilité de teneur entre les différents mucilages. L'analyse de la variance des teneurs montre un effet significatif ($P < 0,05$). La **figure 11** montre que le mucilage de féverole présente une teneur de (19,80 mg Eq AG/g), plus élevée ($P < 0,05$) que celle du pois chiche (1.15mg Eq AG/g).

La répartition des PTS des mucilages entre les différents compartiments de la graine de féverole est inégale ; le Tégument est plus riche en PTS avec 19.8mg Eq AG/ g, en comparaison à la graine entière (0.93 mg Eq AG/g) et cotylédon (1.03mg Eq AG/g).



Des lettres différentes indiquent des résultats significativement différents ($P < 0,05$).

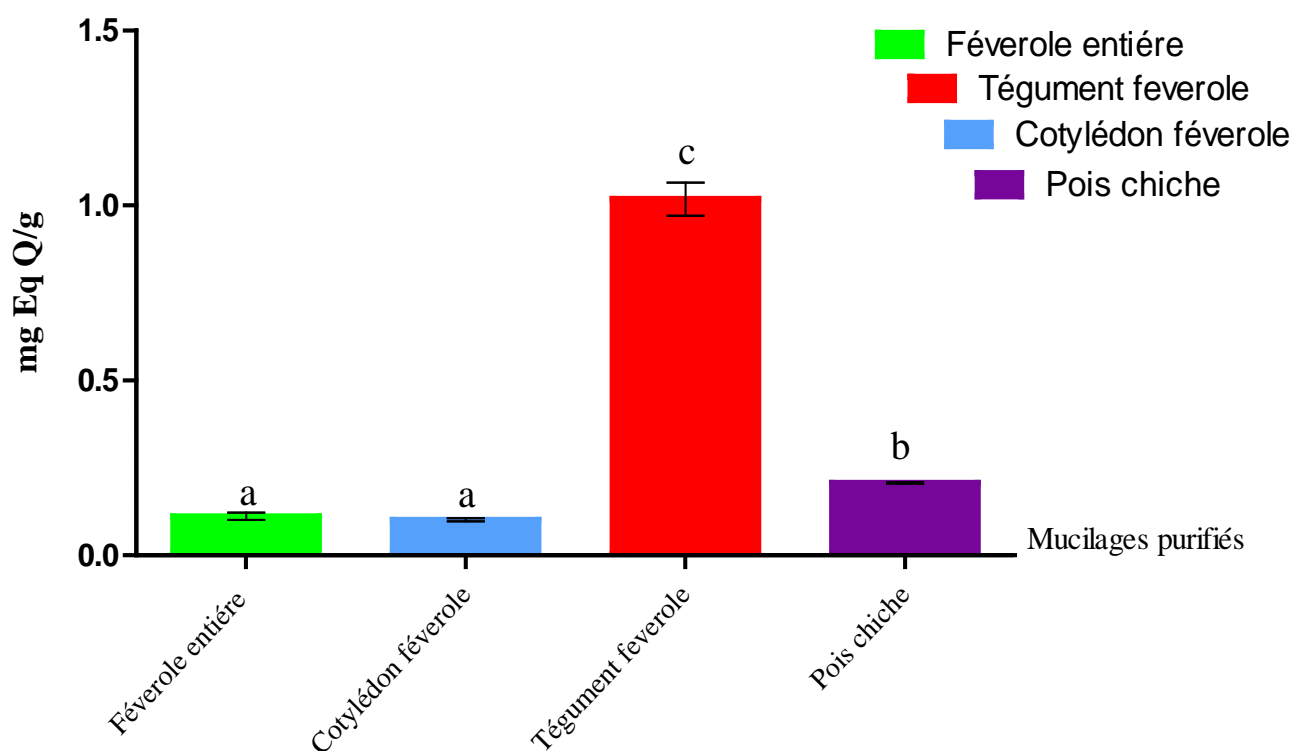
Figure 11 : Teneurs en polyphénols totaux dans le mucilage purifiés.

II.1.2. Teneur en flavonoïdes

La figure 12 montre une variabilité significative ($P < 0.05$) de la teneur en flavonoïdes des différents mucilages testés.

Le mucilage de pois chiche présente une teneur en flavonoïdes (0.2 mg Eq Q/g) plus élevée que la fèveole (0.1 mg Eq Q/g soit une augmentation de 2%).

La distribution des flavonoïdes dans les compartiments de la fèveole montre que le tégument renferme la teneur la plus élevée (1.07 mg Eq Q/g), suivi de la fraction entière (0.12 mg Eq Q/g) et du cotylédon (0.1 mg Eq Q/g).

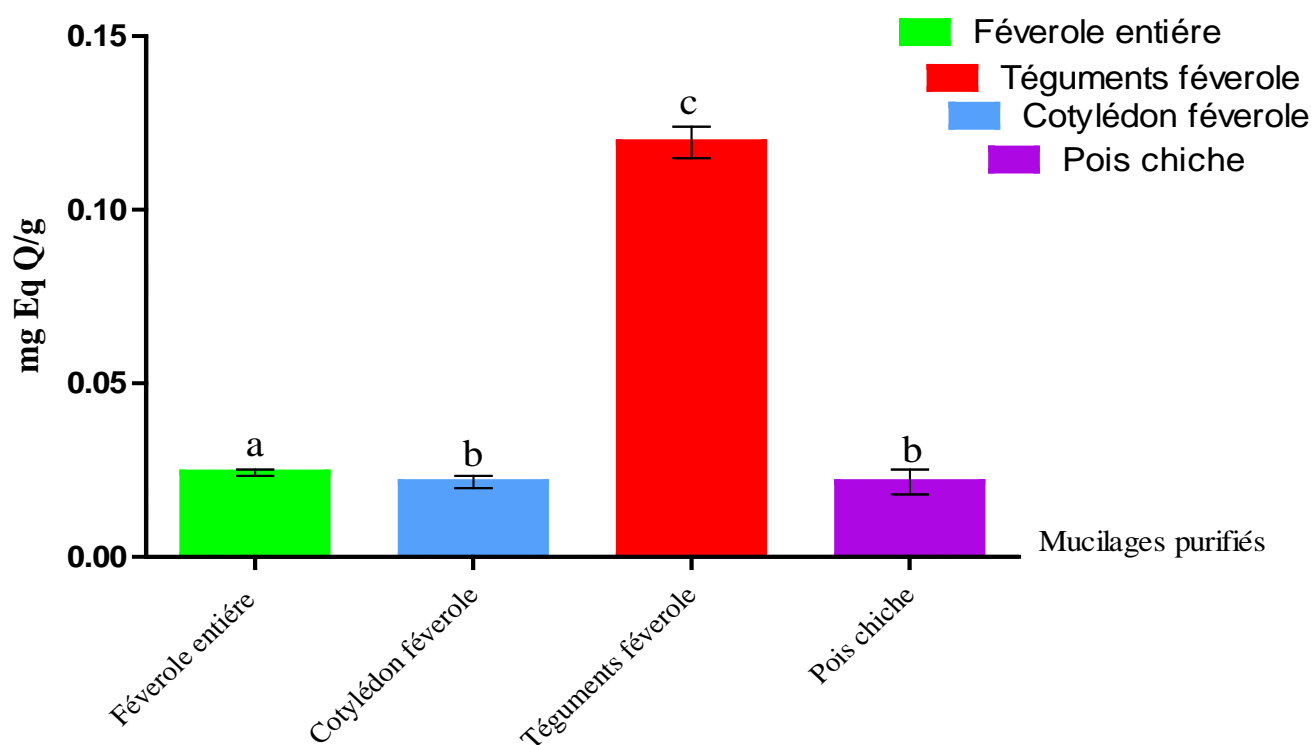


Des lettres différentes indiquent des résultats significativement différents ($P < 0,05$).

Figure 12 : Teneur en flavonoïdes des extraits de mucilage purifiés.

II.1.3 Les flavonols

Les teneurs en flavonols des échantillons analysés varient significativement ($P < 0,05$) selon le mucilage considéré (**figure 13**).



Des lettres différentes indiquent des résultats significativement différents ($P < 0,05$).

Figure 13 : Teneur en flavonols des extraits de mucilage purifiés.

Les résultats montrent que la féverole présente une teneur plus élevée en flavonols (0.19mg Eq Q/g) que le pois chiche (0.02mgEqQ/g).

Les flavonols du mucilage de féverole sont principalement localisés dans le tégument (0.19mg Eq Q/g), et la teneur la plus faible est relevée dans le mucilage du cotylédon (0.024mg Eq Q/g).

II.2. Activités antioxydantes des mucilages purifiés

II.2.1. l'activité antiradicalaire DPPH

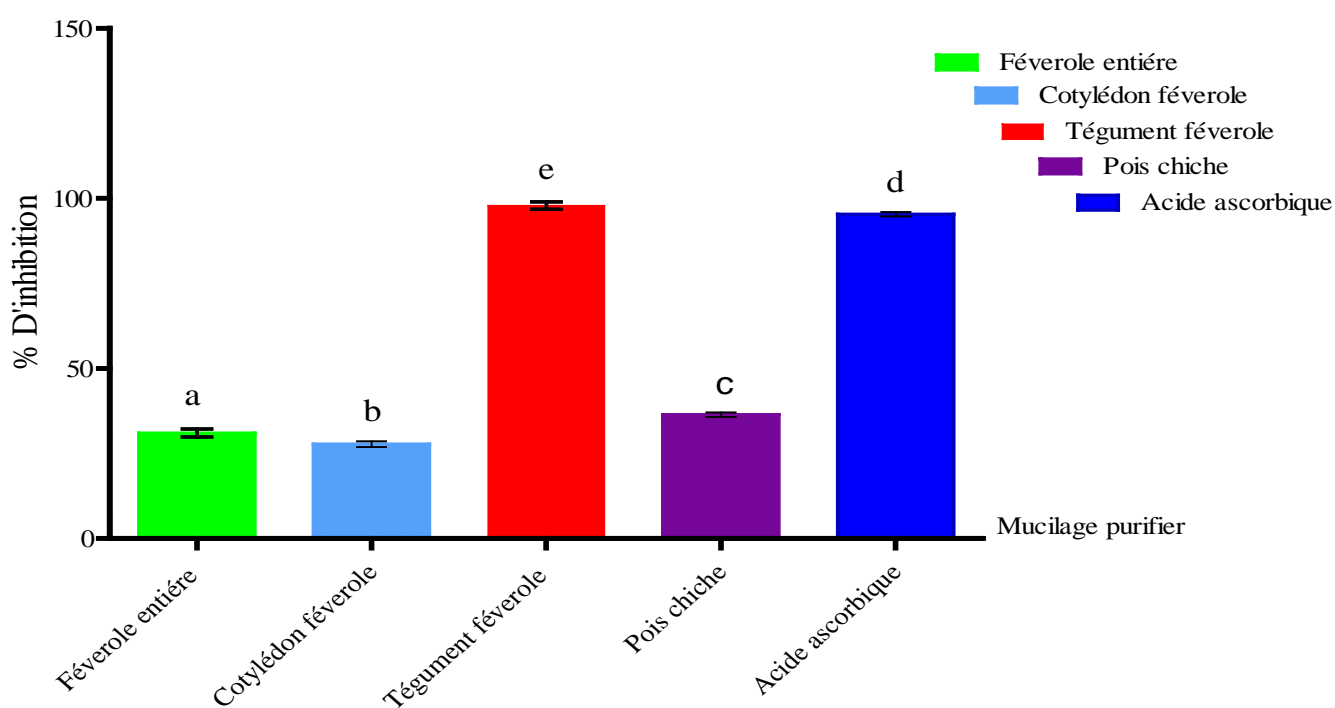
Tous les mucilages possèdent une activité anti radicalaire contre le radical DPPH avec des différences significatives ($P < 0,05$) entre les différents échantillons (**figure 14**) cette activité varie entre 97.86 et 27.74% d'inhibition du DPPH.

Le mucilage de féverole présente un taux d'inhibition (31.02%) inférieur à celui du pois chiche (36.4%).

A l'opposé des autres mucilages, nous notons que seul le mucilage de tégument de féverole affiche une activité scavenger (97.86%) plus élevée que celle de l'acide ascorbique (95.34%) pris comme standard (0.1mg/ml).

Pour la féverole décortiquée c'est le tégument qui présente le taux d'inhibition le plus élevée (97.86%), suivie de la fraction entière 31.27% et du cotylédon (27.74%).

Cependant tous nos extraits présentent une activité anti radicalaire inférieure à celle de l'acide ascorbique à l'exception du mucilage de tégument de féverole.



Des lettres différentes indiquent des résultats significativement différents ($P < 0,05$).

Figure 14 : Activité antiradicalaire du DPPH des mucilages.

Nos résultats indiquent l'existence de corrélation positive entre les teneurs en nos composés phénoliques et l'activité anti radicalaire résumée dans le tableau IX. Les PTS contribue à 88.17%, les flavonoïdes 81.36% et les flavonols 89.87% à l'inhibition du radical DPPH.

Tableau IX: Coefficients de corrélations entre les Polyphénols totaux, Flavonoïdes, Flavonols et l'activité anti radicalaire.

