



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université Abdelhamid Ibn Badis –Mostaganem-

جامعة عبد الحميد بن باديس مستغانم

Faculté des Science de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département des sciences agronomiques

قسم العلوم الزراعية

Mémoire de Magister en Sciences Agronomiques

Option

« Hygiène et Sécurité Alimentaire »

Présenté le 19 Mars 2014 par Mr :

ABDELLAH RAHALI

Sous le thème

*Effet de divers biomatériaux d'encapsulation sur la survie de certaines bactéries lactiques d'intérêt aux hostilités digestives simulées*

*Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques , des Aliments Fonctionnels et de la Santé*

(LMBAFS)

Composition du jury de soutenance

| Nom et Prenom    | Grade | Qualité              | Appartement administrative   |
|------------------|-------|----------------------|------------------------------|
| Lotmani Brahim   | Pr    | President            | Université de Mostaganem     |
| Abbouni Bouziane | Pr    | Examineur            | Université de Sidi-Bel-Abbes |
| Benali Mohamed   | Pr    | Examineur            | Université de Sidi-Bel-Abbes |
| Ziar Hasnia      | MCB   | Examineur            | Université de Mostaganem     |
| Riazi Ali        | Pr    | Directeur de mémoire | Université de Mostaganem     |

Année Universitaire 2013-2014

A decorative graphic of a scroll with a black outline and rounded corners. The top-left and bottom-left corners are rolled up, revealing a grey interior. The text is centered within the scroll.

# **Tables des matières**

## **Table des matières**

### **Intitulé du sujet : « Effets de divers biomatériaux d'encapsulation sur la survie certaines bactéries lactiques d'intérêt aux hostilités digestives simulées »**

Résumé

Abstract

Avant propos

Listes des abréviations

Listes des tableaux et des figures

Introduction .....1

**Chapitre I. Revue bibliographique** ..... 3

I.1. Les Galactomannanes de caroube .....3

I.1.1. La gomme de caroube. ....3

I.1.1.1. Extraction et purification de la gomme de caroube .....3

I.1.1.2 : Composition chimique de la gomme de caroube .....4

I.1.2. Les Galactomannane.....6

I.1.2.1. Structure moléculaire des galactomannanes .....8

I.1.2.1.1. Teneur en galactose.....8

I.1.2.1.2. Répartition des unités galactose sur la chaîne de mannane.....8

I.1.2.1.3. Influence du degré de ramification et des interactions sur les propriétés des  
Galactomannanes.....9

I.1.2.1.3.1. Influence sur la mise en solution et la viscosité .....9

I.1.2.1.3.2. Influence sur les propriétés viscoélastiques.....9

I.1.2.1.3.3. Influence sur les propriétés émulsifiantes.....11

I.1.2.1.3.4. Influence sur la formation de complexes avec d'autres biopolymères.....11

