



Croissance et viabilité des Bifidobactéries dans le lait écrémé additionné de miel d'abeille

Ali Riazi , Hasnia Ziar

Laboratoire des micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS), Département de Biotechnologie, Université Abdelhamid Ibn Badis BP 300, Mostaganem 27000 -Algérie.

Résumé

Trois souches expérimentales (BLE, Bbv-1 et Bbv-2) et une souche de référence (BLR) appartenant au genre *Bifidobacterium* ont été étudiées d'une part, sur le plan de leur cinétique de croissance et d'acidification dans le lait écrémé reconstitué (10% : P/V) additionné de 5 ou 10% de miel monofloral ou polyfloral, et d'autre part, sur le plan de leur viabilité post-fermentaire pendant 28 jours d'entreposage à 4°C. Les résultats obtenus ont montré que, selon la souche considérée, les deux types de miel utilisés aux deux différentes concentrations (5 et 10%) améliorent significativement la croissance ($P < 0.05$) dans un ordre de grandeur de 3 à 22.22 % et la production d'acides organiques ($P < 0.05$) de 1.6 à 19.3 %. En ce qui concerne l'activité post-acidifiante des souches bifides dans le lait fermenté entreposé à 4°C, le miel polyfloral utilisé à 10% permet la poursuite de la synthèse d'acides dont l'intensité la plus élevée générant le pH le plus bas (4.9) a été enregistrée chez la souche *B. longum* BLE. Le nombre de cellules bifides viables a été nettement amélioré par la présence du miel dans le lait fermenté et dépasse largement ($P < 0.05$) le niveau requis par la législation ($> 10^6$ cellules/ g). Cette amélioration par rapport aux témoins (sans miel) est variable de 17 à 42% selon la souche.

Mots clés : Bifidobactéries ; Lait écrémé ; Miel ; Croissance ; Acidification ; Viabilité

1. Introduction

Si l'introduction des bifidobactéries en industrie laitière s'est faite il y a plus d'une vingtaine d'années dans les pays technologiquement avancés, elle n'est par contre, pas encore envisageable dans certains autres pays comme l'Algérie. Cette situation est liée aux contraintes posées par le genre *Bifidobacterium* qui est très sensible à l'acidité développée dans le lait et à l'aérobiose relative qui y règne. Ce genre est rarement utilisé seul en raison de ses faibles aptitudes fermentaires sur milieu lait et il est souvent associé aux bactéries lactiques classiques telles que *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Dans ce cas de cultures associées, la survie des bifidobactéries reste faible [6]. Néanmoins, cette survie peut-être sensiblement améliorée par l'addition de substances indigestes communément appelées «prébiotiques» [20 ; 2]. Parmi les prébiotiques les plus utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, il y a l'inuline et l'oligo-fructose [15]. Le miel d'abeille est

un produit noble réputé doué de nombreuses propriétés thérapeutiques et dont l'utilisation par l'homme à cet effet remonte à l'antiquité. De nombreuses études avaient souligné l'action inhibitrice du miel sur divers microorganismes pathogènes [13 ;12 ;14]. Cependant, l'influence du miel sur la croissance des bactéries lactiques et des bifidobactéries sur le milieu lait n'a fait l'objet que de très peu de travaux. Selon Lagrange et *al.* [11], le miel a été utilisé pour exalter la saveur des yaourts et des crèmes glacées.

En ce qui concerne les bifidobactéries, plusieurs publications ont rapporté que leur croissance et leur survie dans le lait et dans le tractus gastro-intestinal étaient stimulées par la présence du miel d'abeille [5 ; 22 ; 9 ; 21]. L'idée d'ajouter du miel à des préparations de lait fermenté par des bifidobactéries en vue d'améliorer les aptitudes fermentaires de ces microorganismes constitue le point de départ de cette étude qui a été complétée par l'évaluation de leur viabilité au cours de l'entreposage à 4°C pendant 4 semaines.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériels

2.1.1. Origine du Matériel biologique

2.1.1.1. Les souches bifides

Les trois souches bifides expérimentales étudiées ; codées : BLE, Bbv-1 et Bbv-2 proviennent de la collection du laboratoire de sécurité alimentaire et santé (Université de Mostaganem) où elles ont été isolées à partir de selles de bébés en bonne santé, ne recevant pas de traitement antibiotique, nourris exclusivement au sein, et âgés de 2 à 3 semaines. La souche *B. longum* codée BLR (*B. longum* B612, Institute of Agrarian and Technical Microbiology, Université de Milan, Italie), a été prise comme une souche de référence.

2.1.1.2. Les miels utilisés

Le miel local utilisé dans cette étude est un miel polyfloral d'Eucalyptus et de Génévrier, de couleur légèrement brune, récolté dans la forêt de Bouguirat (wilaya de Mostaganem). Le deuxième miel utilisé est un miel monofloral (Tilleul : Apiculteurs associés, France) de couleur jaune à blanc nacré.

2.1.2. Conditions et types de cultures

2.1.2.1. Les milieux de culture

Le dénombrement des souches bifides a été effectué sur milieu MRS lactosé (MRS-L : MRS avec 5% lactose; Difco, Detroit, MI) selon le protocole de De Man et al. [7].