	PTS	Flavonoïdes	Flavonols
DPPH	0,939*	0,902**	0,948*

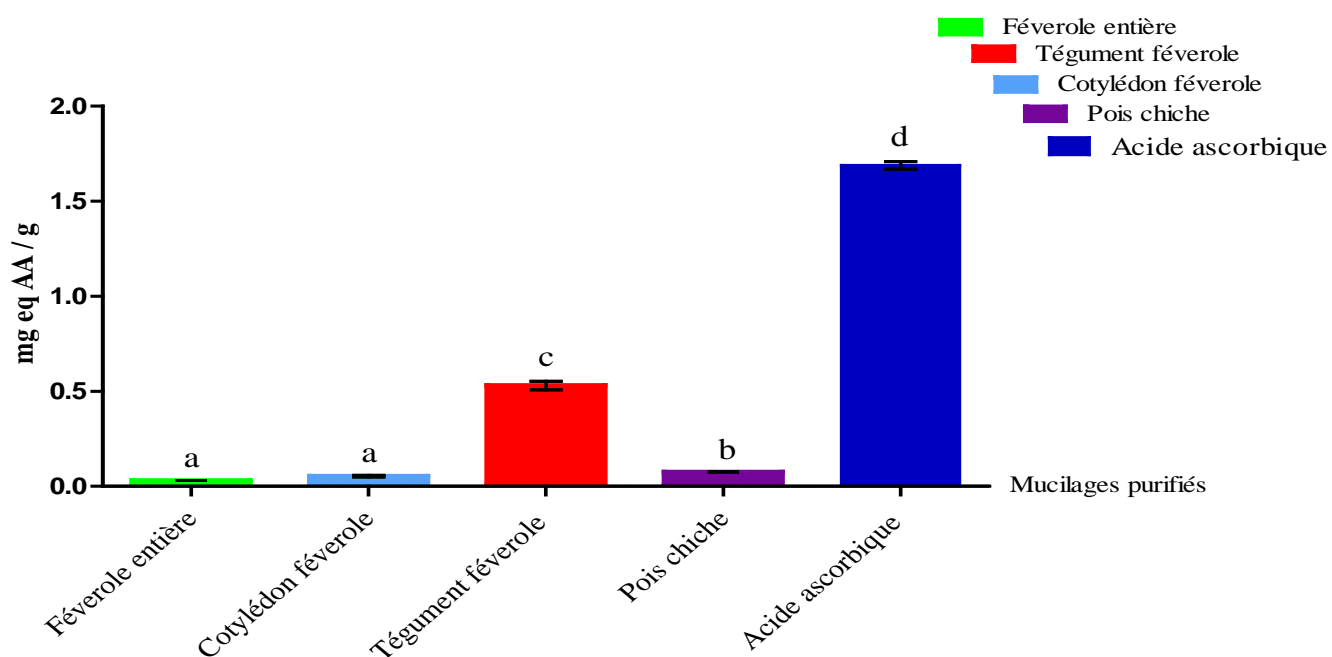
* : Corrélation significative, ** : Corrélation hautement significative. *** : Corrélation très hautement significative

II.2.2. Pouvoir réducteur

Les résultats rapportés dans la **figure 15** montrent des différences significative ($P < 0.05$) entre les échantillons.

Tous nos échantillons présentent un pouvoir réducteur inférieur à celui de l'acide ascorbique.

Le mucilage de féverole présente un pouvoir réducteur plus élevée (0.53 mg Eq AA/g) que le mucilage de pois chiche (0.075 mg Eq AA/g). Le mucilage de tégument de féverole affiche le pouvoir le plus élevé (0.53 mg Eq AA/g) alors que celui de la féverole entière (0.031 mg Eq AA/g) manifeste la plus faible activité.



Des lettres différentes indiquent des résultats significativement différents ($P < 0,05$).

Figure 15 : Pouvoir réducteur des mucilages purifiés.

L'analyse de la régression linéaire entre les différentes classes phénoliques et le pouvoir réducteur indique l'existence de corrélations positives (**tableau X**). Les PTS contribuent à 99.40%, les flavonoïdes 99.40% et les flavonols 95.02% à la réduction du fer ferreux.

Tableau X : Coefficients de corrélations entre les Polyphénols totaux, Flavonoïdes, Flavonols et pouvoir réducteur.

	PTS	Flavonoïdes	Flavonols
Pouvoir réducteur	0,997**	0,997**	0,995**

* : Corrélation significative.

** : Corrélation hautement significative.

*** : Corrélation très hautement significative

Les graphes de corrélation sont illustrés dans l'annexe 5

II.3. Discussion générale

Notre travail traite de la comparaison des teneurs en composés phénoliques des mucilages de *Cicer arietinum* et *Vicia faba minor*. Dans une deuxième étape nous nous sommes intéressés à la répartition des composés phénoliques dans la fève décortiquée.

Les teneurs révélées lors de nos dosages varient d'un échantillon à un autre et il est difficile de les comparer aux données de la littérature vu l'absence de données sur les mucilages de nos deux graines et l'effet de différents autres facteurs ; la composition du végétal lui-même.

Les mucilages ont été obtenus par diffusion dans l'eau des polysaccharides de légumineuses utilisés. Ces dernières sont connus pour être riches en composés phénoliques (**Durazzo et al., 2013**) ainsi que leurs mucilages dans notre cas et soluble dans l'eau comme le soulignent **Chirinos et al., (2007)**. Ainsi il est naturel de les retrouver dans les extraits aqueux.

Nos données révèlent d'une part que le mucilage de fève est plus riche en composés phénoliques que le mucilage du pois chiche ; de même pour la fève décortiquée, c'est le mucilage de tégument qui est le plus pourvu en ces composés.

Des travaux de différents auteurs sur ces deux graines **Khalil et Mansour (1995)**, **Ghedira (2005)** et **Chaieb et al., (2011)**, confirment la plus grande richesse de la féverole en composés phénoliques comparé au pois chiche. Nos observations s'accordent avec les données de **Wang et al., (2009)**, **Chaieb et al., (2011)** et **Oomah et al., (2011)** qui notent une localisation des composés phénoliques de la féverole essentiellement au niveau des téguments.

Les flavonoïdes sont diversement présents dans les quatre mucilages testés. Il est connu que la solubilité de ces derniers dépend du nombre, du type et de la position de la liaison des glucides avec les flavonoïdes (**Lapronik et al., 2005**).

Nos données analytiques montrent que nos mucilages possèdent une activité anti radicalaire contre le radical DPPH et une bonne capacité à réduire le fer ferreux. **Boudjou et al., (2013)** et **Dazzou et al., (2013)** ont rapportés que les graines de féverole et pois chiche présentent une forte activité antioxydante respectivement.

Le test DPPH est incontestablement la principal méthode utilisée pour évaluer l'activité anti radicalaire des polysaccharides naturels (**Elaboutachfaiti et al., 2011; Delattre et al., 2015**) En règle générale il a été rapporté que l'activité anti radicalaire DPPH des antioxydants des polysaccharides est clairement corrélée à leur capacité à donner de l'hydrogène (**Delattre et al., 2015**).

Le pouvoir réducteur est la capacité que possède un extrait à donner un électron et à réduire le fer. De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme indicateur significatif de son pouvoir antioxydant (**Tepe et al., 2005**).

Le pouvoir réducteur des différents extraits peut être attribué principalement aux composés bioactifs associés à l'activité antioxydante tels que les composés phénoliques totaux, les flavonoïdes et autres antioxydants hydrophiles qui sont de bons donneurs d'électrons et peuvent terminer la chaîne de réaction de radicaux libres par conversion de ces derniers en produits plus stables (**Yen et al., 2008**).

Les différences d'activités entre les mucilages testés traduisent des différences quantitatives et qualitatives des composés phénoliques solubilises dans les mucilages (**Chew et al., 2011**).

Les polyphénols totaux, flavonoïdes et flavonols présents dans les mucilages semblent contribués d'une façon hautement significative ($P < 0.01$) à l'activité antioxydante (activité anti radicalaire et pouvoir réducteur). Nos résultats indiquent également l'existence d'une corrélation significative $r = 0,896$; $0,01 < P < 0,05$ entre les deux activités.

II.4. Activité prébiotique :

II.4.1. Evolution du pH

La **figure 16** illustre l'évolution des pH des kéfirs au cours des 28 jours de stockage à froid. L'analyse statistique des résultats obtenus montre un effet significatif ($p < 0,05$) des facteurs mis en jeu dans notre essai.

L'addition des mucilages s'accompagne d'une baisse de pH dès le 1^{er} jour. Les baisses les plus importantes sont notées pour les kéfirs à l'inuline et au mucilage du tégument de féverole.

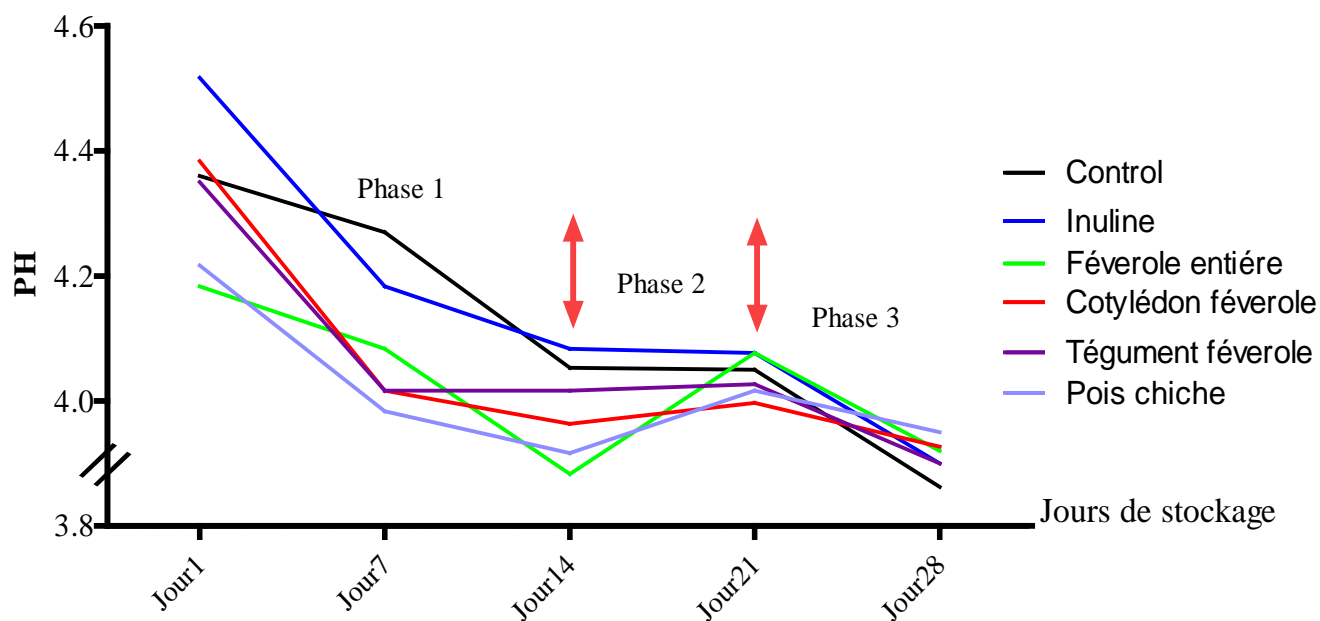


Figure 16: Evolution du pH en fonction du temps de stockage à froid.

Au cours du stockage le pH des différents échantillons diminue d'une semaine à une autre. L'analyse de nos données décrit 3 phases :

- Une première phase au cours de laquelle le pH accuse une forte baisse (0.78 à 7.75%) et qui s'établit pendant les deux premières semaines.

- La deuxième phase se caractérise par une augmentation variable du pH : forte augmentation pour les kéfirs à mucilage de graines entière (féverole entière et pois chiche) et très faibles pour les autres kéfirs.
- La troisième phase se caractérise par une forte baisse du pH variant de (0.17 à 4.39 %) durant la dernière semaine au stockage à froid.

La comparaison multiples de moyennes enregistrées montre des différences significatives entre échantillons et détermine des groupes homogènes (**Annexe 4**).

II.4.2. Evolution de l'acidité titrable

La **figure 17** montre l'évolution de l'acidité titrable des kéfirs pendant la période de stockage à froid. Tous les kéfirs montrent des différences significatives ($p < 0.05$) en fonction des jours.

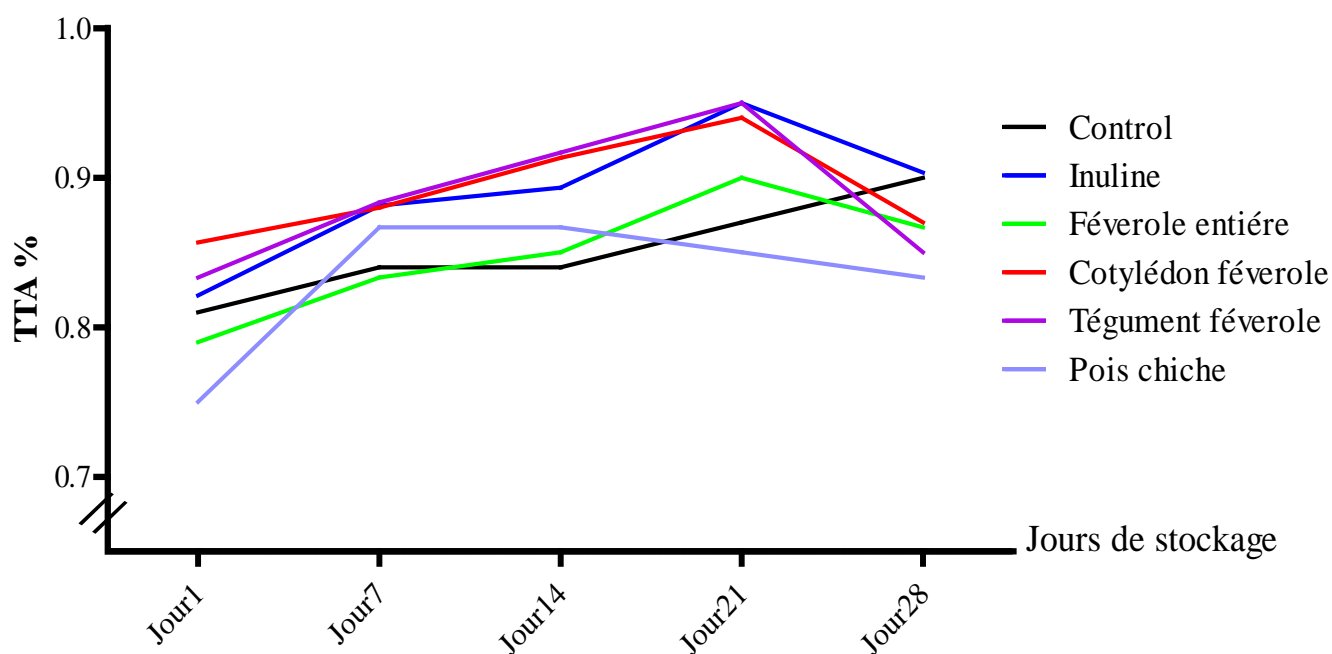


Figure 17: Evolution de l'acidité titrable totale en fonction de temps de stockage à froid.