I.2. La Microencapsulation .....12

I.2.1. Historique et définition .....12

I.2.2. Techniques d'encapsulation.....13

I.2.2.1. Technique d'extrusion .....13

I.2.2.2. Techniques d'émulsion.....16

I.2.2.2.1. Emulsification et gélification enzymatique .....16

I.2.2.2.2. Emulsification et polymérisation interfaciale .....17

|   |           |
|---|-----------|
| I.2.2.2.3. La phase continue de la technique d'émulsion .....   | 17        |
| II.2.2.2.4. Matériaux de support pour l'émulsification.....   | 18        |
| II.2.2.2.5. L'atomisation.....  | 18        |
| I.2.3. Applications et avantages de la microencapsulation des probiotiques.....   | 21        |
| I.2.3.1. Production de ferments lactiques.....  | 21        |
| I.2.3.2. La viabilité des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal .....  | 22        |
| I.2.3.3. Application dans des fermenteurs .....   | 23        |
| I.2.3.4. La production d'aliments.....  | 23        |
| I.2.3.4.1. La viabilité des probiotiques.....   | 23        |
| I.2.3.4.2. Effets de l'encapsulation sur la fixation et l'amélioration des propriétés<br>sensorielles des aliments véhicules de probiotiques..... | 26        |
| I.2.4. Facteurs influant sur l'efficacité de la microencapsulation des probiotiques .....   | 26        |
| I.2.4.1. Caractéristiques de capsule par rapport au milieu environnant .....  | 26        |
| I.2.4.2. Revêtement des capsules .....  | 27        |
| I.2.5. Les matériaux utilisés pour encapsuler des cellules probiotiques .....   | 27        |
| I.2.5.1. L'alginate .....   | 27        |
| I.2.5.2. La gomme gellane et la gomme de xanthane.....  | 28        |
| I.2.5.3. Le Kappa Carraghénane .....  | 29        |
| I.2.5.4. L'acétate phtalate de cellulose .....  | 30        |
| I.2.5.5. Le chitosane.....  | 30        |
| I.2.5.6. L'amidon.....  | 32        |
| I.2.5.7. La gélatine.....   | 32        |
| I.2.5.8. Les protéines du lait .....  | 33        |
| I.3. Capsules et contexte gastro-intestinal.....  | 33        |
| I.4. Les critères de sélection des biomatériaux pour la microencapsulation .....  | 35        |
| <b>Chapitre II: Matériels et méthodes .....</b>   | <b>36</b> |
| II.1. Matériels .....   | 36        |
| II.1.1. Les souches testées .....   | 36        |
| II.1.2. Les galactomannanes .....   | 36        |
| II.1.3. L'Alginate de sodium .....  | 36        |
| II.1.4. Les Sels biliaires.....   | 36        |
| II.1.5. Le Xanthane .....   | 36        |
| II.1.6. Les Caraghennanes .....   | 36        |
| II.1.7. Les milieux de culture .....  | 37        |

|   |           |
|---|-----------|
| II.2. Revivification et revivification .....  | 37        |
| II.2.1. Vérification de l'identité des souches .....  | 37        |
| II.2.2. Préparation de l'inoculum .....   | 37        |
| II.2.3. Ajustement de l'inoculum .....  | 37        |
| II.3. Préparation de la solution du galactomanane .....   | 38        |
| II.4. Technique d'encapsulation des cellules bactériennes .....   | 38        |
| II.5. Tests de survie des souches encapsulées aux conditions digestives simulées in vitro (model gastro-intestinal simulé).....   | 39        |
| II.6. Analyses microbiologiques .....   | 39        |
| II.7. Traitement statistique des résultats .....  | 40        |
| <b>Chapitre III : Résultats et discussion .....</b>   | <b>41</b> |
| III.1. Effets de l'encapsulation avec divers biomatériaux sur la survie in vitro de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS et <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12 aux conditions gastriques simulées.....  | 41        |
| III.1.1. Effets de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube seuls sur la survie des deux souches lactiques, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS et <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12 conditions gastriques.....                              | 41        |
| III.1.2. Effets de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés à l'alginate de sodium sur la survie des deux souches lactiques <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS et <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12 aux conditions gastriques..... | 47        |
| III.1.3. Effets de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés au carraghénane sur la survie des deux souches lactiques <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS et <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12 aux conditions gastriques.....        | 53        |
| III.1.4. Effets de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés au xanthane sur la survie des deux souches lactiques, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS et <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12 aux conditions gastriques.....           | 58        |

|   |    |
|---|----|
| III.2. Effets de l'encapsulation avec divers biomatériaux sur la survie in vitro de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS et <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12 aux conditions intestinales simulées.....  | 64 |
| III.2.1. Effets de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube <u>seuls</u> sur la survie des deux souches lactiques <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS et <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12 aux conditions intestinales.....                    | 64 |
| III.2.2. Effets de l'encapsulation aux galactomannanes de graine de caroube combinés à l'alginate de sodium sur la survie des deux souches lactiques, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS et <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12 aux conditions intestinales..... | 67 |
| III.2.3. Effets de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés au carraghénane sur la survie des deux souches lactiques <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS et <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12 aux conditions Intestinales.....        | 72 |
| III.2.4. Effets de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés au xanthane sur la survie des deux souches lactiques, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE- LSAS et <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12, aux conditions intestinales.....         | 75 |
| <b>Conclusion</b> .....   | 79 |

## **Références bibliographiques**

## **Listes des abréviations**

- LBRE-LSAS : *Lactobacillus rhamnosus*
- Bb12 : *Bifidobacterium animalis subsp lactis*
- TGI : Tractus gastro-intestinal
- DS : Dilution simple
- MRS : De Man ; Rogosa et Sharpe
- PBS : Phosphate Buffer Saline
- cm : Centimètre
- g: Gramme
- FAO : Food and Agricultural Organization.
- GG: Gome de Guar
- GM : les Galactomannanes
- GRAS : Generally Recognized as Safe
- LBG : Locust Bean Gum.
- ME : Microencapsulation
- M/G : Mannose/Galactose
- Kg : kilogramme
- mg : Milligramme
- OMS :Organisation Mondiale de la Santé
- TG : Gomme de tara
- TIC : Techniques d'Immobilisation Cellulaire
- µm: Micromètre
- UFC : Unité Formant Colonie.
- mL : Mililitre
- min : Minute
- BSH : Bile Salt Hydrolase
- Ha : Hectare
- GF : Gomme de fenugrec
- Lb : *Lactobacillus*
- B : *Bifidobacterium*
- m : mètre
- CAP : phethalate d'acétate de cellulose
- PLL : Poly-L-Lysine
- SPS : Sodium Polystyrene sulfonate