2.1.2.2. Les différents types de cultures sur milieu lait avec ou sans miel

Des inocula de 5% pris de chaque pré-monoculture, sont propagés individuellement dans des flacons contenant le lait écrémé stérile (témoin) ou le lait additionné de miel pasteurisé (échantillon) et distribués dans des tubes stériles de 10 mL. Ainsi, les tubes de lait sont incubés à 37°C dans une jarre d'anaérobiose (Coy Laboratory Products, Inc., Ann Arbor, MI).

2.2. Méthodes

2.2.1. Détermination de la cinétique de croissance

Un échantillon de 1mL est utilisé pour préparer une dilution adéquate, permettant la détermination de la quantité de biomasse bactérienne (log UFC/mL). Les vitesses spécifiques maximales de croissance ($\mu_{max}/\Delta t$) de chaque culture bactérienne pure ou mixte, additionnée ou non de miel; sont calculées selon l'équation donnée par Desjardins et al. [8].

2.2.2. Détermination de la cinétique d'acidification

Un échantillon est recueilli avant le démarrage (0 h), puis à chaque 2 h d'intervalle pendant la fermentation pour la mesure du pH. Les vitesses maximales d'acidification ($\Delta pH_{max} / \Delta t$) de chaque culture bactérienne pure, additionnée ou non de miel; sont calculées selon l'équation donnée par Desjardins et al. [8].

2.2.3. Suivi de la post-acidification du lait fermenté entreposé à 4°C

La post-acidification des laits fermentés entreposés à +4°C est suivie par la mesure du pH pendant 28 jours de conservation.

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

Le nombre de cellules viables, déterminé 3 fois, est calculé à partir de colonies appropriées obtenues après incubation sur milieu adéquat et exprimé en log UFC/g. le premier dénombrement est effectué 24h après la fin de fermentation (analyse J1). Le taux de survie est calculé selon l'équation donnée par Ustunol et Gandhi [22].

2.2.5. Validation statistique des résultats

Chaque expérience a été indépendamment répétée trois fois dans un dispositif en randomisation totale et les résultats obtenus ont été soumis à l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant le logiciel StatBox version 6.4 (1999). A $P < 0.05$, la différence est considérée significative.

3. Résultats et discussion

3.1. Effet prébiotique du miel sur les aptitudes fermentaires des bifidobactéries sur lait

3.1.1. Effet sur la cinétique de croissance

Le lactose comme substrat dans les cultures témoin, est très bien métabolisé, car c'est une bonne source de carbone et d'énergie pour les bifidobactéries [3].

Les laits fermentés contenant les bifidobactéries possèdent de nombreux avantages nutritionnels et technologiques : une post-acidification limitée, un goût doux et la formation de l'acide lactique L(+) physiologiquement désirable [17]. En présence de miel, la capacité des souches bifides à croître sur milieu lait semble être stimulée et améliorée ($P < 0.05$) étant donné que leur phase de latence est raccourcie à seulement 2 h.

Avec 5% de miel dans le milieu, la croissance des souches bifides est stimulée par rapport aux témoins ($P < 0.05$) exceptées Bbv-2 et BLE en présence de miel monofloral où la différence avec les témoins n'est pas significative ($P > 0.05$) (fig 1-A et 1-B).