L'incorporation de mucilage de légumineuses s'accompagne dans le 1^{er} jour d'une évolution de l'acidité. Cette évolution se produit à deux temps :

Dans un premier temps, nous observons une forte augmentation allant de 3.77 à 36.59%. Pendant cette phase, les échantillons avec mucilages et inuline manifestent des augmentations

variables par rapport au control. Les valeurs maximales de l'acidité sont atteintes au 21^{ème} jour de stockage avec des augmentations de 18.75 à 25.53%.

Nous notons dans la deuxième étape une diminution de l'acidité du jour 21 au jour 28 qui varie de 3.85 à 16.07%. Au cours de cette phase, le témoin manifeste une plus faible diminution comparativement aux échantillons avec mucilages et inuline.

Le pois chiche et l'inuline affichent les plus fortes diminutions des concentrations en acide lactique : 3.85 et 16.07% respectivement, durant le temps de stockage.

L'analyse comparative des moyennes révèle des différences significatives entre elles ($p < 0,05$). Les groupes homogènes sont résumés dans l'annexe 4.

II.4.3. Croissance et viabilité des colonies :

Les différents résultats de dénombrement bactérien totale (log ufc / ml) dans des échantillons de kéfir sont résumés par la **Figure 18**.

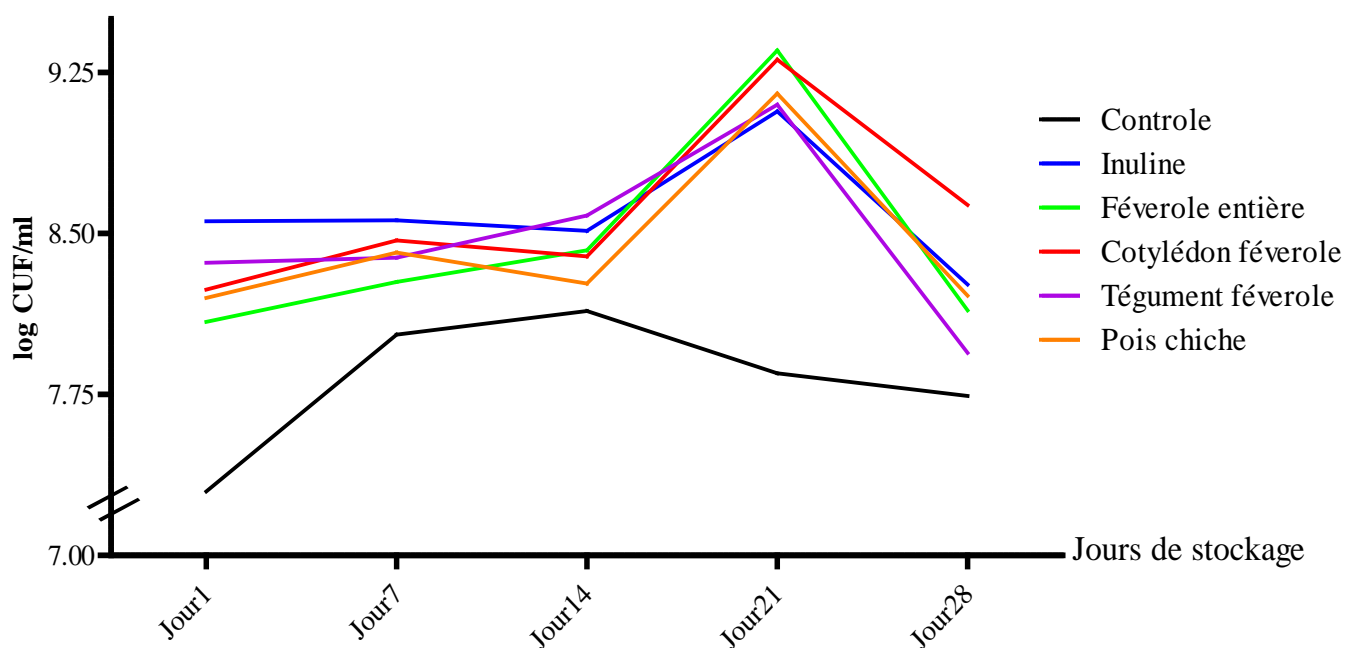


Figure 18 : Evolution des colonies des kéfirs purs en fonction de temps de stockage.

L'analyse statistique des résultats obtenus montre un effet significatif ($p < 0,05$) des facteurs mis en jeu dans notre essai aux cours des jours 1, 7, 14, 21 et 28. Les groupes homogènes sont résumés dans **l'annexe 4**.

Au jour 1, le nombre de bactéries varie entre 8,3 et 8,6log ufc/ml pour tous les échantillons. Tous les échantillons de kéfir supplémentés en prébiotique (mucilage ou inuline) ont montré une augmentation progressive (0.06 à 2.8%), au cours de la première semaine ; le contrôle affiche par contre une forte augmentation (5.37%).

Au cours de la deuxième semaine, nous notons des différences de comportement des différents kéfirs. Le contrôle se caractérise par une diminution du nombre de colonie alors que les kéfirs supplémentés en pois chiche, inuline et mucilage de cotylédon de féverole voient diminuer le nombre de colonie. Les kéfirs renfermant les mucilages de fève entière et de tégument de féverole affichent en revanche une augmentation (0.06 à .037%) de nombre de colonies.

Pendant la troisième semaine, à l'exception du kéfir contrôle, tous les kéfirs supplémentés en prébiotiques présentent une teneur notable de la viabilité des probiotiques.

L'optimum de croissance des bactéries probiotiques est ainsi atteint à 21^{ème} jour de stockage. En effet de 21 à 28^{ème} jours, la viabilité des bactéries diminue de 19.9 à 22.31%.

II.5. Dosages des composés phénoliques des kéfirs

L'analyse statistique des résultats obtenus montre un effet significatif ($p < 0,05$) des facteurs mis en jeu dans notre essai aux cours des jours 1, 7, 14, 21 et 28. Les groupes homogènes sont résumés dans **l'annexe 4**.

Les résultats de dosage des composés phénoliques dans les extraits phénoliques de nos kéfirs montrent une variabilité de teneurs entre les différents échantillons aux cours des jours de stockage **figure 19**.

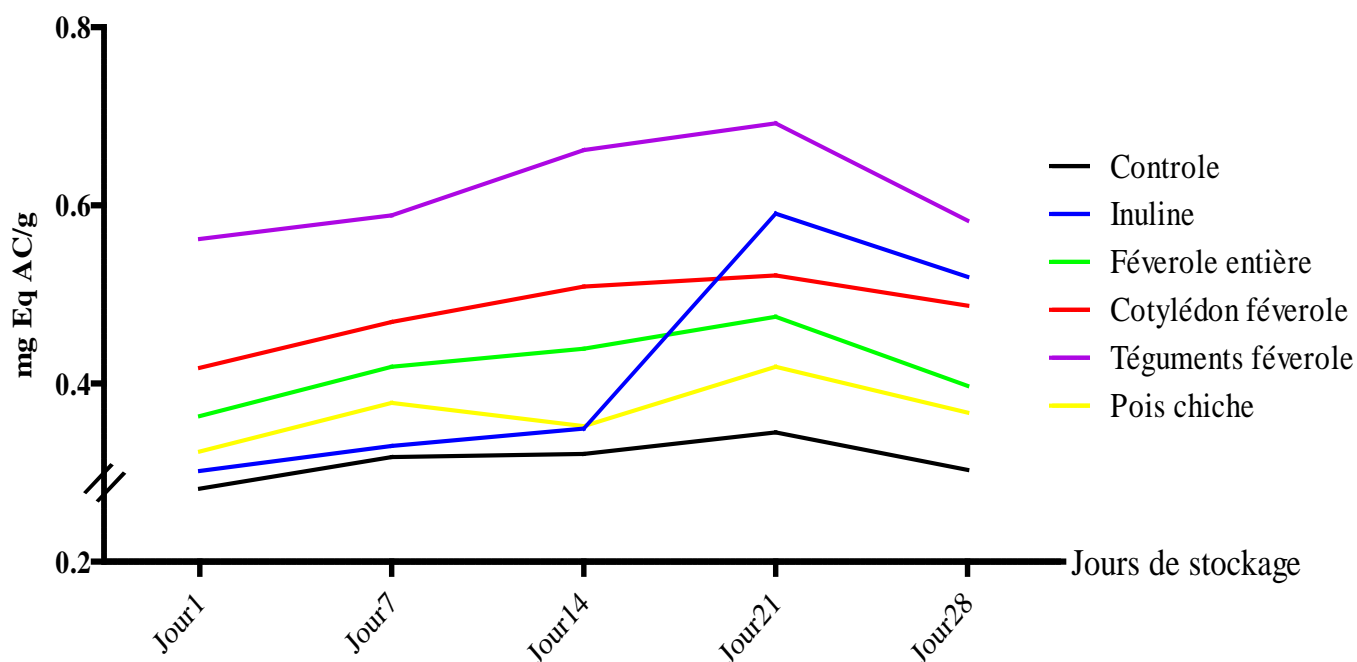


Figure 19: Teneurs des composés phénoliques des kéfirs purs en fonction de jours de stockage.

L'incorporation de mucilage de légumineuses s'accompagne dans le 1^{er} jour d'une évolution des teneurs en composés phénoliques. Cette évolution se produit en deux temps :

Dans un premier temps, nous observons une légère augmentation allant de 3.77 à 36.59%. Pendant cette phase, l'échantillon avec inuline manifeste une forte augmentation du jour 14^{ème} au 21^{ème} jour avec un taux de 69.14%. Les valeurs maximales en composés phénoliques sont atteintes au 21^{ème} jour de stockage avec des augmentations de 18.75 à 25.53%.

Nous notons dans la deuxième étape une diminution de la teneur en CP du jour 21 au jour 28 qui varie de 3.85 à 16.07%.

Les résultats expérimentaux classent l'efficacité des extraits phénoliques des kéfirs au jour 21 par ordre croissant : contrôle < pois chiche < fèveole entière < cotylédon de fèveole < inuline < tégument de fèveole.

II.6. Discussion de l'activité prébiotique

L'utilisation des différents mucilages dans le kéfir a induit des effets notables sur la viabilité au cours du stockage des souches probiotiques et les caractéristiques du milieu.

Nos données analytiques ont révélé une baisse du pH accompagnée d'une augmentation de l'acidité. Ces deux paramètres traduisent l'activité des microorganismes présents dans le milieu. En présence des différents mucilages de nos légumineuses et d'inuline, les bactéries sont plus actives comme en témoigne la production d'acide lactique. En effet les bactéries probiotiques produisent des acides tels que l'acide butyrique, propionique et surtout l'acide lactique, qui est l'acide le plus produit (**Shah, 2000**). Les produits finaux du métabolisme des glucides (acide gras à courte chaîne) exercent un effet positif sur les probiotiques en leur servant de source d'énergie (**Kaplan et Hutkins, 2000**).

Les baisses de pH au cours de stockage s'accordent avec l'augmentation de l'acidité titrable. Nos résultats pour les variations du pH et de l'acidité s'accordent avec les données de **Hadinzhand et al., (2013)** et **Boudjou et al., (2013)**.

La croissance bactérienne est plus importante dans les kéfirs avec mucilage et inuline en comparaison au kéfir control. Cette meilleure croissance des microorganismes s'explique selon **Koplan et Hutkins, (2000)** par un apport élevé en hydrates de carbone par les mucilages utilisés et les différents micronutriments contenus dans ces prébiotiques. Les fibres alimentaires telles que galacto-oligosaccharides améliorent la croissance des probiotiques sans diminution significative du pH (**Mei, Carey, Tosh, et Kostrzynska, 2011**). **Bomba et al., (2002)** rapportent que certains éléments chimiques tels que le fer et le magnésium permettent l'augmentation de la viabilité des probiotiques.

Du 21^{ème} au 28^{ème} jour, nous notons une diminution du nombre de colonies pour tous les échantillons de kéfir. Des observations similaires sont rapportées par **Esperito et al., (2010)** et **Hadinzhand et al., (2013)**.

Des études antérieures ont montré que les facteurs contributifs les plus importants pour la perte de la viabilité cellulaire sont les baisses de pH pendant le stockage du produit (post-acidification) et l'accumulation d'acides organiques en raison de la croissance bactérienne et de la fermentation (**Shah, 2000**).

Une gamme de 6-8 log ufc / ml est le niveau recommandé pour les bactéries probiotiques à la fin de la période du stockage à froid (**Vasiljevic et Shah, 2008**). Nos résultats ont montré qu'à l'issue de la période de conservation, la croissance bactérienne de nos échantillons s'établit dans une gamme comprise entre 7.26 log CFU/ml et 8.16 CFU/ml. Confirment ainsi la

capacité de nos mucilages à maintenir un niveau acceptable de bactéries tout au long de la période de stockage.

Les différences de teneur en composés phénoliques des différents kéfirs sont à l'origine des teneurs en CP des mucilages utilisés.

Les teneurs en composés phénoliques totaux des kéfirs supplémentes sont inférieures à celles obtenues par **Priera et al., (2013)** pour le yaourt agrémenté en fruits naturels.

Du jour 1 au jour 21, nous notons une faible augmentation des teneurs en CP suivie d'une diminution du jour 21 au jour 28. Des observations similaires sont rapportées par **Shori (2013)** dans le yaourt supplémenté de soja.

La différence des teneurs des CP dans les extraits des kéfirs en présence et en absence de supplémentation pourrait être expliquée par la dégradation des protéines du lait pendant la réfrigération, cette dégradation peut aboutir à la libération d'acides aminés et composés non phénoliques (sucres et protéines) qui peuvent interférer lors de l'évaluation de composés phénoliques totaux (**Shori, 2013**).

La diminution des CP dans les extraits des kéfirs au 28^{ème} jour peut être due à l'interaction des composés phénoliques des kéfirs et des mucilages avec les protéines du lait.

*Conclusion et
perspectives*

Conclusion et perspectives

La présente étude a permis de mettre en évidence l'effet prébiotique et les teneurs en quelques antioxydants (polyphénols totaux, flavonoïdes et flavonols) et détermination de l'activité antioxydante (pouvoir réducteur et activité anti radicalaire) des mucilages purs extraits de nos graines.

Les résultats obtenus montrent que le mucilage de féverole est plus riche en polyphénols totaux, flavonoïdes et flavonols, que le pois chiche.