## Résumé :

Les galactomannanes constituent le composé principal de la gomme de caroube issue du fruit du caroubier, *Ceratonia siliqua* L. Il s'agit de polysaccharides de réserve que l'on retrouve dans l'endosperme translucide des graines. Ils sont désignés comme meilleurs gels à capacité épaississante et sont, par conséquent, largement utilisés comme additif alimentaire naturel (E410) dans de nombreuses préparations alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Dans cette étude, nous visons l'exploitation de cette propriété gélifiante des galactomannanes de caroube dans la microencapsulation des bactéries lactiques afin de les protéger des effets négatifs des conditions digestives simulées. Deux bactéries bénéfiques sont utilisées : *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12. Leur survie à l'état libre ou encapsulée dans le gel pur de galactomannanes de caroube ou combinés à l'alginate de sodium, au carraghénane ou au xanthane, a été déterminée après séjour en conditions digestives simulées in vitro (gastriques: pH 2, pepsine 3g/l et intestinales: bile 0.3%: P/V, pH 6.5). Les résultats obtenus montrent que l'encapsulation au gel de galactomannanes de caroube seuls ou combinés à l'alginate de sodium, le carraghénane et le xanthane améliorent la survie de ces deux souches bénéfiques aux hostilités digestives simulées. Parmi les polymères testés dans cette expérience, le xanthane combiné avec les galactomannanes apparaît le mieux adapté pour protéger les cellules contre les agressions digestives. Toutefois, les galactomannanes seuls ne semblent pas être efficaces pour garder un minimum de  $10^6$  cellules bactériennes viables lorsqu'elles sont confrontées aux conditions hostiles du tube digestif où elles seront appelées à exercer leur effet positif sur la santé. Les proportions optimales d'obtention d'un gel mixte efficace dans la protection des bactéries lactiques testées reviendraient à l'utilisation des galactomannanes et de l'alginate de sodium à des taux respectifs de 2 et 1.8% (p/v).

Mots clefs: Biomatériaux - Encapsulation- *Lactobacillus rhamnosus*-*Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* – Survie – Hostilités digestives. .



## Abstract

Galactomannans are the main components of locust bean gum issued from the fruit of the carob tree *Ceratonia siliqua* L; and represent a stored form of polysaccharides found in the translucent endosperm of seeds. They are well known as best thickening gels and are therefore widely used as a natural food additive (E410) in many food preparations, pharmaceuticals and cosmetics. In the present study, we aim to explore the gelling property of carob galactomannans when used for the microencapsulation of lactic acid bacteria in order to protect them from the negative effects of in vitro simulated digestive conditions. Two beneficial bacteria were used: *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 and *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS. Survival of free or encapsulated cells in galactomannan carob gel used alone or combined with sodium alginate, carrageenan or xanthan, was determined after exposure to the in vitro simulated gastrointestinal conditions (gastric condition: pH 2, pepsine 3 g/L, intestinal condition: bile 0.3%: W/V, pH 6.5). The obtained results have shown that survival of the two beneficial bacteria was significantly improved when encapsulated in gel carob made of galactomannans alone or combined with sodium alginate, carrageenan or xanthane. The best protective effect of cells against digestive hostilities was observed when galactomannans were combined with xanthan. There is no a such protective effect if carob galactomannans are used alone since viable cell count required was less than  $10^6$ /mL which is the less required level to allow beneficial cells exhibit their health effect in the digestive environment. The optimal combination giving rise to the best protective effect of beneficial bacteria studied is that of galactomannans (1.8%) and sodium alginate (1.2 %).

Keywords: Biocomponents - Encapsulation–*Lactobacillus rhamnosus*-*Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* - Survival – Digestive hostilities.