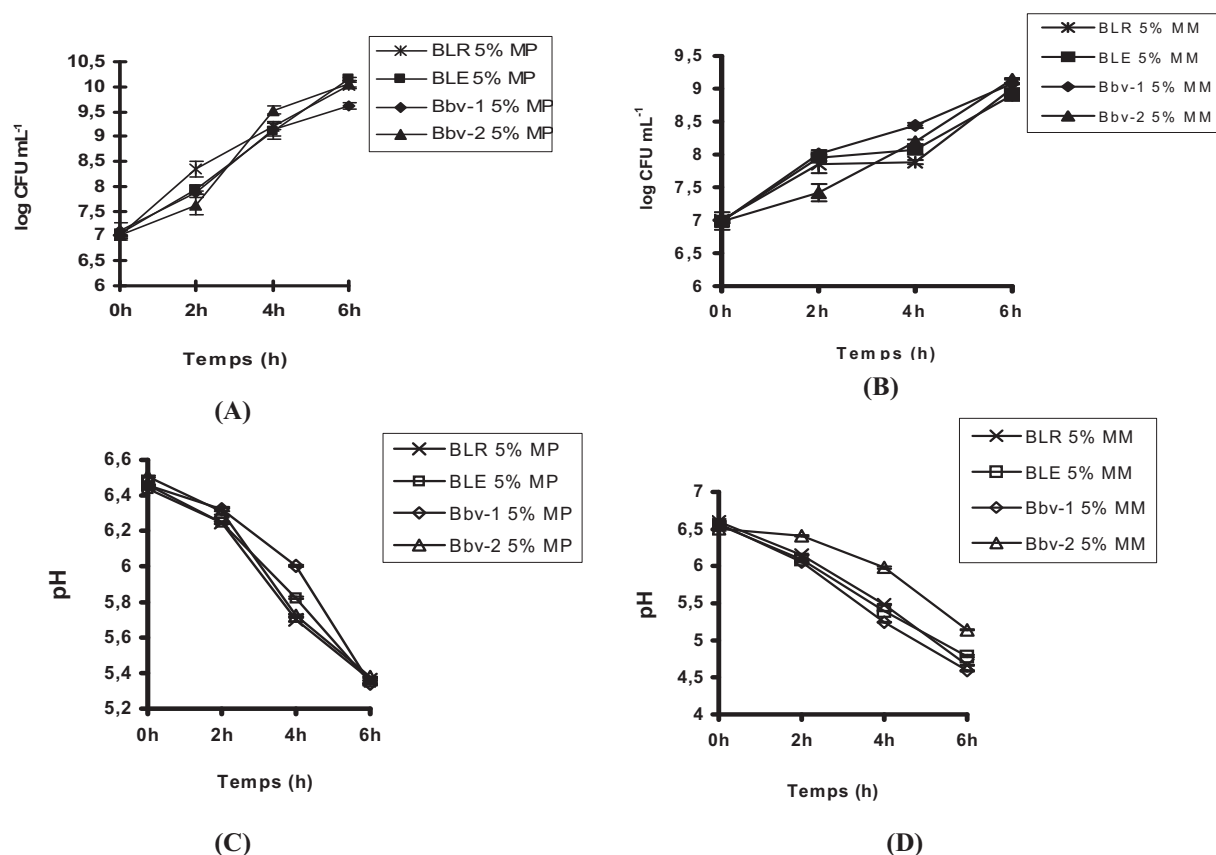


Fig. 1. Cinétiques de croissance (A et B) et d'acidification (C et D) des souches bifides : BLR (x, x), BLE (■, ■), Bbv-1 (◆, ◆) et Bbv-2 (▲, ▲) cultivées dans le lait écrémé additionné de 5% miel polyfloral (MP) ou monofloral (MM) à 37°C en anaérobiose. Dans toutes les cultures, l'inoculum de 5% a été ajusté à une concentration finale de 1×10^7 CFU mL⁻¹. Les valeurs sont la moyenne (m) de 3 déterminations \pm SD (n=3).

Les quantités de biomasse atteintes en fin de fermentation par les souches BLR, BLE, Bbv-1 et Bbv-2 sont comprises entre 8.9 et 10.2 log UFC/mL (fig.4 -C).

Les vitesses spécifiques de croissance enregistrées par ces mêmes souches (BLR, BLE, Bbv-1 et Bbv-2) cultivées en présence de 5% de miel sont plus élevées (0.65 à 1.41h⁻¹). En conséquence, le temps de génération (Tg) a été considérablement raccourci en présence de miel. Selon la souche considérée, le miel utilisé à 5% a permis d'améliorer la quantité de biomasse accumulée à la coagulation de 10 à 18% avec le miel polyfloral et de 3.4 à 5% avec le miel monofloral. Nos résultats sont en accord avec ceux de Ustunol et Gandhi [22] et de Chick et al. [5].

Avec 10% de miel, les quantités de biomasse sont encore plus meilleures que celles observées avec 5% de miel polyfloral (P<0.05) ou monofloral (P<0.05) (fig. 2A et 2B). Nous avons enregistré des niveaux de biomasse de

8.9 à 10.6 log UFC/mL et des vitesses spécifiques de croissance très appréciables, de l'ordre de 0.55 à 1.38 h⁻¹. Il y a lieu de remarquer qu'à 10%, le miel améliore plus la croissance des souches bifides sur milieu lait. Là encore, le miel polyfloral semble plus efficace (10.12 à 22.22% d'amélioration) que le miel monofloral (3 à 4.11% d'amélioration) dans cette action. Ainsi, le miel utilisé aux concentrations de 5% et 10% améliore la capacité des souches bifides à se multiplier et n'est pas inhibiteur. Nos résultats sont en accord avec ceux de Chick et al. [5], Ustunol et Gandhi [22], Kajiwarra et al. [9], et de Shin et Ustunol [22].

L'effet stimulateur du miel a été attribué à son contenu en fraction fructo-oligosaccharides (FOS) qui se trouve encore renforcé par les taux élevés de glucose et de fructose. Selon Kajiwarra et al. [9], le miel stimule la croissance des bifidobactéries tout comme les FOS, les galacto-oligosaccharides (GOS) et l'inuline.

3.1.2. Effet sur la cinétique d'acidification

L'activité de synthèse d'acides organiques, traduite en terme d'abaissement de valeurs de pH, se trouve significativement ($P < 0.05$) améliorée par le miel par rapport aux témoins (fig. 1-C, 1-D, 2-C, 2-D). Ainsi, même en culture pure, les bifidobactéries arrivent, grâce au miel, à donner un caillé de texture acceptable en un temps de fermentation remarquable. Le miel de tilleul (monofloral) utilisé à 5% permet aux souches BLR, BLE et Bbv-1 de faire diminuer le pH du lait à 5.5 après 4 h de fermentation (fig. 1-D). Les valeurs de pH à la coagulation diminuent d'une manière significative ($P < 0.05$), de 1.3 à 2 unités de pH; soit une amélioration dans l'activité acidifiante aux alentours de 10 à 20%. Les

vitesses d'acidification correspondantes étaient aussi améliorées (0.31 à 0.38 h^{-1}).