Pour cette même graine (féverole), ce sont les téguments qui donnent les mucilages les plus riches en divers composés phénoliques.

Le mucilage de tégument présente l'activité antioxydante la plus élevée avec un taux d'inhibition de 97,87% contre le radical DPPH et un pouvoir réducteur de 0,54mg AAC/100g.

Des corrélations positives ont été observées entre l'activité antioxydante (pouvoir réducteur et activité anti radicalaire) et les teneurs en CP (polyphénols totaux, flavonoïdes et en flavonols).

En effet l'incorporation des mucilages dans les kéfirs s'accompagne d'une augmentation de l'acidité et une diminution du pH pendant le stockage à froid. En présence des différents mucilages dans le kéfir, les bactéries sont potentiellement plus actives et produisent plus d'acide lactique.

Les résultats de cette étude ont montré que les mucilages de nos légumineuses constituent une excellente source de différents antioxydants qui piègent les radicaux libres, afin de lutter contre le stress oxydatif et suggèrent que ces derniers peuvent servir de nouveau prébiotiques dans la formulation d'aliments fonctionnels et applications nutraceutiques.

Ce travail mérite d'être poursuivi et approfondi pour une meilleure connaissance des mucilages des graines utilisées :

- D'approfondir l'étude des mucilages : la structure des mucilages comme le degré de pureté, composition des monosaccharides, degré de polymérisation et le poids moléculaire.
- De réaliser une évaluation sensorielle pour les échantillons de kéfir.

- Etudes in vivo sur des modèles animaux et essais cliniques pour évaluer la relation santé kéfir enrichis en ces extraits des légumineuses.
- De tester l'activité de nos extraits sur des espèces bactériennes pathogènes et phytopathogènes tels que ; *Staphylococcus aureus*, *Pectobacterium carotovorum atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas eruginosa*.....etc.

Références
Bibliographiques

A

Abrams S., Griffi N., Hawthorne K. (2007). Effect of prebiotic supplementation and Ca intake on BMI, *Journal of Pediatr* **151**: 293-298.

Adedapo A.A., Jimoh F.O., Afolayan A.J., Masika P.J. (2008). Antioxidant activities and phenolic contents of the methanol extracts of the stems of *Acokanthera oppositifolia* and *Adenia gummifera*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **54**: 1-7.

Agil, R., Gaget, AGilwa, J Avis, T.J., Willmore, W.G & Hosseinian, F. (2013). Lentils enhance probiotic growth in yogurt and provide added benefit of antioxidant protection. *LWT- Food Science and Technology* **45**(2): 155-160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.032>.

Akiyama H., Fujù K., Yamasaki O., Ooni T. et Iwatsuki K. (2001). Antibacterial action of several tannins against staphylococcus aureus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **48**: 487-491.

Assadi MM, Pourahmad R, Moazami N. (2000). Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. *World Journal of Microbiol Biotech* **16**: 541–543.

B

Barbary O. M., Al-Sohaimy S. A., El-Saadani M. A., Zeitoun A. M. (2009). Extraction, composition and physicochemical properties of flaxseed mucilage. *Journal of Advance Agricultural Research* **14**(3): 605–620.

Benbrook C.M. (2005). Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. Rapport sur l'état des connaissances scientifiques. The *Organic Center for education & promotion*.

BERMOND P. TISON E. (1991). *Cahier Nutrition Diététique XXVI, vol 6, p403-408*

Blaut M. (2002). Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Europ Journal of Nutrition* **41**(suppl 1):S11-S16.

Boehm G, Stahl B. (2003). Oligosaccharides. Functional Dairy products. In: *Mattila-Sandholm T* (ed) (Woodhead Publication, Cambridge 203.

Boudjou, S., Oomah, B.D., Zaidi, F., & Hosseinian, F. (2013). Phenolic content and antioxidant anti-inflammatory activities of legume fraction. *Food Chemistry* **138**: 1543-1550.

Boudjou S., Zaidi F., Hosseinian, F F. et Oomah D. (2014). *Journal of Food Research* **2**: 1927-0895

Bomba A, Nemcovà R, Mudronovà D, Guba P (2002). The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends Food Sci Technol* **13**:121-126.

Bouhnik Y., Flourié B., D'Agay-Abensour L., Pochart P., Gramet G., Durand M., Bornet F. (2001). Fructooligosaccharides et autres fructanes: chimie, structure et effets nutritionnels. *Industries Alimentaires et Agricoles* 74-80.

Bouhnik V., Flourié B., d'Agay-Abensour L., Pochart P Gramet G., Durand M. (1997). Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal Bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. *J Nutr* **127**: 444-8.

Brand-Williams W., cuvelier M.E., et Berset C. (1995). use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *food Science and Technology* **28**:25- 30.

Brugger A. (2006). Inulin studies in humans: Overview of health benefits. US Pharmacist Web Site. http://www.uspharmacist.com/oldformat.asp?url_publish/content/8_1862.htm. Accessed December 17.

Bruneton G. (1987). *Eléments de phytochimie et de pharmacognosie* ed: *Tec and Doc, Lavoisier*, Paris 585.

Bruzzese E., Volpicelli M., Squaglia M., Tartaglione A., Guarino A. (2006). Impact of prebiotics on human health. *Digestive and Liver Disease* **38 Suppl 2**: S283–S287.

C

Cebra JJ. (1999). Influences of microbiot10.a on intestinal immune system development. *Am. Journal Clin. Nutrition* **69**: 51-1046.

Chang S., Tan C., Frankel E.N., Barrett D.M. (2000). Low-Density Lipoprotein Antioxidant Activity of Phenolic Compounds and Polyphenol Oxidase Activity in Selected Clingstone Peach Cultivars. *Journal of Agric Food Chemistry* **48**: 147-151.

Chaieb N., Gonzalez J.L., Lopez-Mesas M., Bouslama M., Valiente M. (2011). Polyphenols content and antioxydant capacity of thirteen faba bean (*Vicia faba minor*) genotypes cultivated in Tunisia. *Food Research International*.

Chew K.K., Ng S.Y., Thoo Y.Y., Khoo M.Z., Wan Aida W.M., Ho C. W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. *International Food Research Journal* **18**: 571-578.

Chow J. (2002). Probiotics and prebiotics: A brief overview. *Journal Ren Nutrition* **12**:76-86.

Costalos C, Kapiki A, Apostolou M, Papathoma E. (2008). Science Direct 84 45.

Cummings J., MacFarlane G. (2002). Gastrointestinal effects of prebiotics. *British Journal of Nutrition* **87**:145-151.

Curtay J.P., Robin J.M. (2000). Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie INF*.1-4.

Crozier A, Clifford M.N., Ashihara H. (2006). Plant secondary metabolite, occurrence, structure and role in the human: Chapter VIII. Blackwell publishing Ltd.pp:309

D

Daun J. K., Barthet V. J., Chornick T. L., Duguid S. (2003). Structure, Composition, and Variety Development of Flaxseed. In L. U. Thompson & S. C. Cunnane (Eds.), *Flaxseed in Human Nutrition*. Champaign, USA: AOCS Press 1–40.

Delattre C., Pierre G., Gardarin C., Traikia M., Elboutachfait R., Isogai A. (2015). Antioxidant activities of a polyglucuronic acid sodium salt obtained from TEMPO-mediated oxidation of xanthan. *Carbohydrate Polymers* **116**: 34–41.

Delattre C., Elboutachfait R., Engelf E., Fenoradosa T.A., Michaud P., Peteraa B., Pierreb G., Poughonb L., Wadouachid A. (2015). Characterization of arabinogalactan-rich mucilage from *Cereus triangularis cladodes* *Carbohydrate Polymers* **127**: 372–380.

Derbel S., Ghedira K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie* **1**: 28-34.

Deore S., Khadabadi S. (2008). Standardisation and pharmaceutical evaluation of *Chlorophytum borivillianum* mucilage. *Rasayan Journal of Chemistr* **1**: 887-892.

Delzenne N. (2003). Oligosaccharides: state of the art. *Proceedings of the nutrition society* **62**:177-182.

Diniz L., Garla J., Schneedorf J., Carballo. (2003). Of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide. *Pharmacological Research* **47**: 49–52.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouma D., Stocker P., Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* **97**: 654-660.

Durazzo A., Turfani V., Azzini E., Maiani G., Carcea M. (2013). Phenols, lignans and antioxidant properties of legume and sweet chestnut flours. *Food Chemistry* **140**:666–671.

E

Earnworth ER. (1999). Kefir: from folklore to regulatory approval. *Journal of Nutraceuticals, Functional and Medical Foods* **1**: 57-68.

Ekoumou C. (2003). Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. *Thèse de doctorat en pharmacie*.

Espirito Santo AP, Silva RC, Soares FASM, Anjos D, Gioielli LA, Oliveira MN. (2010). Açai pulp addition improves fatty acid profile and probiotic viability in yoghurt. *Int Dairy J* **20**:415-422.

F

Farnworth, E.R. (2004). The beneficial health effects of fermented foods – potential probiotics around the world. *Journal of Nutraceuticals, Functional and Medical Foods* (in press).

Fotouhinia M. (2001). Kefir as a potent anti-oxidant composition. *Brevet WO0197820* **27**.

Francisco G., Malagelada Lancet R. (2003). Gut flora in health and disease **19**: 361-512.

François-M., Georges C. (2008). Bactéries lactiques et probiotiques.

G

Gervaise Y. (2004). Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits. *Euroforum*. Paris.

Ghedira K. (2005). Les flavonoides : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Pharmaconosie* **10**: 16-22.

Ghedira K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* **4**: 162-169.

Gibson G. R., Fuller R. (2000). Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *Journal of Nutrition* **130**: 391-395.

Gibson GR, Roberfroid MB (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* **125**:1401–12.

Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J. A. E., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews* **17**: 257-259.

Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* **125**:1401-1412.

Grizard D., Barthomeuf C. (1999). Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reproduction, Nutrition, Development* **39**:563-588.

Goldman AS. (2000). Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. Interfaces and interactions. An evolutionary perspective. Symposium: bioactivity in milk and bacterial interactions in the developing immature intestine. *American society for nutritional sciences* 426-431.

Gülçin I., Oktay M., Kreçci E., Küfrevioğ Ö. I. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry* **83**: 371-382.

Gusils C., Bujazha M., Gonzalez S. (2002). Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. *Aug.* Vol. 27. N°08.

Guzel-Seydim Z, Seydim AC, Greene AK. (2000). Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir, *Journal of Dairy Science* **83**: 275–277.

H

Hadi M. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteur de radicaux libres; études et applications thérapeutiques: Chapitre I. Thèse doctorat. Pp: 13-28.

HadiNezhad M.,Duc C.,Fong Han N. et Hosseinien F. (2013). *Journal of Food Research* **2**: 1927-0895.

Hadouchi F. Lazouith. Ahammer K.A .Carson C.F.Carson C.F.et Riley T.V. (1999).

Antimicrobial activity of essential oils and other plant extract. *Journal of applied microbiology* **86**: 985-990.

Hartemink R. (1999). Prebiotic effects of Non-digestible oligo- and polysaccharides. (PhD thesis, Wageningen University, the Netherlands.

Hallé C., Leroi X., Dousset M., Pidoux. (1994). Les kéfirs : des associations bactéries lactiqueslevures. In Roissart, De H., Luquet, F.M. (Eds.), Bactéries lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques. Vol. 2. Uriage, France, Lorica, pp: 169-182. Livre

Hedqvist H. (2004). Metabolism of Soluble Proteins by Rumen Microorganisms and the Influence of Condensed Tannins on Nitrogen Solubility and Degradation. *Doctoral thesis on Animal Nutrition and Management*. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.

Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie* **1**: 2-5.

Hosono, A., T. Tanabe and H. Otani. (1990). Binding properties of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolyzates. *Milchwiss* **45**: 647-651.

Hosseinian, F. S., & Mazza, G. (2009). Triticale bran and straw: Potential new sources of phenolic acids, proanthocyanidins, and lignans. *Functional Foods* **1**: 57-64.

Hseu Y.C., Chang W. H., Chen C. S., Liao J.W., Huang C. J., Lu F. J., Hia Y. C., Hsu H. K., Wu J. J., Yang H. L.(2008). Antioxidant activities of *Toona sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 105-114.

I

Iqbal S., Bhangar M., Anwar F. (2005). Antioxydant proprieties and component of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry* **93**: 265-272.

J

Jeyaramraja P-R., Meenakshi S-N., Kumar R-S., Joshi S-D, et Ramasubramanian B. (2005).Water deficit induced oxidative damage in tea(*Camellia sinensis*) plants. *Journal of plant physiology* **162**:413-421.

Jiangrong L., Yueming J. (2007). Litchi Flavonoids: Isolation, Identification and Biological Activity. *Molecules* **12**: 745-758.

Jones P.J. (2002). Functional foods more than just nutrition. *CMAJ* **166** (12): 1555-1563.

K

Kaplan H,Hutkins RW. (2000) Fermentation of Fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Zppl Environ Microbiol* **66**:2682-2684.

Kieran M. Tuohy., Hollie M. Probert., Chris W., Smejkal., Glann R., Gibson. (2003). Using probiotics and prebiotics to improve gut health. Therapeutic focus. vol. **8**.

Koocheki, A., Mortazavi, S. A., Shahidi, F., Razavi, S. M. A., & Taherian, A. R. (2009).Rheological properties of mucilage extracted from *Alyssum homolocarpum* seed as a new source of thickening agent. *Journal of Food Engineering* **91**: 490-496.

Kumaran A., Kurunakaran R. J. (2007). *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT* **40**: 344-352.

L

Lai L., Liang H. (2012). Chemical compositions and some physical properties of the water and alkali-extracted mucilage from the young fronds of *Asplenium australasicum* (J. Sm.) Hook. *Food Hydrocolloids* **26**:344-349.

Lapornik B., Prošek M. et Wondra A.G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*. **71**:214-222.

Li H., Wang X., Li Y., Li P., et Wang H.(2009) .polyphenolic compounds and antioxydant properties selected chine wines foodchemistry **112**:454-46.

Libudzisz Z., and A. Piatkiewicz. (1990). Kefir production in Poland. *Dairy Ind. Int* **55**: 31-33.