## **Avant propos**

Le présent mémoire a été réalisé au laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) du Professeur A. Riazi de l'Université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de mémoire, Mr RIAZI Ali, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pour la confiance qu'il m'a accordé en acceptant d'encadrer ce travail de magister, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'il a consacré à diriger cette recherche, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier Mr LOTMANI Brahim professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem pour l'honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

J'exprime mes vifs remerciements à mon enseignant en année théorique du magister, Mr BENALI Mohamed, Professeur à l'université Djillali Liabbes de Sidi-Bel-Abbès pour m'avoir honoré de sa présence et accepté d'examiner ce modeste travail.

Je remercie également Mr ABBOUNI Bouziane, Professeur à l'université Djillali Liabbes de Sidi-Bel-Abbès pour avoir accepté de participer à l'examen de ce mémoire.

J'exprime mon profond respect à mon enseignante en année théorique de ce magister, le Dr ZIAR Hasnia, Maitre de conférences classe B à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem pour toute l'aide qu'elle m'a apporté dans la réalisation de ce protocole expérimental. Je lui suis très reconnaissant et la remercie vivement pour l'examen de ce travail.

J'adresse également mes sincères remerciements à tous mes collègues étudiants de magister hygiène et sécurité alimentaire.

**Abdellah Rahali**

## **Liste des tableaux et des figures**

### **Liste des tableaux**

#### **Chapitre I : Revue bibliographique (les Galactomannanes de caroube )**

**Tableau 1:** Composition chimique (en %) de la gomme de caroube brute et purifiée (DA Silva *et al.*, 1990 ; ANDRADE *et al.*, 1999).....7

### **Listes des figures**

**Figure 1 :** diagramme d'extraction et de purification de la gomme de caroube (KAWAMURA, 2008).....5

**Figure 2.** Structure moléculaire des galactomannanes suivant le type de plante (rapport M/G : 1:1, 2:1, 3:1 et 4:1 pour les gommes de fenugrec, de guar, de tara et de caroube, respectivement), (Secouard *et al.*, 2007).....10

**Figure 3 :** Différents types de distribution des résidus de galactose le long de la chaîne de mannane : une disposition régulière (a), une disposition aléatoire (b) et une disposition en blocs uniformes (c), reproduit avec l'accord d'Elsevier (Dea *et al.*, 1975).....10

**Figure 4 :** Schéma de la Technique d'extrusion .....15

**Figure 5 :** Diagramme de la procédure d'émulsification. ....19

**Figure 6 :** Diagramme de la microencapsulation de cellules probiotiques à l'aide de présure gélification des protéines du lait .....19

**Figure 7 :** Diagramme de séchage par atomisation.....20

**Figure 8 :** Structure d'alginate (De Vos *et al.*.,2009) .....28

**Figure 9 :** la Gomme de xanthane .....31

**Figure 10 :** Structure du kappa-carrageenan .....31

#### **Chapitre III . Résultats et discussion**

**Figure11:** Effet de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube **seuls** sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (**A**) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (**B**) aux conditions gastriques simulées in vitro (3g/L pepsine et pH 2).....44

**Figure 12 :** Effet de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés à l'alginate de sodium sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (A) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (B) aux conditions gastriques simulées in vitro (3g/L pepsine et pH 2).....51

**Figure 13 :** Effet de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés au carraghénane sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (A) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (B) aux conditions gastriques simulées in vitro (3g/L pepsine et pH 2) .....57

**Figure 14 :** Effet de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés au xanthane sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (A) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (B) aux conditions gastriques simulées in vitro (3g/L pepsine et pH 2).....62

**Figure 15 :** Effet de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube **seuls** sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (A) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (B) exposées pendant 16h aux conditions intestinales simulées (0.3% bile : P/V, pH 6.5).....66

**Figure 16 :** Effet de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés à l'alginate de sodium sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (A) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (B) exposées pendant 16h aux conditions intestinales simulées in vitro (0.3% de bile et pH 6.50).....69

**Figure 17 :** Effet de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés au carraghénane sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (A) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (B) exposées pendant 16h aux conditions intestinales simulées in vitro (0.3% de bile et pH 6.50).....74

**Figure 18 :** Effet de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés au xanthane sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (A) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (B) exposées pendant 16h aux conditions intestinales simulées in vitro (0.3% de bile et pH 6.50) .....77



# **Introduction**

## **Introduction**

Les probiotiques sont des microorganismes vivants (bactéries et levures) qui exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte, surtout comme restaurateurs de la flore intestinale après un traitement aux antibiotiques contre certaines diarrhées aiguës.