En revanche, l'abaissement du pH était médiocre avec le miel polyfloral comparativement au miel monofloral ($P < 0.05$) et nous avons enregistré des valeurs entre 6 et 5.7 après 4h de fermentation (fig.1-C). Cependant, toutes les souches affichent à la coagulation une valeur de pH acide; ce qui correspond à un abaissement ($P < 0.05$) de 1 à 1.2 unités de pH et ce comparativement aux cultures témoins. Les vitesses d'acidification étaient en moyenne de 0.2 h^{-1} . Ces valeurs de pH permettent de calculer une amélioration dans l'activité acidifiante des souches bifides de l'ordre de 2.4 à 7%.

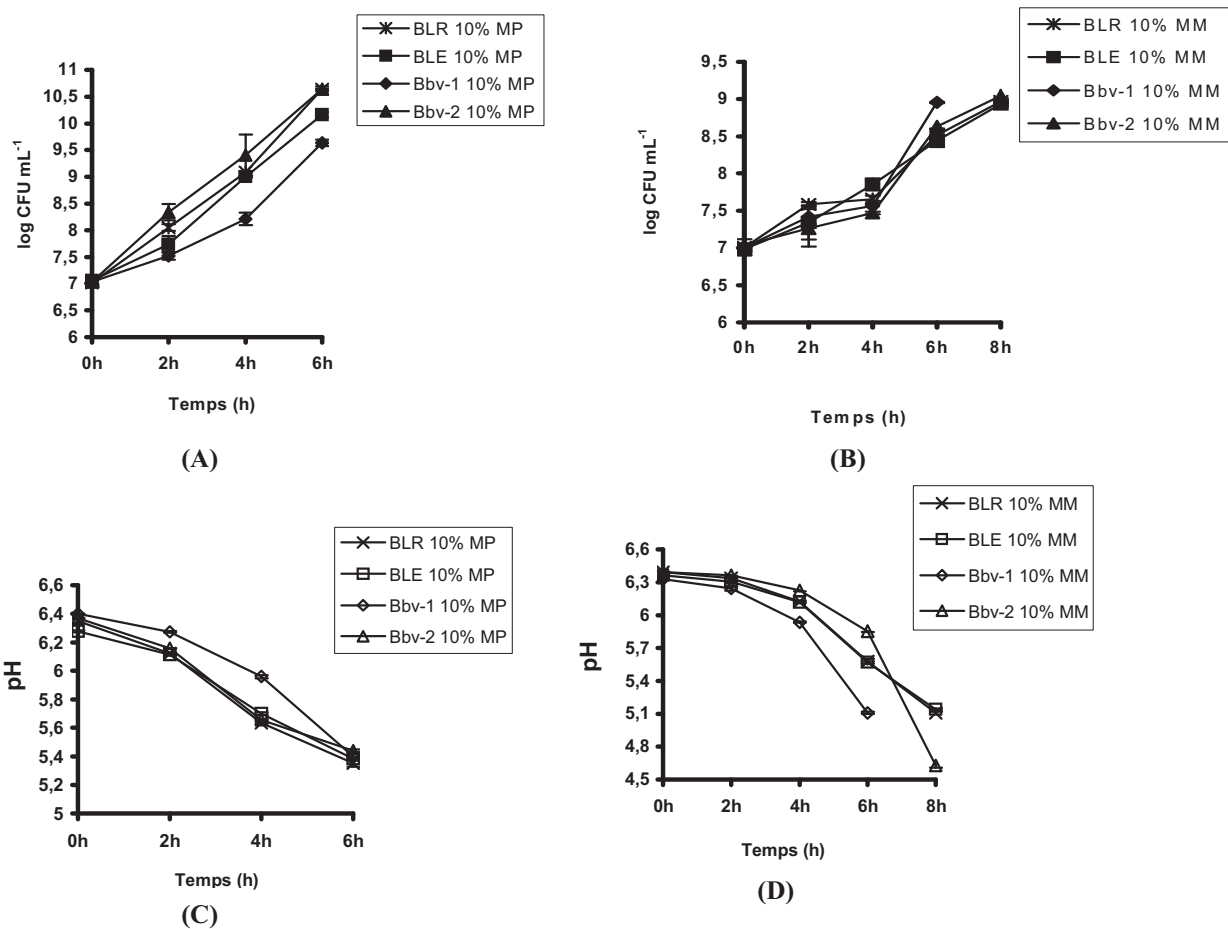


Fig. 2. Cinétique de croissance (symbols clos) et d'acidification (symbols ouverts) des souches bifides : BLR (x, x), BLE (■, □), Bbv-1 (♦, ◇) et Bbv-2 (▲, △) cultivées dans le lait écrémé additionné de 10% miel polyfloral (MP) ou monofloral (MM) à 37°C en anaérobiose. Dans toutes les cultures, l'inoculum de 5% a été ajusté à une concentration finale de $1 \times 10^7 \text{ CFU mL}^{-1}$. Les valeurs sont la moyenne (m) de 3 déterminations \pm SD (n=3).