Lin H. C., Su B. H., Chen A. C., Lin T. W., Tsai C. H., Yeh T. F., Oh W. (2005). Oralprobiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birthweight infants. *Pediatrics* **115**:1-4.

Lorenz M.M. (2011). Sainfoin tannins and their impact on protein degradation during silage rumen fermentation and testing of novel techniques. *Doctoral Thesis on Animal Nutrition and Management*. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.

Luthar Z. (1992). Polyphenol classification and tannin content of buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Fagopyrum* **12** : 36-42.

Luo J, Van Yperselle M, Rizkalla SW et al ., (2000). Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides does not affect basal hepatic glucose production or insulin resistance in type 2 diabetics. , *Journal of Nutrition* **130**: 1572–7.

M

Maisuthisakul P., Pasuk S., Ritthiruangdej P. (2008). Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food Composition and Analysis* **21**: 229-240.

Marelli G., Papaleo E., Ferrari A. (2004). Lactobacilli for prevention of urogenitalInfections: a review. *European Review of Medicine and Pharmacology Sciences* **8**: 87-95.

- Margulis L.** (1996). From kefir to death. In *How Things Are*, Brockman J, Matson K. William Morrow and Co: New York; 69-78.
- Marteau P, Minekus M, Havenaar R, Huis in't Veld J.** (2003). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science* **80**: 1031-1037.
- Marshall VM.** (1993). Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. *J. Soc. Dairy Technol* **46**: 49-56.
- Malviya R., Srivastava P., Kulkarni G.** (2011). Applications of mucilage in drug delivery e a review. *Advances in Biological Research* **5**: 1-7.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jimenez L.** (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am Journal of Clin Nutrition* **79**: 727-47.
- Mei G. Y., Carey C. M., Tosh S., Kostrzynska M.** (2011). Utilization of different types of dietary fibres by potential probiotics. *Canadian Journal of Microbiology* **57**: 857-865.
- Metchnikoff E.** (1907). The prolongation of life. In *Optimistic Studies* (Heinemann W., Ed.), pp. 1-100. G. P. Putnam and Sons, London, UK.
- Miller TL, Wolin MJ,** (1996). Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1589–92.
- Munjal, U., Gleib, M., Pool-Zobel, B. L., & Scharlau, D.** (2009). Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumor cells of different stages of carcinogenesis. *British Journal of Nutrition* 27-19.
- Mussamatto, S. I., & Mancilha, I. M.** (2007). Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate Polymers* **6**: 587-597.
- Molyneux P.** (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science. Technology* **26** (2) : 211-219.

N

- Naczka M .et Shahidi F.** (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**: 1523-1677.
- Nick Kalogeropoulos a,*, Antonia Chiou a, Maria Ioannou a, Vaios T. Karathanos a, Yildiz F.** (2010). *Advances in food biochemistry* Chapitre X.CRC press, USA,pp:324-325.

Nugent, M. A. (2000). Heparin sequencing brings structure to the function of complex oligosaccharides. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**:10301-10303.

O

Oliveira RB., Pereira MA., Veiga SMO., Schneedorf JM., Oliveira NMS., Fiorini JE.(2010). Microbial profile of a kefir sample preparations: grains in natura and lyophilized and fermented suspension. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **30**:1022–1026.

Oomah B.D., Caspar F., Malcolmson L.G., etBellido A.S. (2011).phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls. *Food research international* **44**:436-441.

Oomah, B. D., Caspar, F., Malcolmson, L. J., &Bellido, A.-S. (2011b). Phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls. *Food Research International* **44**: 436–441.

Özacar M., Soykan C., Sengil I.A. (2004). Studies on Synthesis, Characterization, and Metal Adsorption of Mimosa and Valonia Tannin Resins. DOI 10.1002/app.23944.

Özturk M., Aydogmus-Ozturk F., Emin Duru M., Topçu G. (2007). Antioxydant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*) : An edible medicinal plant. *Food chemistry* **103**: 623-630.

P

Parker R.B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animnutr health* **29**:4-8.

Pereira E., Barros L., Ferreira I. (2013). Relevance of the Mention of Antioxidant Properties in Yogurt Labels: *In Vitro* Evaluation and Chromatographic Analysis. *Antioxidants* 62-76.

Perez M.E.G. (2008). Caractérisation des composés phénoliques des extraits de la famille du boulezu jaune : étude de leur capacité antioxydante : Chapitre I. Thèse doctorat pp : 49-66

Pintado ME, Lopes Da Silva JA, Fernandes PB, Malcata FX, Hogg TA. (1996). Microbiological and rheological studies on Portuguese Kefir grains, *Int. Journal of Food Science Technology* **31**: 15–26.

Priebe MG, Vonk RJ, Sun X, He T, Harmsen HJM, Welling GW. (2002). the physiology of colonic metabolism. Possibilities for interventions with prebiotics - and probiotics. *Europ Journal of Nutrition* **41**:2-10.

R

Ribéreau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. *Ed Dunod*. Paris.

Ribéreau-Gayon J., Peynod E., Sudraud P., Ribéreau-Gayon P. (1982). Science et technique du vin. Tome 1. Analyse et contrôle des vins. *Ed Dunod*. Paris.

Richardson, T. (1979). L'aliment et la vie **67** : 91-109.

Rodriguez M. J., Alberto M. R. et Mauca de Nadra M. C. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food contr* **18**: 93-101.

Rodrigues KL., Caputo LRG., Carvalho JCT., Fiorini JE., Schneedorf JM. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrob Agent* **25**(5):404–408.

Rollan S. (1988). Les boissons de lait fermenté : rôle des bactéries et des levures - diététique et thérapeutique. *Thèse docteur en sciences pharmaceutiques* 250.

Rousseau V., Paul F. (2004). Anhydrofuctose and oligosaccharides derivatives as Prebiotic. 5th NEPSA meeting, March, Braunschweig, Germany.

Rowland IR, (1991). Nutrition and gut microflora metabolism In: Rowland IR, ed. *Nutrition, toxicity and cancer* (Boston: CRC Press) 113–36.

S

Saad, N, Delattre, C., Urdaci, MSchmitter, J.M., &Bressolliers, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science and Technology* **50**:1-16. <http://dx.doi.org/10.10106/j.foodchem.2012.05.014>

Saharan K., Khetarpaul N., Bishnoi S. (2002). Variability on physic-chemical properties and nutrient composition of Newly Released Ricebean and Fabbean *Cultivars Department of Food and Nutrition*. CCS Haryana Agricultural University, Hisar 125004, India.

Sako T., Tanaka R. (2011). Prebiotics. Yakult Europe B.V., Almere, The Netherlands and Yakult Central Institute for Microbiological Research .Tokyo, Japan.

Salminen S, Bouley C, Bouton-Ruault MC, et al. (1998); Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition* **80**: 71-147.

Sarni-Manchado P., Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. *Edition : Tec et Doc Lavoisier*. Paris.

Schmelzle H, Wirth S, Skopnik H et al, (2003). Randomized Double-blind study of the nutritional efficacy and bifidogenicity of a new infant formula containing partially hydrolyzed protein, a high-palmitic acid level, and nondigestible oligosaccharides. *JPGN* **36**: 343–51.

Semih Otles and Ozlem Cagind, (2003), A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects Pakistan. *Journal of Nutrition* **2** (2): 54-59.

Shah N. P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Sciences* **83**: 894-907.

Škergeta M., Kotnika P., Hadolinb M., Rižner Hrašb A., Simoniča M., Kneza Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plantmaterials and their antioxidant activities. *Food Chemistry* **89** (2): 191-198.

Sun L., Zhang J., Lu X., Zhang L.et Zhang Y. (2011).Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (diospyros kaki L.)Leaves. *Food and chemical Toxicology* **49**:2689-269.

Sun M., Temelli F. (2006). Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. *Journal of Supercritical Fluids* **37**: 397-408.

T

Tahiri M, Tressol JC, Arnaud J, Bournet F, Bouteloup-Demange C, Feillet-Coudray C, Theriault M., Caillet S., Kermasha S. et Lacroix M. (2006). Antioxidant, antiradical and antimutagenic activitie of phenolic compounds present in maple products. *Food chemistry* **98**:490-50.

Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Etpolissiou M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salviatomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry* **90**: 333-340.

V

Varcose J. J., Krejcarek G., Busta F., Brady L. (2003). Prophylactic feeding of *Lactobacillus acidophilus* NCFM to mice attenuates overt colonic hyperplasia. *Journal of Food Protection* **66**:457-465.

Vasiljevic T., Shah N. P. (2008). Probiotics – from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* **18**: 714-728.

Véronique N., Radegonde M., Gilbert Berben. (2009). Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir **13** : 1780-4507.

Van den Heuvel EG, Muys T, van Dokkum W et al., (1999). Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *Am J Clin Nutr* **69**: 544–8.

Vierling E. (2008). Aliments et boissons, filières et produits. *Ed 3, bioscience et technique* p155.

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

Vujcic I.F., Vulic , M.,Konyves T.(1992). *Biotechnology letters*, V. 14, N. 9, 847-850.

W

Ward P.C.; Mccaethy R.D.; Kilara A. (1987). *Milchwissenschaft*, V.42; N.8; 499-504

Waldherr FW., Doll VM., Meibner D., Vogel RF. (2010) Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* tmw 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiology* **27**(5):672–678.

Wang R, Charalampopoulos D, Pandiella SS, Webb C. (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: A review. *International Journal of Food Microbiology* **79**:131-141.

Wang J., Yuan X., Jin Z., Tian Y., Song H. (2007). Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of peanut skins extract. *Food Chemistry* **104**: 242-250.

Wang N., Hatcher D.W., Toews R., Gawalco E.J. (2009). Influence of cooking and dehulling on nutritional composition of several varieties of lentil (*Lens culinaris*). *LWT. Food science and Technology* **42**: 842-848. .

Y

Yen Y.H., Shih C.H., Chang C.H. (2008). Effect of adding ascorbic acid and glucose on the antioxidative properties during storage of dried carrot. *Food Chemistry* **107**: 265-272.

Z

Zare F, Champagne, C. P., Simpson, B.K., Orsat V & Boye, J.I. (2012).Effect of the addition of pulse ingredient to milk on acid production by probiotic and yoghurt starter cultures. *LWT-Food Science and Technology* **45**(2):155-160.

Annexes

Tableau I : le potentiel nutritionnel et effets thérapeutiques de certains prébiotiques.

Substrats	Type de l'étude	Effets thérapeutique
FOS, inuline et/ ou en symbiotique au prébiotique	<i>In vitro</i>	Inhibition des pathogènes humains et animaux.
Inuline	Etude expérimentale	L'amélioration de rat colite distale. Stimulation de l'absorption du Ca et Mg intestinales.
Inuline enrichie en oligo-fructose	Sur des modèles animaux Sur des modèles humains et animaux	L'amélioration de l'adsorption du calcium et les minéraux osseux. Immuno-modulation. Prévention du cancer. Concentration en lipides plasmatiques.
FOS/ GOS	En double insu, les essais contrôlés randomisés Sur des modèles rats	Rechute de <i>Clostridium difficile</i> diarrhée associée Effets du cholestérol total et LDL-cholestérol chez l'enfant Augmentation des proportions des bifidobactéries. Simule lactobacillus et bifidobactéries Augmente les acides gras à courte chaîne dans le gros intestin. Réduire les ulcérations coliques.
Xylo-oligosaccharides (XOS)	Des volontaires humains, des modèles de rats et souris	Effet bifidogène et augmentation des acides gras à courte chaîne dans les fèces.

Adapté par (Saad *et al.*, 2012)

Tableau II : Principales classes des composés phénoliques (Harbone, 1989).

Nombre de carbones	Squelette carboné	Classe	Origine (exemples)
6	C ₆	Phénols simples Bénzoquinones	Thé
7	C ₆ - C ₁	Acides phénoliques	Epices, fraise
8	C ₆ -C ₂	Acides phénylacétiques	Agrumes
9	C ₆ - C ₃	Acides hydroxycinnamiques Polypropènes	Pomme de terre, pomme, citrus
10	C ₆ - C ₄	Naphtoquinones	Noix
13	C ₆ - C ₁ - C ₆	Xanthonnes	Aubergines
14	C ₆ - C ₂ -C ₆	Stilbènes Anthrachinones	Vigne
15	C ₆ - C ₃ - C ₆	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Fruits (graine /peau de raisin), légumes, fleurs,
18	(C ₆ - C ₃) ₂	Lignanes Neolignanes	Pin
30	(C ₆ - C ₃ - C ₆) ₂	Biflavonoïdes	Raisins
n	(C ₆ - C ₃) _n (C ₆) _n	Lignines Catechelmelanine	Bois, fruits à noyau, raisin, kaki

Annexes des figures

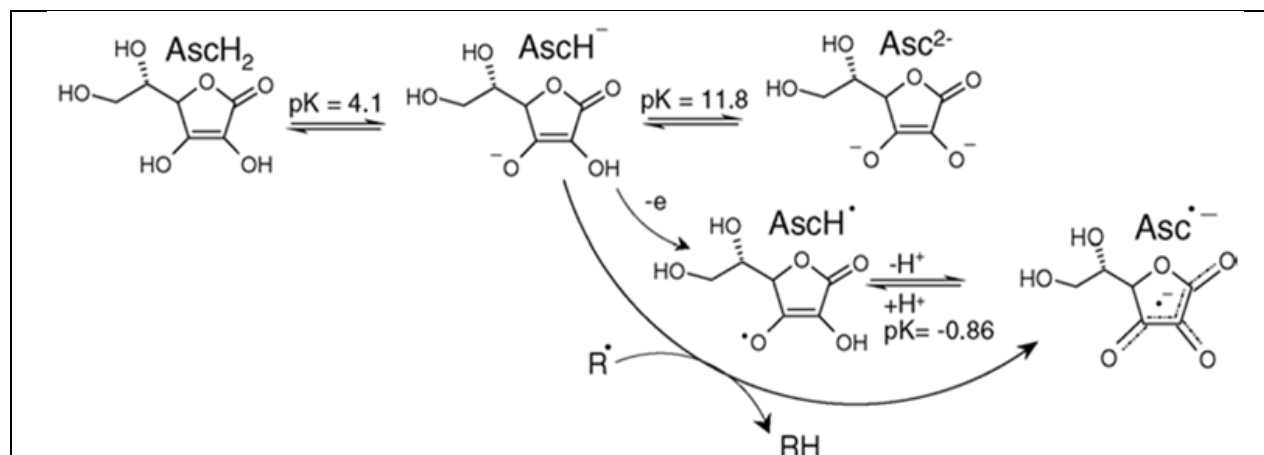
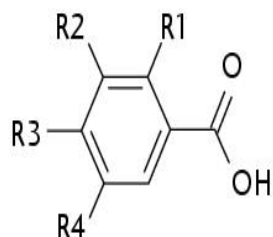


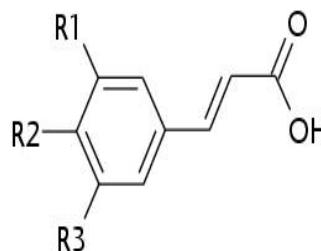
Figure 1 : Diverses formes de l'acide ascorbique et sa réaction avec les radicaux (R^\bullet)
(Valko *et al.*, 2006).