L'une des difficultés majeures de l'emploi des probiotiques, c'est leur faible viabilité lors de la traversée et le séjour dans les différents compartiments du système digestif où une grande partie des cellules est perdue ou inhibée par les sécrétions biliaires. En effet, pour être efficaces dans leur rôle, ces microorganismes doivent, ensuite, coloniser l'intestin et s'y multiplier.

La faible tolérance à l'acidité de certaines espèces bactériennes nécessite la mise en œuvre de moyens de protection et de préservation de leur intégrité et de leur survie dans des milieux fortement acides comme le milieu gastrique.


L'un de ces moyens est représenté par l'encapsulation de ces cellules dans des matrices ou gels qui font office de barrière. L'encapsulation doit apporter un plus en matière de survie des souches concernées. Ce moyen de protection a trouvé une application pour le maintien en vie des microorganismes à statut probiotique, et donc d'intérêt digestif.

La microencapsulation est un procédé par lequel les cellules microbiennes sont enfermées dans une couche protectrice. L'encapsulation réduit la perte de la viabilité des cellules, en séparant les cellules bactériennes de l'environnement défavorable. La couche de protection permet de réduire la perte de cellules et de blessures en bloquant les agents agressifs ou inhibiteurs tels que l'humidité, l'oxygène de l'air et les acides ([Sultana et al., 2000](#); [Wunwisa et al., 2003](#)).

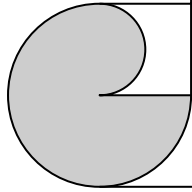
A partir des années 1990, de nouvelles formes galéniques capables d'immobiliser les ferments lactiques ont fait leur apparition; ce sont les billes à base de biopolymères comme l'alginate, les gommes de gélane et de xanthane, les carraghénanes qui sont les plus utilisés pour la microencapsulation des bactéries lactiques ([Burain et al., 2011](#)).

Le fruit du caroubier, la caroube, trouve des débouchés en industrie alimentaire, et elle est utilisée principalement sous la forme de farine et de gomme (connue mondialement sous l'appellation LBG ou Locust Bean Gum en anglo-saxon) (Kawamura,2008).

L'objectif de cette étude consiste à vérifier et comparer l'effet des biomatériaux utilisés (galactomannanes seuls, extraits a partir des endospermes des graines de caroube, ou combinés à l'alginate , les carraghenanes ou les xanthanes ) sur la survie de bactéries d'intérêt (*Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12) aux conditions digestives simulées in vitro.



**Chapitre I .**  
**Revue**  
**Bibliographique**





## **Chapitre I. Revue bibliographique**

### **I.1. Les Galactomannanes de caroube**

#### **I.1.1. La gomme de caroube.**

La gomme de caroube est composée principalement de galactomannanes. Il s'agit de polysaccharides de réserve que l'on retrouve dans l'endosperme translucide de nombreuses graines de plantes légumineuses dont celles de caroube (Daas *et al.*, 2000).

L'endosperme de caroube contient 30 à 40 % en poids de galactomannane qui est un polysaccharide composé de mannose et de galactose. Ce polysaccharide est surtout bien connu sous l'appellation « gomme de caroube », et il est surtout utilisé dans les industries alimentaires (Barracosa *et al.*, 2007, Karababa *et al.*, 2012).

En anglo-saxon, la gomme de caroube est traduite « carob bean gum » ou plus couramment « locust bean gum » (LBG). En tant qu'additif autorisé, la gomme de caroube est appelée E410. Elle est commercialisée sous forme de poudre blanchâtre (Dakia *et al.*, 2007).

La gomme de caroube est isolée à partir de l'endosperme des graines du caroubier (*Ceratonia siliqua*) et est un ingrédient largement utilisé pour épaissir et stabiliser la phase aqueuse des produits alimentaires. Le polysaccharide dans LBG brut est un galactomannane (GM) (environ 80% en masse de la gomme brute) (Pollard *et al.*, 2007; Dakia *et al.*, 2008).

En ce qui concerne les industries agroalimentaires, la gomme de caroube est utilisée dans de nombreux produits. On la rencontre dans les crèmes glacées en tant que stabilisant (Patmore *et al.*, 2003) ainsi que dans les soupes, les sauces, les bonbons, les aliments pour bébés, les produits laitiers, les boissons alcoolisées et non-alcoolisées, les aliments pour bétail, etc. (Biner *et al.*, 2007 ; Kawamura, 2008).