Nos résultats vont de pair avec ceux de Ustunol et Gandhi [22] et de Chick et al. [5]. Tous ces résultats, s'accordent pour confirmer l'effet stimulateur du miel à 5% de l'activité acidifiante des bifidobactéries.

Dans le cas du miel monofloral, le fait de doubler sa concentration dans le lait (10%) provoque une redynamisation de la souche Bbv-2 qui était la moins acidifiante en présence de 5% de miel, et dont la diminution en valeur de pH qu'elle induit ($P < 0.05$) était

de l'ordre de 1.76 unités avec une vitesse d'acidification de 0.26h^{-1} pouvant être à l'origine de l'amélioration de la consistance du caillé. Les autres souches bifides produisent moins d'acides comparées aux témoins, avec 10% de miel monofloral qu'avec 5%. En présence de 10% de miel, l'activité acidifiante des souches bifides est améliorée de 1.6 à 6% avec le miel polyfloral et de 6.6 à 19.3% avec le miel monofloral (fig. 2-C et 2-D).

Selon Roberfroid et al. [16], les FOS accentuent plus l'acidification des milieux de culture que l'inuline.

3.2. Viabilité et activité post-acidifiante des bifidobactéries dans le lait fermenté en présence de miel et conservé 28 jours à 4°C

3.2.1. Evolution de la biomasse bifide au cours de la conservation

La conservation frigorifique à 4°C est utilisée dans le but de garder un nombre minimum de cellules viables et qui est fixé à 10^6 log UFC/mL par la législation [1]. Le pH final du yaourt peut affecter la viabilité des souches bifides [19]. Selon Vinderola et al. [23], un pH inférieur ou égal à 4.5, compromet la viabilité des microorganismes probiotiques dans les yaourts conservés à 5°C.

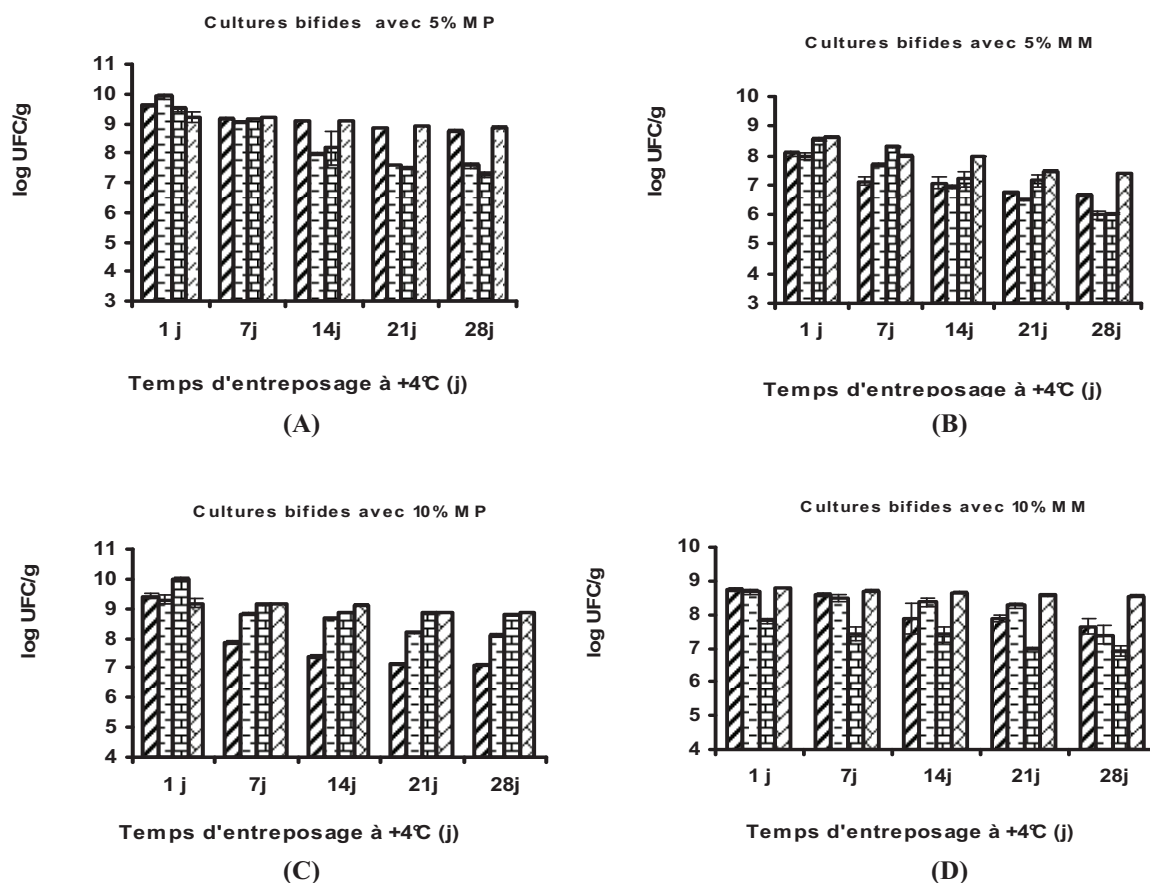


Fig. 3. Viabilité des cultures des souches bifides : BLR (▨), BLE (▤), Bbv-1 (▥) et Bbv-2 (▧) dans les laits fermentés à 37°C et entreposés à 4°C. (A) : avec 5% de miel polyfloral (MP), (B) : avec 5% de miel monofloral (MM), (C) : avec 10% de miel polyfloral (MP) et (D) : avec 10% de miel monofloral (MM). Tous les laits fermentés sont issus de cultures dont l'inoculum est ajusté à une concentration finale de 1.10^7 UFC/mL et utilisé à 5%. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 3 déterminations \pm SD (n=3).