Acides hydroxybenziques



$R1=R2=R3=R4=H$	Acide benzoïque (non phénolique)
$R1=R4=H, R2=R3=OH$	Acide protocatéchique
$R1=H, R2=R3=R4=OH$	Acide gallique
$R1=OH, R2=R3=R4=H$	Acide salicylique
$R1=R4=OH, R2=R3=H$	Acide gentisique

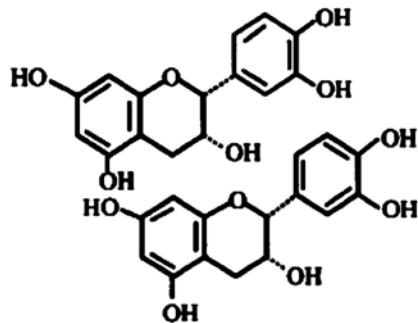
Acides hydroxycinnamiques



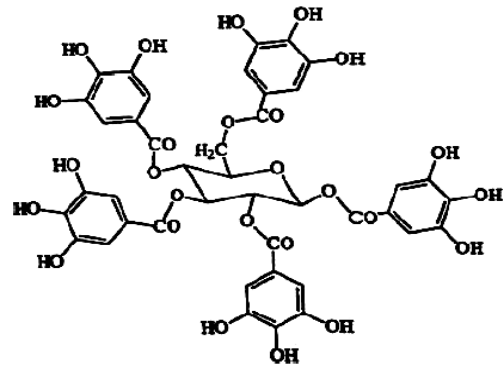
$R1=R2=R3=H$	Acide cinnamique (non phénolique)
$R1=R3=H, R2=OH$	Acide <i>p</i> -coumarique
$R1=R2=OH, R3=H$	Acide caféique
$R1=OCH_3, R2=OH, R3=H$	Acide férulique
$R1=R3=OCH_3, R2=OH$	Acide sinapique

Figure 2 : Structure des acides phénoliques (Laguerre *et al.*, 2007).

Les Tanins



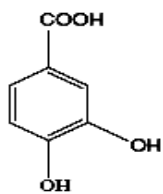
Tanins condensés



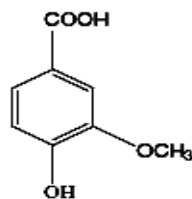
Tanins hydrolysables

Figure 3 : Exemples de structures chimiques d'un tanin hydrolysable et d'un tanin condensé (Lorenz, 2011).

Les Acides phénoliques :



Acide protocatechique



Acide vanillique

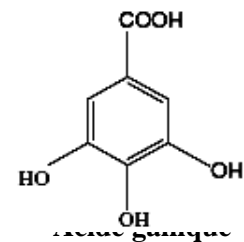
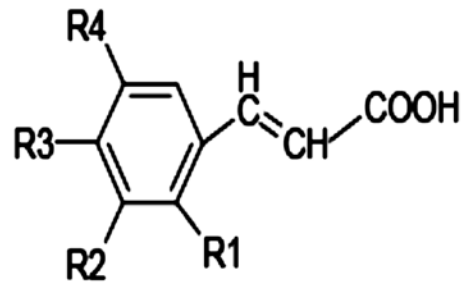


Figure 4 : Exemples de structures chimiques des acides hydroxybenzoïques (Chvátalová *et al.*, 2008).



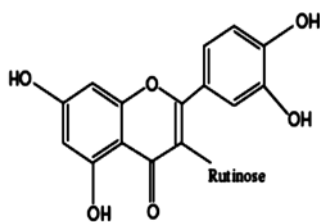
Acide coummarique : $R_1=R_2=R_4=H$, $R_3=OH$.

Acide caféique : $R_1=R_2=H$, $R_3= R_4=OH$.

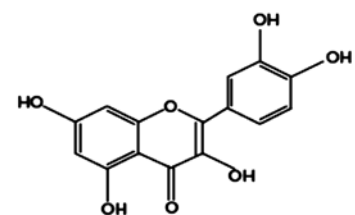
Acide férulique : $R_1=R_2=H$, $R_3= OH$, $R_4=OCH_3$.

Figure 5 : Exemples de structures chimiques des acides hydroxycinnamiques (Nave *et al.*, 2007).

Les Flavonoïdes



Rutine



Quercétine

Figure 6: Exemples de structures chimiques des flavonoïdes (Lapornik *et al.*, 2005).

Annexe des préparations des solutions

Solutions	Réactifs
éthanol 80%	80ml de l'éthanol pure ajuste jusque à 100ml d'eau distillée
Solution de folin-ciocalteu(0,1)	10 ml de folin coicalteau + ajoute jusqu'à 100ml d'eau distillée
Solution de carbonate de sodium (7,5) Na ₂ CO ₃	7,5g de la poudre de Na ₂ CO ₃ dissout dans 100ml l'eau distillée.
Solution de chlorure d'aluminium hydrate à 2%(AlCl ₃ 6H ₂ O)	21,87g de la poudre d'AlCl ₃ hydrate dissout dans 250ml de l'eau distillée.
HCl (1N)	8.26ml d'HCL 37% est ajuste à 1 litre l'eau distillée.
FeCl ₃ (0,01M dans Hcl 0,01M)	Dissoudre 1,62 g de FeCl ₃ dans un litre de Hcl à 0,01M
Solution DPPH (65uM/l)	0.0024g DPPH dans 100ml de méthanol pur
Tampon phosphate (0,2M, pH6,6) :	2,72 g de KH ₂ PO ₄ (acide) dans 100 ml d'eau distillée 3,48g de K ₂ HPO ₄ (basique) dans 100ml d'eau distillée La solution acide est ajoutée avec la solution basique jusqu'à l'obtention d'un pH6,6
Ferricyanure de potassium (K ₃ Fe(CN) ₆ 1%	1g de K ₃ Fe(CN) ₆ dans 100ml d'eau distillée
Acide trichloracétique (TCA) 10%	10g de TCA dans 100ml d'eau distillée.
Chlorure ferrique (FeCl ₃) à 0,1 %(p/v)	0,1g de FeCl ₃ dans 100ml d'eau distillée

Tampon phosphate (0,1M, pH7,4) :	1,36g de KH_2PO_4 dans 100ml d'eau distillée 1,74g de K_2HPO_4 dans 100ml d'eau distillée. La solution de KH_2PO_4 est ajustée avec la solution K_2HPO_4 jusqu'à l'obtention d'un pH7,4.
	0,123g ferrosines dans 50ml d'eau distillée
FeCl_2 à 2mM	0,025g de $\text{FeCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 100ml d'eau distillée.
Inuline 3%	1.5 g d'inuline dans 50ml d'eau distillée

Annexe des Tables d'analyse statistiques avec GraphPad (ANOVA 1 WAY)

One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	4				
F	2962				
R square	0.9991				
ANOVA Table					
	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	791.8	3	263.9		
Residual (within columns)	0.7128	8	0.08910		
Total	792.6	11			
Tukey's Multiple Comparison Test					
	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Féverole entière vs Cotylédon févero	-0.1080	0.6267	No	ns	-0.8885 to 0.6725
Féverole entière vs Tégument févero	-18.87	109.5	Yes	***	-19.65 to -18.09
Féverole entière vs Pois chiche	-0.2220	1.288	No	ns	-1.003 to 0.5585
Cotylédon féverole vs Tégument féve	-18.76	108.9	Yes	***	-19.54 to -17.98
Cotylédon féverole vs Pois chiche	-0.1140	0.6615	No	ns	-0.8945 to 0.6665
Tégument féverole vs Pois chiche	18.65	108.2	Yes	***	17.87 to 19.43

Table 1 : Résultats d'analyse de la variance par 1 way ANOVA pour dosage des composés phénoliques en poly phénol totaux dans les mucilages purs.

One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	4				
F	997.0				
R square	0.9973				
ANOVA Table					
	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	1.754	3	0.5845		
Residual (within columns)	0.004690	8	0.0005863		
Total	1.758	11			
Tukey's Multiple Comparison Test					
	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Féverole entière vs Cotylédon févero	0.01020	0.7297	No	ns	-0.05311 to 0.07352
Féverole entière vs Tégument fevero	-0.9061	64.82	Yes	***	-0.9694 to -0.8428
Féverole entière vs Pois chiche	-0.09541	6.825	Yes	**	-0.1587 to -0.03210
Cotylédon féverole vs Tégument feve	-0.9163	65.54	Yes	***	-0.9796 to -0.8530
Cotylédon féverole vs Pois chiche	-0.1056	7.555	Yes	**	-0.1689 to -0.04230
Tégument fevero vs Pois chiche	0.8107	57.99	Yes	***	0.7474 to 0.8740

Table 2 : Résultats d'analyse de la variance par 1 way ANOVA pour les teneurs en flavonoïdes dans les mucilages purs.

One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	4				
F	751.1				
R square	0.9965				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	0.02115	3	0.007048		
Residual (within columns)	7.507e-005	8	9.384e-006		
Total	0.02122	11			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Féverole entière vs Cotylédon féverole	0.002700	1.527	No	ns	-0.005310 to 0.01071
Féverole entière vs Téguments féverole	-0.09511	53.78	Yes	***	-0.1031 to -0.08710
Féverole entière vs Pois chiche	0.002700	1.527	No	ns	-0.005310 to 0.01071
Cotylédon féverole vs Téguments féverole	-0.09781	55.30	Yes	***	-0.1058 to -0.08980
Cotylédon féverole vs Pois chiche	0.0	0.0	No	ns	-0.008010 to 0.008010
Téguments féverole vs Pois chiche	0.09781	55.30	Yes	***	0.08980 to 0.1058

Table 3 : Résultats d'analyse de la variance par 1 way ANOVA pour les teneurs en flavonols dans les mucilages purs

P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	5				
F	4816				
R square	0.9995				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	15278	4	3820		
Residual (within columns)	7.930	10	0.7930		
Total	15286	14			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Féverole entière vs Cotylédon féverole	3.280	6.380	Yes	**	0.8872 to 5.673
Féverole entière vs Tégument féverole	-66.84	130.0	Yes	***	-69.23 to -64.45
Féverole entière vs Pois chiche	-5.380	10.46	Yes	***	-7.773 to -2.987
Féverole entière vs Acide ascorbique	-64.32	125.1	Yes	***	-66.71 to -61.93
Cotylédon féverole vs Tégument féverole	-70.12	136.4	Yes	***	-72.51 to -67.73
Cotylédon féverole vs Pois chiche	-8.660	16.84	Yes	***	-11.05 to -6.267
Cotylédon féverole vs Acide ascorbique	-67.60	131.5	Yes	***	-69.99 to -65.21
Tégument féverole vs Pois chiche	61.46	119.5	Yes	***	59.07 to 63.85
Tégument féverole vs Acide ascorbique	2.520	4.900	Yes	*	0.1267 to 4.912
Pois chiche vs Acide ascorbique	-58.94	114.6	Yes	***	-61.33 to -56.55

Table 4 : Test de la variance 1 way ANOVA de l'activité antiradicalaire du DPPH entre les extraits du mucilage pur

One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	5				
F	4816				
R square	0.9995				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	15278	4	3820		
Residual (within columns)	7.930	10	0.7930		
Total	15286	14			
Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Acide ascorbique vs Féverole entière	64.32	88.46	Yes	***	62.22 to 66.42
Acide ascorbique vs Cotylédon féverole	67.60	92.97	Yes	***	65.50 to 69.70
Acide ascorbique vs Tégument féverole	-2.520	3.465	Yes	*	-4.621 to -0.4178
Acide ascorbique vs Pois chiche	58.94	81.06	Yes	***	56.84 to 61.04

Table 5 : Test de la variance 1 way ANOVA de l'activité antiradicalaire du DPPH entre les extraits du mucilage pur par rapport aux standard (acide ascorbique).