#### **I.1.1.1. Extraction et purification de la gomme de caroube**

Kawamura (2008) a décrit un procédé général d'extraction et de purification de la gomme de caroube à partir des gousses et plus spécifiquement des graines de caroube (fig.1). La mise en œuvre d'un tel protocole est difficile en raison de la solidité et de la dureté de l'enveloppe brune recouvrant les graines.

Les gousses de caroube doivent d'abord être concassées pour récupérer les graines qui sont débarrassées de leurs téguments.

Pour ce faire, deux procédés distincts peuvent être utilisés. Le premier consiste à carboniser les enveloppes coriaces à l'aide d'un traitement à l'acide sulfurique. Un lavage et un brossage permettent l'élimination des fragments restants et l'obtention d'une gomme de caroube blanche et de haute viscosité.

Le second procédé repose sur l'éclatement plus ou moins complet de l'enveloppe par rôtissage. Celle-ci se détache du reste de la graine. La gomme de caroube obtenue est un peu plus foncée (Dakia *et al.*, 2008 ; Kawamura, 2008).

Ensuite, les radicules sont écrasées par broyage mécanique et enlevée principalement par tamisage. Il ne reste alors plus que les endospermes qui sont broyés en fines particules. La gomme de caroube (carob bean gum) est obtenue.

Par ailleurs, la gomme de caroube peut subir différentes étapes de clarification. Dans ce cas, elle est solubilisée dans l'eau par augmentation de la température. Le matériel insoluble est ensuite éliminé par filtration.

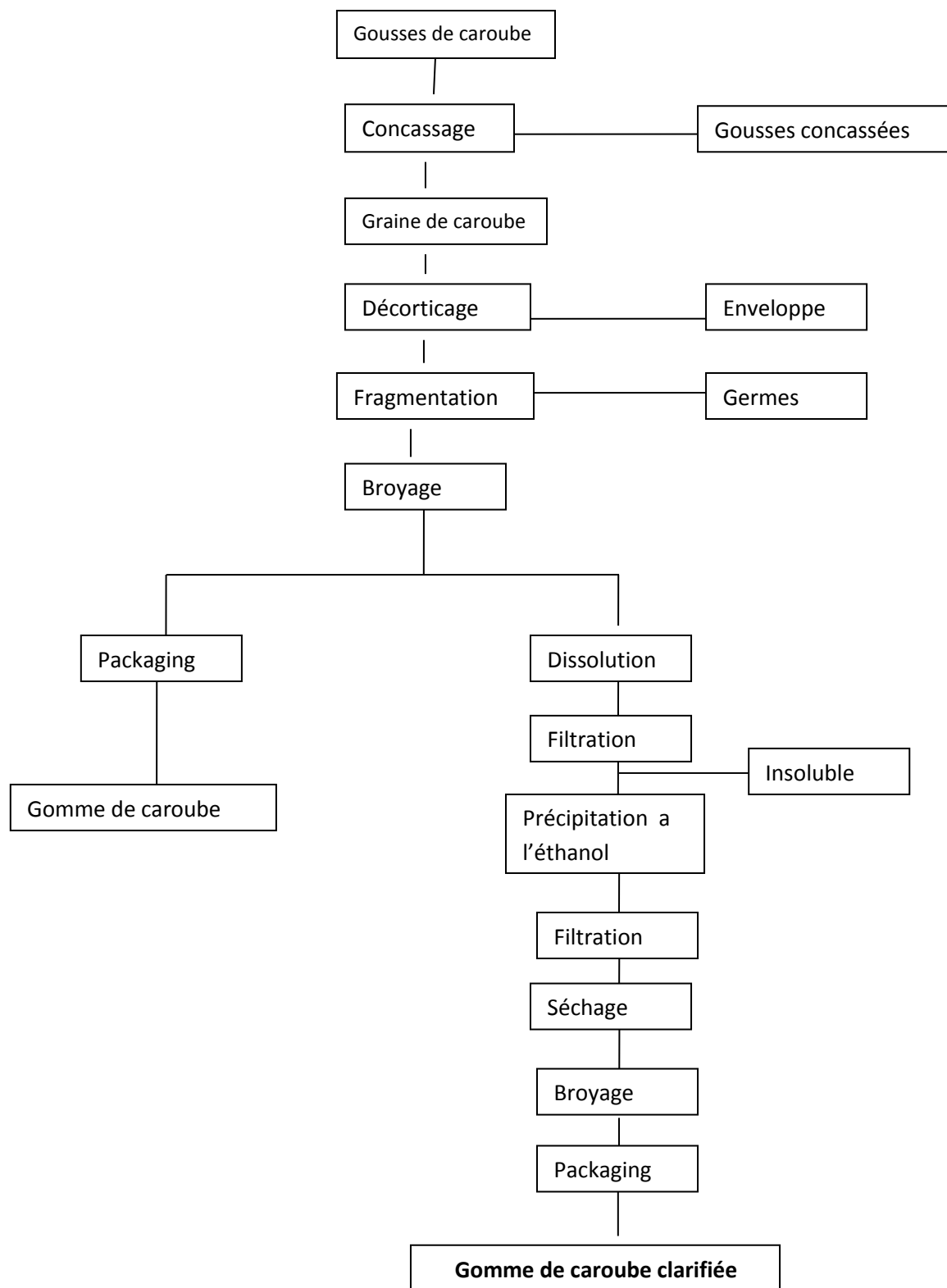
Enfin, la gomme de caroube est précipitée à l'éthanol ou l'isopropanol. Le précipité est récupéré par filtration, séché et broyé en fines particules. La gomme de caroube obtenue est dite clarifiée (extraite et purifiée) (Kawamura, 2008).