Selon nos résultats, le miel diminue les pertes en biomasse lors de la conservation du lait fermenté à 4°C ($P < 0.05$). D'une manière générale, la perte de viabilité des souches bifides était moindre en présence de 5% de

miel ($P < 0.05$) qu'il soit d'origine mono- ou polyflorale (fig. 3-A et B), et ceci plus avec les souches Bbv-2 et de référence qu'avec les deux autres souches bifides étudiées. Cette préservation de la viabilité pourrait être

liée aux grandes quantités de biomasse accumulées au cours de la fermentation du lait par Bbv-2 et BLR.

L'amélioration de la viabilité des souches bifides, en présence de 5% de miel et en termes de pourcentage par rapport au milieu témoin, était de l'ordre de 6 à 42% ($P < 0.05$).

Toutes les souches bifides testées ont montré une meilleure viabilité après 4 semaines d'entreposage à 4°C, et nous avons remarqué des quantités de biomasse de plus de 6 log UFC/mL avec le miel de monofloral et plus de 7.2 log UFC/mL avec le miel polyfloral.

Avec les laits fermentés additionnés de 10% de miel, les pertes en biomasse étaient remarquables dès le 7^{ème} jour ($P < 0.05$); plus avec le miel polyfloral qu'avec le miel monofloral (fig. 3. C et D). En revanche, les pourcentages de survie en fin d'entreposage sont de

l'ordre de 74 à 83% dans les laits fermentés additionnés de miel polyfloral et de l'ordre de 77 à 95% dans ceux contenant le miel monofloral ($P < 0.05$).

Bruno *et al.* [4] ont montré que la viabilité la plus élevée des bifidobactéries était de l'ordre de 75.3% quand les souches de *B. longum* (Bb-3) et *B. animalis* (Bb-5) ont été testées avec le maïs à haute teneur en amylose. Ces résultats corroborent avec des rapports récents [2] sur la propriété des fructo-oligosaccharides (FOS) à stimuler la viabilité des bifidobactéries dans le lait écrémé reconstitué durant 4 semaines de conservation à 4 °C.

Shin *et al.* [20] ont observé dans le cas de deux souches de bifidobactéries une meilleure viabilité après 4 semaines de conservation à 4°C, et ceci quand le lait est additionné de 5% de FOS.