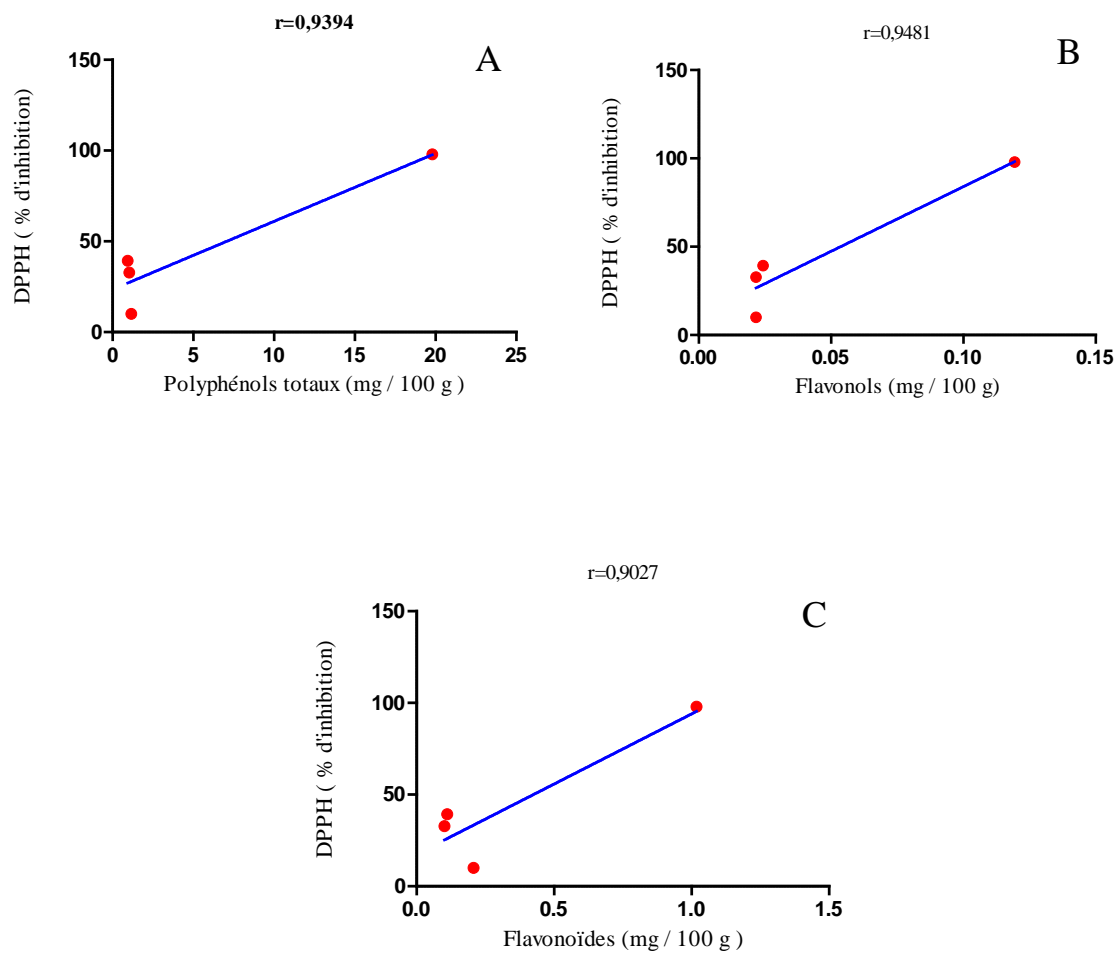
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	5				
F	8005				
R square	0.9997				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	6.030	4	1.508		
Residual (within columns)	0.001883	10	0.0001883		
Total	6.032	14			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Féverole entière vs Cotylédon féverole	-0.0230	2.903	No	ns	-0.05987 to 0.01387
Féverole entière vs Tégument féverole	-0.4993	63.02	Yes	***	-0.5362 to -0.4625
Féverole entière vs Pois chiche	-0.04433	5.595	Yes	*	-0.08121 to -0.007458
Féverole entière vs Acide ascorbique	-1.658	209.2	Yes	***	-1.695 to -1.621
Cotylédon féverole vs Tégument féverole	-0.4763	60.12	Yes	***	-0.5132 to -0.4395
Cotylédon féverole vs Pois chiche	-0.02133	2.692	No	ns	-0.05821 to 0.01554
Cotylédon féverole vs Acide ascorbique	-1.635	206.3	Yes	***	-1.672 to -1.598
Tégument féverole vs Pois chiche	0.4550	57.43	Yes	***	0.4181 to 0.4919
Tégument féverole vs Acide ascorbique	-1.158	146.2	Yes	***	-1.195 to -1.121
Pois chiche vs Acide ascorbique	-1.613	203.6	Yes	***	-1.650 to -1.576

Table 6: Test de la variance 1 way ANOVA de pouvoir réducteur entre les extraits du mucilage pur

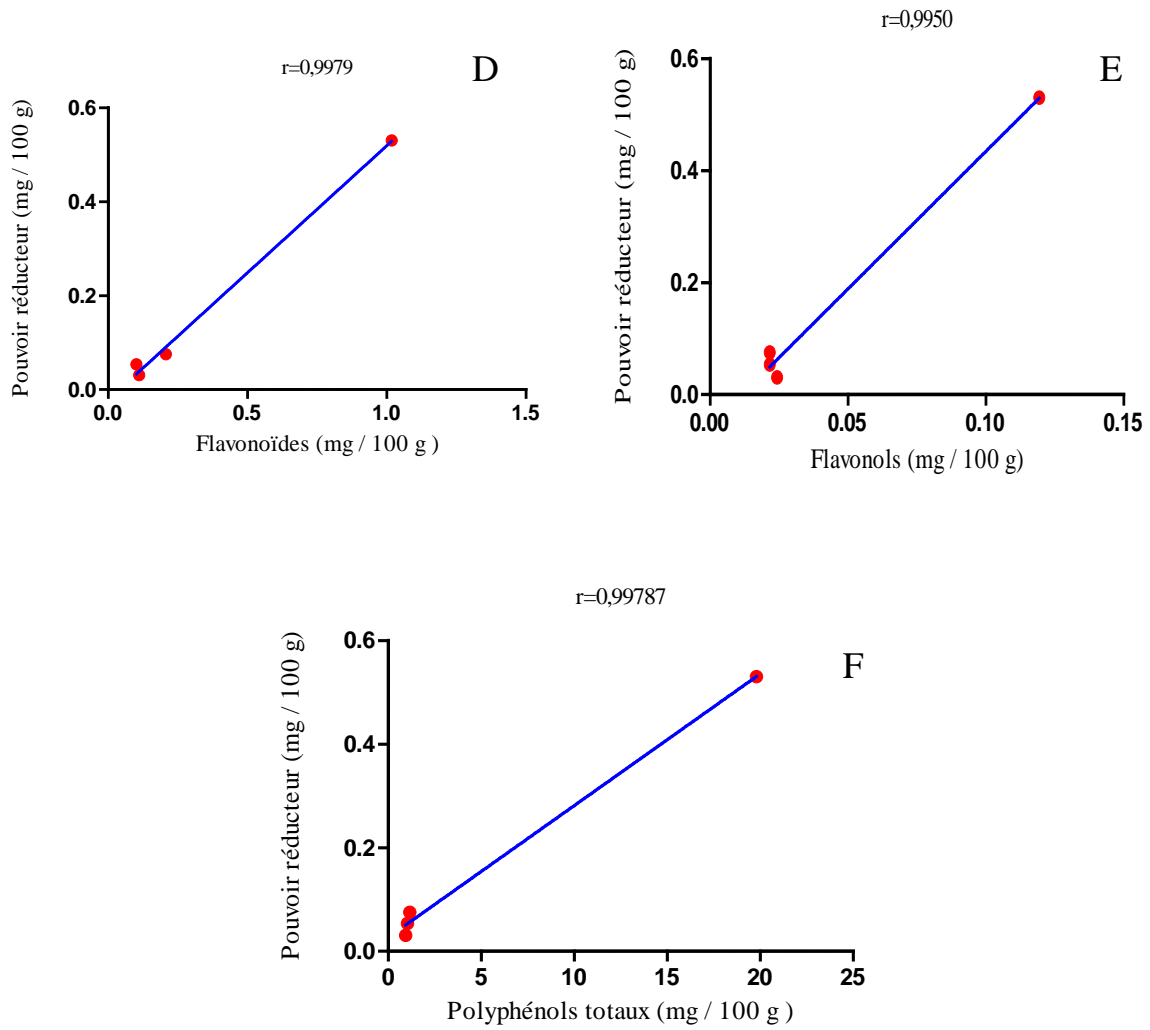
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	5				
F	8005				
R square	0.9997				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	6.030	4	1.508		
Residual (within columns)	0.001883	10	0.0001883		
Total	6.032	14			
Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Acide ascorbique vs Féverole entière	1.658	147.9	Yes	***	1.625 to 1.690
Acide ascorbique vs Cotylédon féverole	1.635	145.9	Yes	***	1.602 to 1.667
Acide ascorbique vs Tégument féverole	1.158	103.4	Yes	***	1.126 to 1.191
Acide ascorbique vs Pois chiche	1.613	144.0	Yes	***	1.581 to 1.646

Table 7 : Test de la variance 1 way ANOVA de pouvoir réducteur entre les extraits du mucilage pur par rapport aux standard (acide ascorbique).

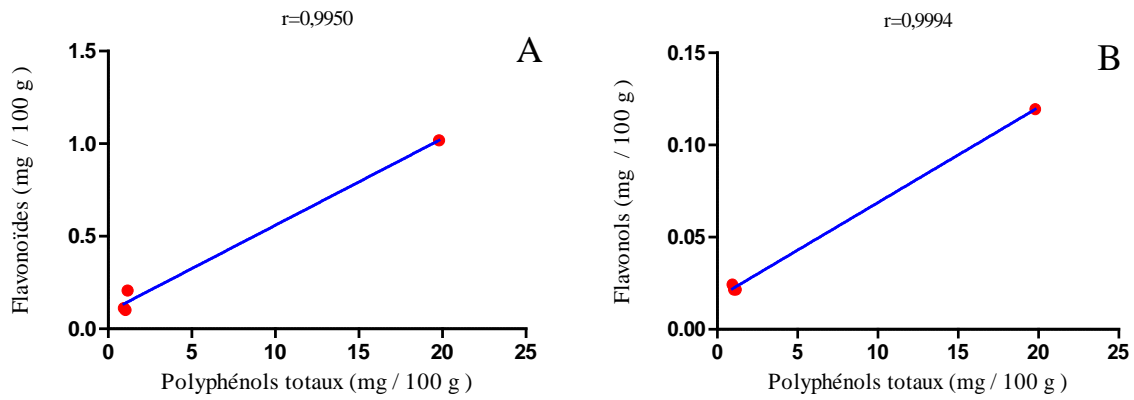
Annexes des corrélations



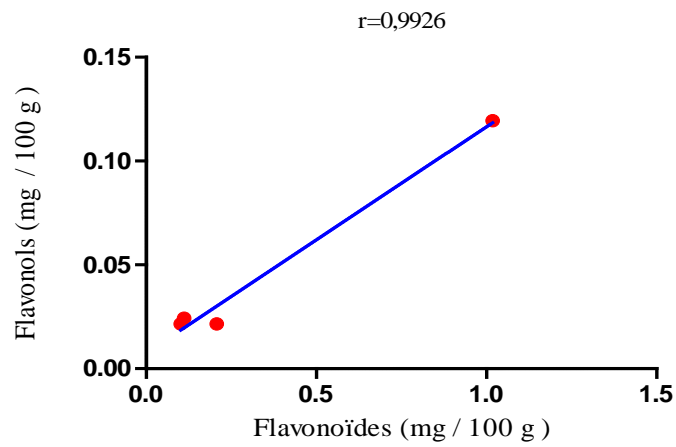
Corrélation entre l'activité antiradicalaire et les teneurs en polyphénols totaux (A), flavonols (B) et flavonoïdes (C).



Corrélation entre le pouvoir réducteur et les teneurs en flavonoïdes (D), flavonols (E), polyphénols totaux (F).



Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes (A), et flavonols (B)



Corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et flavonols.