D'autres techniques d'extraction et de purification de la gomme de caroube existent dans la littérature. Ainsi, Da Silva *et al.* (1990) citent la purification au méthanol ou à l'aide de complexes de cuivre ou de baryum. L'état de purification a une grande influence sur la composition et les propriétés de la gomme de caroube.

#### **I.1.1.2 : Composition chimique de la gomme de caroube.**

Da Silva *et al.* (1990) et Andrade *et al.* (1999) ont déterminé la composition chimique d'une gomme de caroube commerciale brute et purifiée par précipitation à l'isopropanol. Leurs résultats sont présentés dans le tableau 1 et sont exprimés en pourcentage de poids sec, mis à part l'humidité qui est exprimée en poids humide.

D'une manière générale, la gomme de caroube brute contient environ 93% de galactomannanes, 4% de protéines, 1% de cellulose et de lignine, 1% de lipides et 1% de minéraux.



**Figure 1.** Diagramme d'extraction et de purification de la gomme de caroube (Kawamura, 2008).

La purification par précipitation à l'isopropanol permet d'éliminer les fibres (cellulose et lignine) et les lipides et de diminuer considérablement les quantités de minéraux et de protéines (Da Silva *et al.*, 1990).

### **I.1.2. Les Galactomannanes.**

Les galactomannanes sont des polysaccharides hydrosolubles, neutres et produits en tant que matériaux de réserve dans une large gamme de graines de légumineuses dans des quantités variables de 0,1 à 38% du poids des graines (McCleary *et al.*, 1983).

La quantité de galactomannanes présente dépend de l'espèce végétale à partir de laquelle le polysaccharide est extrait et varie d'environ 20% pour la gomme de caroube (LBG) à environ 33% pour la gomme de guar (GG) (Fernandes,1994).

Cependant, c'est seulement au 20<sup>ème</sup> siècle que les galactomannanes sont devenus des produits industriels. Ils ont de nombreuses utilisations en industrie alimentaire comme agent épaississant (crèmes glacées, mayonnaises, sauces, produits de boulangerie, etc.) et dans d'autres industries non-alimentaires [imprimerie, photographie, béton, explosifs, fluide de forage (pétrole), peinture, encre, cirage, textiles, produits de beauté, produits anti diarrhéiques, etc.] (Multon, 1984; Goycoola *et al.*, 1995; Batlle *et al.*, 1997; Garti *et al.*, 1997; Patmore *et al.*, 2003).

Parmi les galactomannanes les plus connus et les plus commercialisés, on peut citer la gomme de caroube (*Ceratonia siliqua* L.), produite principalement dans le pourtour méditerranéen; la gomme de guar (*Cyamopsis tetragonolobus* (L.) Taub.) produite en Inde, au Pakistan et aux USA; la gomme de tara (*Caesalpinia spinosa* Molina Kuntze) produite au Pérou et la gomme de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.) produite en Inde, en Chine et au Canada (Garcia-Ochoa *et al.*, 1992; Maier *et al.*, 1993; Rejeb, 1995; Batlle *et al.*, 1997). Ce sont toutes des plantes annuelles, à l'exception du caroubier.

Il existe donc plusieurs sources de galactomannanes. Ces substances ont toutes une structure générale semblable, caractérisée par la présence d'une chaîne principale de mannane sur laquelle sont greffées des ramifications d'unités galactose.