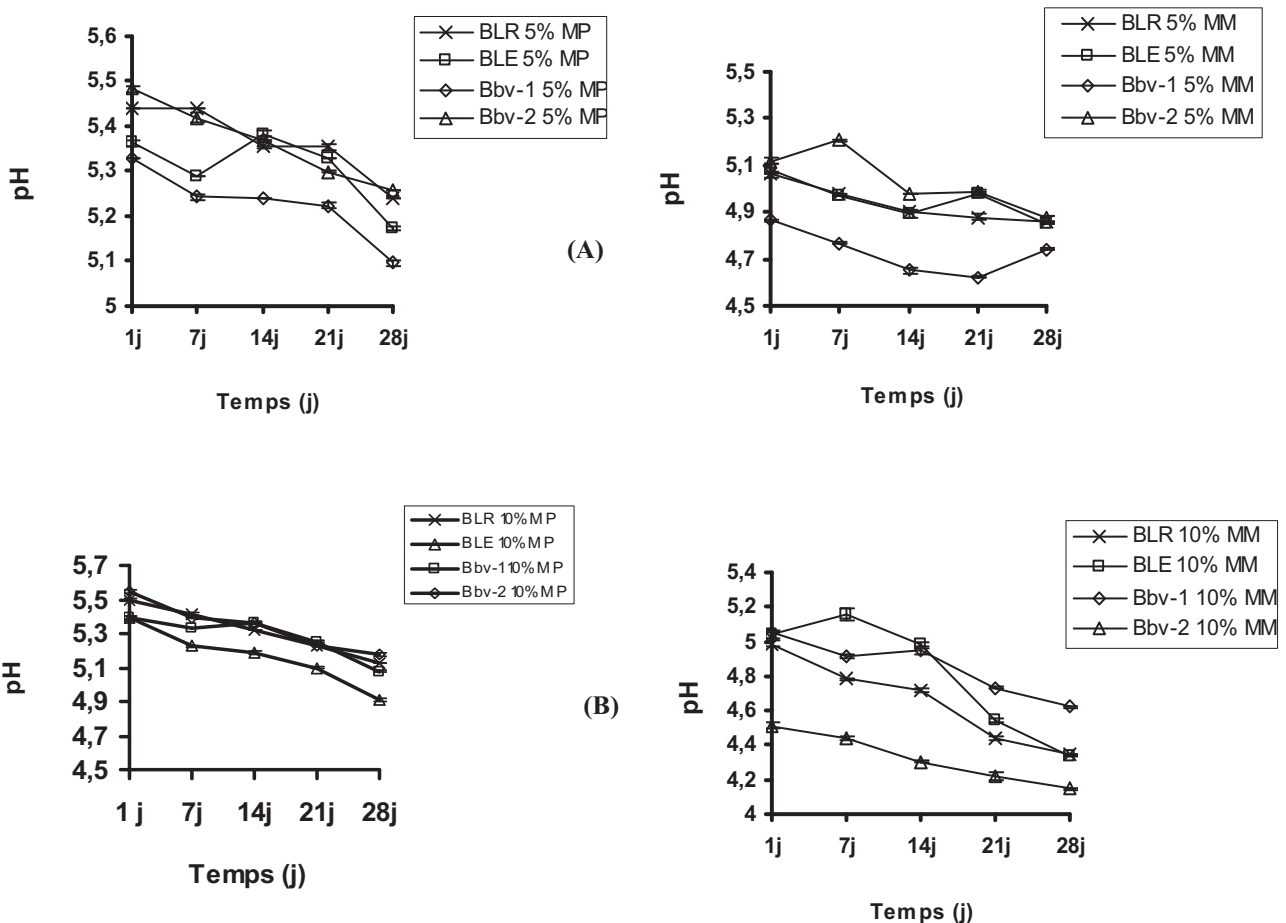


Fig. 4. Post-acidification au cours de l'entreposage à 4°C du lait fermenté à 37°C par les souches bifides : BLR (x), BLE (□), Bbv-1 (◇) et Bbv-2 (Δ). (A) : cultures contenant 5% miel polyfloral (MP) ou monofloral (MM), (B) : cultures contenant 10% miel polyfloral (MP) ou monofloral (MM). Tous les laits fermentés sont issus de cultures où l'inoculum de 5% a été ajusté à une concentration finale de 1×10^7 CFU mL⁻¹. Les valeurs sont la moyenne (m) de 3 déterminations \pm SD (n=3).

L'amélioration de la viabilité des souches bifides en présence de 10% de miel et par rapport au lait fermenté témoin (sans miel), était significative ($P < 0.05$), et variable de 17 à 49% selon la souche considérée.

Toutes les souches bifides étudiées ont affiché une meilleure viabilité après 4 semaines d'entreposage à 4°C et nous avons observé des quantités de biomasse de plus de 7 log UFC/mL avec les deux types de miel. Nos

résultats sont en accord avec la majorité des études de survie des probiotiques en présence des FOS.

Les taux de viabilité améliorés témoignent de l'avantage de l'utilisation du miel d'abeille comme substrat prébiotique et ingrédient protecteur des cellules bactériennes dans le cas de son introduction dans les produits laitiers fermentés type «synbiotiques».

3.2.2. Effet miel sur l'activité post-acidifiante des monocultures de bifidobactéries

A 5% de concentration de miel et contrairement au milieu témoin, la souche bifide Bbv-1 qui est la plus acidifiante ($P < 0.05$), semble maintenir son activité post-acidifiante jusqu'au 21^{ème} jour d'entreposage où le pH qui diminue de 0.24 unité a tendance à augmenter légèrement (fig. 4-A). D'une manière générale, le miel qu'il soit mono- ou polyfloral exerce un effet protecteur en conservant l'activité post-acidifiante des bifidobactéries testées. La souche Bbv-2 suit globalement le comportement acidifiant des *B. longum* et génère une post-acidification semblable ($P > 0.05$) jusqu'au 21^{ème} jour, soit un abaissement de 0.2 unité pH (fig. 4-A).

Avec 10% de miel polyfloral, les souches BLR, Bbv-1 et Bbv-2 restent toutes actives après 28 jours d'entreposage à 4°C, en produisant de bonnes quantités d'acides organiques (fig. 4-B). Cette activité post-acidifiante a abouti à un abaissement de 0.4 unité pH, soit un effet double de celui observé avec 5% de miel. La souche bifide BLE est la plus acidifiante ($P < 0.05$) et affiche un pH plus bas en fin d'entreposage, soit une diminution de 0.5 unité pH. Klaver et al. [20] et Shah [18] recommandent un pH supérieur ou égal à 4.6 pour maintenir la survie des bifidobactéries.

Avec le miel monofloral, les souches *B. breve* affichent la même allure d'évolution du pH qu'en présence du miel polyfloral, alors que la fourchette d'augmentation (0.7 unité pH) n'est pas significative entre le début et la fin de conservation pour les *B. longum* ($P > 0.05$). Les valeurs de pH enregistrées en fin d'entreposage sont de l'ordre de 4.14 à 4.62 (fig. 4-B).

Les deux miels testés aux concentrations de 5 ou 10% stimulent ($P < 0.05$) la capacité de croissance de toutes les souches bifides étudiées (3 à 22.22%) et améliorent leur activité de synthèse d'acides organiques ($P < 0.05$) (1.6 à 19.3%) sur milieu lait.