Annexe des courbes d'étalonnages

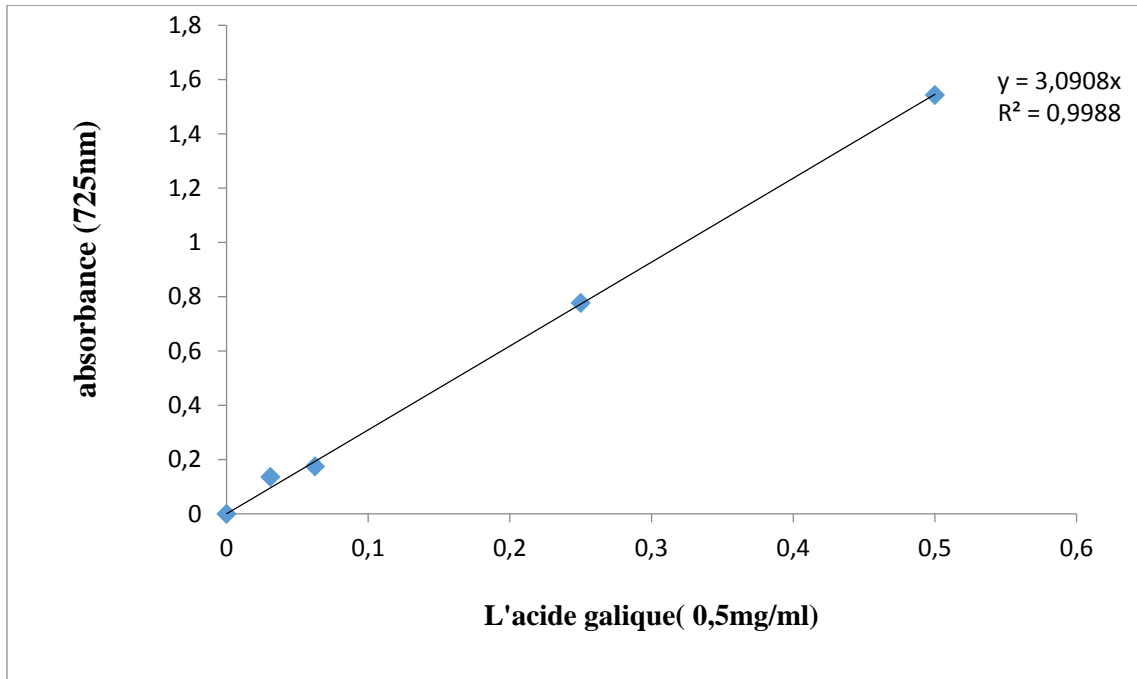


Figure1 : courbe d'étalonnage des polyphénols totaux

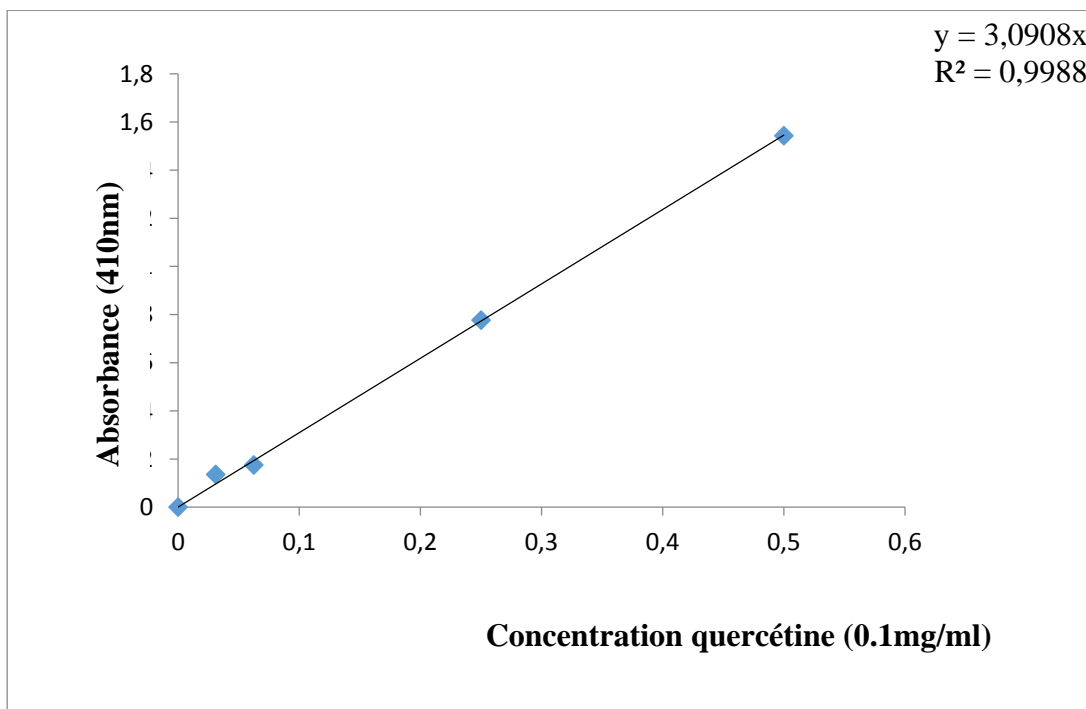


Figure2 : courbe d'étalonnage des flavonoïdes et flavonols

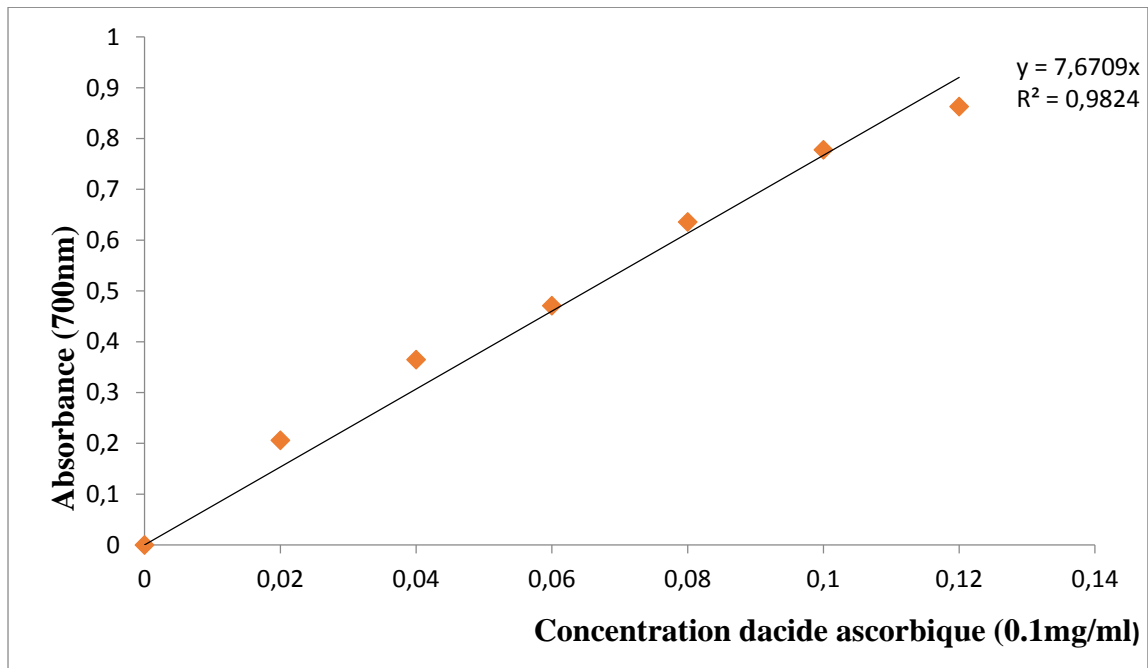


Figure3 : courbe d'étalonnage de pouvoir réducteur

Annexe des groupements homogènes des paramètres fermentaire pH, TTA et UFC

PH

LSD test; variable PH_J1 (kefir stat.sta)					
Homogenous Groups, alpha = ,05000					
Error: Between MS = 12,556, df = 12,000					
		PH_J1			
	TRETEM	Mean	1	2	3
1	K	101	****		
2	K+in	104	****	****	
3	K+WF	107	****	****	****
4	K+CF	110		****	****
6	K+CP	110,666667			****
5	K+TF	113			****

LSD test; variable PH_J7 (kefir stat.sta)			
Homogenous Groups, alpha = ,05000			
Error: Between MS = 2812,7, df = 12,000			
		PH_J7	
	TRETEM	Mean	1
3	K+Femp	41,3333333	****
4	K+Fcmp	41,6666667	****
5	K+Ftmp	78,6666667	****
6	K+Pcmp	79,3333333	****
1	K	114,666667	****
2	K+in	115,666667	****

LSD test; variable PH_J14 (kefir stat.sta)			
Homogenous Groups, alpha = ,05000			
Error: Between MS = 2850,9, df = 12,000			
	TRETEM	Mean	1
5	K+Ftmp	41,6666667	****
1	K	41,6666667	****
2	K+in	42	****
4	K+Fcmp	79,3333333	****
3	K+Femp	117,666667	****
6	K+Pcmp	118	****

LSD test; variable PH_J21 (new.sta)			
Homogenous Groups, alpha = ,05000			
Error: Between MS = 1168,4, df = 12,000			
		PH_J21	
	TREATMN	Mean	1
4	K+Fcmp	71,6666667	****
5	K+Ftmp	73	****
1	K	101	****
3	K+Femp	103	****
2	K+in	103	****
6	K+Pcmp	109,333333	****

LSD test; variable PH_J28 (new.sta)			
Homogenous Groups, alpha = ,05000			
Error: Between MS = 629,44, df = 12,000			
		PH_J28	
	TREATMN	Mean	1
4	K+Fcmp	74,3333333	****
1	K	101	****
2	K+in	104	****
5	K+Ftmp	106,666667	****
3	K+Femp	107	****
6	K+Pcmp	109	****

TTA

LSD test; variable TTA_J1 (ttable stat ph.sta)			
Homogenous Groups, alpha = ,05000			
Error: Between MS = 2,1111, df = 12,000			
		TTA_J1	
	TREATMN	Mean	1
1	K	105,333333	****
5	K+Ftmp	105,666667	****
3	K+Femp	106,333333	****
4	K+Fcmp	107	****
2	K+in	107,333333	****
6	K+Pcmp	107,666667	****

LSD test; variable TTA_J7 (ttable stat ph.sta)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = 1208,8, df = 12,000				
		TTA_J7		
	TREATMN	Mean	1	2
2	K+in	35,666667	****	
5	K+Ftmp	70,666667	****	****
1	K	104,666667		****
3	K+Femp	105,333333		****
4	K+Fcmp	105,333333		****
6	K+Pcmp	105,666667	****	****

LSD test; variable TTA_J14 (ttable stat ph.sta)			
Homogenous Groups, alpha = ,05000			
Error: Between MS = 1,3333, df = 12,000			
		TTA_J14	
	TREATMN	Mean	1
6	K+Pcmp	104,333333	****
4	K+Fcmp	104,666667	****
3	K+Femp	105	****
1	K	105	****
5	K+Ftmp	106	****
2	K+in	106,333333	****

LSD test; variable TTA_J21 (ttable stat ph.sta)			
Homogenous Groups, alpha = ,05000			
Error: Between MS = 3,2222, df = 12,000			
		TTA_J21	
	TREATMN	Mean	1
3	K+Femp	111,333333	****
1	K	112	****
2	K+in	113,666667	****
6	K+Pcmp	114	****
5	K+Ftmp	114,333333	****
4	K+Fcmp	114,333333	****

LSD test; variable TTA_J28 (ttable stat ph.sta)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = 710,22, df = 12,000				
		TTA_J28		
	TREATMN	Mean	1	2
2	K+in	38,6666667	****	
5	K+Ftmp	114		****
1	K	114,3333333		****
3	K+Femp	115,6666667		****
4	K+Fcmp	117		****
6	K+Pcmp	117,6666667		****

UFC :

LSD test; variable CFU_J1 (ttable stat tta.sta)						
Homogenous Groups, alpha = ,05000						
Error: Between MS = 4,0000, df = 12,000						
		CFU_J1				
	TREATMN	Mean	1	2	3	4
1	K	129	****			
2	K+in	132	****	****		
3	K+Femp	135	****	****	****	
4	K+Fcmp	138		****	****	****
6	K+Pcmp	141			****	****
5	K+Ftmp	141			****	****

LSD test; variable CFU_J7 (ttable stat tta.sta)						
Homogenous Groups, alpha = ,05000						
Error: Between MS = 5,8889, df = 12,000						
		CFU_J7				
	TREATMN	Mean	1	2	3	4
1	K	123	****			
2	K+in	126	****	****		
3	K+Femp	129	****	****	****	

6	K+Pcmp	130,666667			****	
4	K+Fcmp	132		****	****	****
5	K+Ftmp	135				****

LSD test; variable CFU_J14 (ttable stat tta.sta)							
Homogenous Groups, alpha = ,05000							
Error: Between MS = 1,0000, df = 12,000							
		CFU_J14					
	TREATMN	Mean	1	2	3	4	5
1	K	126	****				
2	K+in	129		****			
3	K+Femp	132	****		****		
4	K+Fcmp	135	8,8723E-06	****		****	
5	K+Ftmp	138	1,2386E-07		****		****
6	K+Pcmp	141	4,9071E-09			****	

LSD test; variable CFU_J21 (ttable stat tta.sta)							
Homogenous Groups, alpha = ,05000							
Error: Between MS = 1,0000, df = 12,000							
		CFU_J21					
	TREATMN	Mean	1	2	3	4	5
1	K	133	****				
2	K+in	136		****			
3	K+Femp	139	****		****		
4	K+Fcmp	142		****		****	
5	K+Ftmp	145			****		****
6	K+Pcmp	148				****	

LSD test; variable CFU_J28 (ttable stat tta.sta)							
Homogenous Groups, alpha = ,05000							
Error: Between MS = 1,0000, df = 12,000							
		CFU_J28					
	TREATMN	Mean	1	2	3	4	5
1	K	138	****				
2	K+in	141		****			
3	K+Femp	143			****		
4	K+Fcmp	146				****	
5	K+Ftmp	149			****		****
6	K+Pcmp	152				****	

Résumé

Les légumineuses dont la féverole et le pois chiche contiennent des glucides complexes (fibres, amidon et oligosaccharides résistants) protéines, vitamines et minéraux ainsi que des antioxydants importants.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante ainsi que le potentiel prébiotique des mucilages de féverole (*Vicia faba L.*) et du pois chiche (*Cicer arietinum*) en utilisant le kéfir comme model fermentaire. Les mucilages sont extraits à l'eau distillée sous agitation pendant 3h à 60°C suivi d'un traitement enzymatique et d'une purification par dialyse. 10 ml des mucilages de féveroles décortiquées, pois chiche et inuline sont incorporée dans le kéfir. Nous avons suivi pendant les 28 jours de stockage à froid la viabilité microbienne, pH et l'acidité titrable totale (TTA).

Le dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et flavonols ont été utilisés pour la détermination des teneurs en composés phénoliques ainsi que la détermination de l'activité antioxydante (pouvoir réducteur et activité inhibitrice du DPPH) de tous les mucilages. Les résultats de cette étude montrent que le nombre de bactéries pendant les 28 jours de stockage est significativement plus élevé ($P < 0.05$) dans le kéfir supplémenté de mucilage et inuline par rapport au control (kéfir sans poudre), à chaque semaine nous enregistrons une augmentation de l'acide lactique (0.55% à 1.05) dans les kéfirs et une diminution global du pH. Les résultats obtenus montrent que le mucilage de féverole est plus riche en polyphénols totaux, flavonoïdes et flavonols, que le pois chiche. Le mucilage de tégument présente l'activité antioxydante la plus élevé avec un taux d'inhibition de 97,87% % contre le radical DPPH et un pouvoir réducteur de 0,51mg AAC/g. De ceci on tir que les mucilages de nos graines sont une bonne source d'antioxydants et de Prébiotique capable d'améliorer la formulation du kéfir d'un point de vue nutritionnel.

Mots clés : Kéfir, *Vicia faba L.*, *Cicer arietinum*, mucilages, activité Antioxydante, composés phénoliques, kéfir.

Abstract

Legumes including faba beans and chickpeas contain complex carbohydrates (fiber, resistant starch and oligosaccharides) protein, vitamins and minerals and important antioxidants.

The objective of this study is to evaluate the antioxidant activity and the prebiotic potential of mucilage faba bean (*Vicia faba L.*) and chickpea (*Cicer arietinum*) using the model as kefir fermentation. Mucilage are extracted with distilled water with stirring for 3 h at 60 ° C followed by enzymatic treatment and purification by dialysis. 10 ml shelled beans of mucilage, chickpea and inulin are incorporated in kefir. We followed during 28 days of cold storage microbial viability, pH and total titrable acidity (TTA).

The determination of total polyphenols, flavonoids and flavonoid were used for the determination of levels of phenolic compounds and the determination of antioxidant activity (inhibitory activity reducing power and DPPH) of all mucilage. The results of this study showing that the number of bacteria during the 28 days of storage was significantly higher ($P < 0.05$) in kefir supplemented with inulin and mucilage compared to control (powder-free kefir), every week we record increases in lactic acid (0.55% to 1.05) in the kefir and a global decrease in pH. The results obtained show that the mucilage faba bean is richer in total polyphenols, flavonoids and flavonols, then chickpea. The seed coat mucilage present in the highest antioxidant activity with an inhibition rate of 97.87% against the radical DPPH and reducing power of AAC 0,51mg / g. From this we shot the mucilage of our seeds are a good source of antioxidants and Prebiotic able to improve the formulation of kefir from a nutritional point of view.

Keywords: Kefir, *Vicia faba L.*, *Cicer arietinum*, mucilage, Antioxidant activity, phenolic compounds, kefir.