4. Conclusion

D'une manière générale, la perte de viabilité des souches bifides en culture pure était moindre en présence de 5% ou 10% de miel ($P < 0.05$) qu'il soit d'origine mono- ou polyflorale.

Toutes les souches bifides étudiées ont affiché des quantités de biomasse de plus de 7 log UFC/mL avec les deux types de miel et la souche Bbv-2 était la plus résistante aux inconvénients de la conservation frigorifique.

Des biomasses persistantes de l'ordre de 7.4 à 8.8 log UFC/mL ont été enregistrées après 28 jours d'entreposage.

Le miel à 5% de concentration et qu'il soit mono- ou polyfloral exerce un effet protecteur ($P < 0.05$) en conservant l'activité post-acidifiante des bifidobactéries testées. Avec 10%, seulement le miel monofloral exerce un effet stimulateur ($P < 0.05$) de l'activité acidifiante des souches durant 28 jours d'entreposage à 4°C.

Références

- [1] AFSSA (Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments), Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte. X. Quelles perspectives d'application des futurs probiotiques génétiquement modifiés (2005).
- [2] A.S. Akalin, S. Fenderya, et N. Akbulut, Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligo-saccharide during refrigerated storage, International Journal of Food Science and Technology, 39 (2004) 613–621 613
- [3] M. Bielecka, E. Biedrzycka, A. Majkowska, Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness, Food Research International, 35 (2002) 125–131.
- [4] F.A. Bruno, W.E.V. Lankaputhra, et N.P. Shah, Growth, viability and activity of *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing prebiotics, Journal of Food Science, 67(2002) 2740–2744.
- [5] H. Chick, H.S. Shin, et Z. Ustunol, Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria in skim milk containing honey, Journal of Food Science, 66 (2001) 478–481.
- [6] R.I. Dave, et N.P. Shah, Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures, International Dairy Journal, 7 (1997) 537–545.
- [7] J.C. De Man, M. Rogosa, et M.E. Sharpe, A medium for the cultivation of lactobacilli, Applied Bacteriology, 23 (1960) 130–135.
- [8] M.L. Desjardins, D. Roy, et J. Goulet, β -Galactosidase and proteolytic activities of bifidobacteria in milk: A preliminary study, *Milchwissenschaft* (1991), 46(1), 11–13.
- [9] S. Kajiwara, G. Hasand et Z. Ustunol, Effect of honey on growth and acid production by intestinal *Bifidobacterium* spp: An *in vitro* comparison to commercial oligosaccharides and inulin, Journal of Food Protection, 65 (2002) 214–218.
- [10] F.A.M. Klaver, F. Kingma, et A.H. Weerkamp, Growth and survival of bifidobacteria in milk, Netherland Milk Dairy Journal, 47 (1993) 151–164.
- [11] V. LaGange, D. Hoppa, C. Mupoperi, US food industry is "sweet" on honey. American Bee Journal (1991), 131 (7): 447–458.
- [12] P.E. Lusby, A.L. Coombes, et J.M. Wilkinson, Bactericidal Activity of Different Honeys against Pathogenic Bacteria, Archives in Medical Research, 36 (2005) 464–467.
- [13] P.C. Molan, The antibacterial activity of honey. 1. The nature of antibacterial activity, Bee World, 73 (1992) 5–28.
- [14] T. Nagai, R. Inoue, N. Kanamori, N. Suzuki, T. Nagashima, Characterization of honey from different floral sources. Its

- functional properties and effects of honey species on storage of meat, *Food Chemistry*, 97 (2006) 256-262.
- [15] M.B. Roberfroid, Health benefits of non digestible oligosaccharides, *Advances in Experimental Medicine Biology*, 427 (1997) 211-219.
- [16] M.B. Roberfroid, J.A. Van Loo, et G.R. Gibson, The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products, *Journal of Nutrition*, 128 (1998) 11-19.
- [17] A. Samona, R.K. Robinson, et S. Marakis, Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk, *Food Microbiology*, 13 (1996) 275-280.
- [18] N.P. Shah, Bifidobacteria: Characteristics and potential for application in fermented milk products, *Milchwissen*, 52 (1997) 16-21.
- [19] N.P. Shah, W.E.V. Lankapulhra, M.L. Britz, et W.S.A. Kyle, Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yogurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 5 (1995) 515-521.
- [20] H.S. Shin, J.H. Lee, J.J. Pestka et Z. Ustunol, Growth, activity and viability of commercial *Bifidobacterium* spp in skim milk containing oligosaccharides and inulin, *Journal of Food Science*, 65 (2000) 884-887.
- [21] H.S. Shin et Z. Ustunol, Carbohydrate composition of honey from different floral sources and their influence on growth of selected intestinal bacteria: An *in vitro* comparison, *Food Research International*, 38(2005) 721-728.
- [22] Z. Ustunol, et H. Gandhi, Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp in honey-sweetened skim milk, *Journal of Food Protection*, (2001), 64(11): 1775-1779.
- [23] C.G.Vinderola, W. Prosello, D. Ghiberto, et J.A. Reinheimer, Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinian fresco cheese, *Journal of Dairy Science*, 83 (2000) 1905-1911.