**Tableau 1 : Composition chimique (en %) de la gomme de caroube brute et purifiée**  
( Da Silva *et al.*, 1990; Andrade *et al.*, 1999).

| Constituants<br>(%)  | Da Silva <i>et al.</i> (1990) |              | Andrade <i>et al.</i> (1999) |              |
|----------------------|-------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|
|                      | LBG brute                     | LBG purifiée | LBG brute                    | LBG Purifiée |
| Humidité             | 8,49 ± 0,03                   | 12,70 ± 0.03 | 11,3                         | 7,5          |
| Cendres              | 0,71 ± 0,01                   | 0,25 ± 0,01  | 0,95                         | 0,28         |
| Protéines            | 4,66 ± 0,33                   | 0,78 ± 0,01  | 4,64                         | 0,64         |
| Lipides              | 0,92 ± 0,08                   | traces       | /                            | /            |
| Cellulose et lignine | 1,55 ± 0,08                   | 0,19 ± 0,04  | /                            | /            |
| Galactomannanes      | 92,2                          | 98,8         | 94,4                         | 99,1         |

Les galactomannanes se distinguent par le nombre d'unités galactose exprimé par le rapport mannose sur galactose (M/G), la répartition des unités galactose le long de la chaîne de mannane et aussi par leur masse molaire (Fox, 1992; Azero *et al.*, 2002). Cette différence dans la « microstructure » influencerait fortement les interactions moléculaires et les propriétés rhéologiques des solutions de galactomannanes (da Silva *et al.*, 1990; Mao *et al.*, 2006).

### **I.1.2.1. Structure moléculaire des galactomannanes.**

#### **I.1.2.1.1. Teneur en galactose.**

Les galactomannanes présentent une structure primaire similaire consistant en une chaîne principale d'unités de  $\beta$ -D-mannose liées en (1→4) avec des ramifications d'unité  $\alpha$ -D-galactose liée en (1→6) à la chaîne principale de mannane (Sabater de Sabates, 1979 ; Mallett *et al.*, 1987; McClearly *et al.*, 1988; Richardson *et al.*, 1998).

Cependant, la teneur en galactose (le degré de ramification exprimé aussi par le rapport mannose sur galactose : M/G) de ces polymères naturels est sensiblement différent (Fig. 2). Le rapport mannose sur galactose (M/G) (le nombre de résidus de mannose pour un résidu galactose) de la gomme de caroube (LBG) est approximativement égal à 4:1, tandis que celui de la gomme de tara (TG) est d'environ 3:1, celui de la gomme guar (GG) est d'environ 2:1 et celui de la gomme de fenugrec (FG) d'environ 1:1.

#### **I.1.2.1.2. Répartition des unités galactose sur la chaîne de mannane**

Il existe donc plusieurs types de galactomannanes de structure générale similaire, mais différents dans le nombre de galactose exprimé par le rapport mannose sur galactose (M/G).

De plus, la distribution des unités galactose sur la chaîne de mannose n'obéit pas à une simple répartition statistique. L'utilisation d'enzyme (telle que la  $\beta$ -mannanase issue d'*Aspergillus niger* ou de graines de guar en germination) permet de dégrader le polymère de galactomannane. L'enzyme coupe les liaisons  $\beta$ -1,4 de la chaîne de mannane aux endroits dépourvus de galactose.

L'analyse de la composition en monosaccharides sur les produits de dégradation (oligosaccharides) a permis de proposer trois types de distribution des unités galactose (fig.3) :

- une disposition ordonnée ou régulière,

- une disposition aléatoire,
- une disposition en blocs uniformes (où les « zones lisses » totalement dépourvues de ramification de galactoses alternent avec les « zones hérissées » où les résidus galactose sont présents sur toutes les unités mannose) (Dea *et al.*, 1975 ; Mc Cleary *et al.*, 1988).

### **I.1.2.1.3. Influence du degré de ramification et des interactions sur les propriétés des Galactomannanes.**

#### **I.1.2.1.3.1. Influence sur la mise en solution et la viscosité**

Les galactomannanes sont commercialisés et conservés sous forme de poudre. Lors de la mise en solution, les macromolécules contenant plus de résidus galactose seront plus facilement solubles à froid. C'est le cas du guar (M/G = 2:1) avec 40 % de galactose, qui atteint sa solubilité et sa viscosité maximum à partir de 40°C.

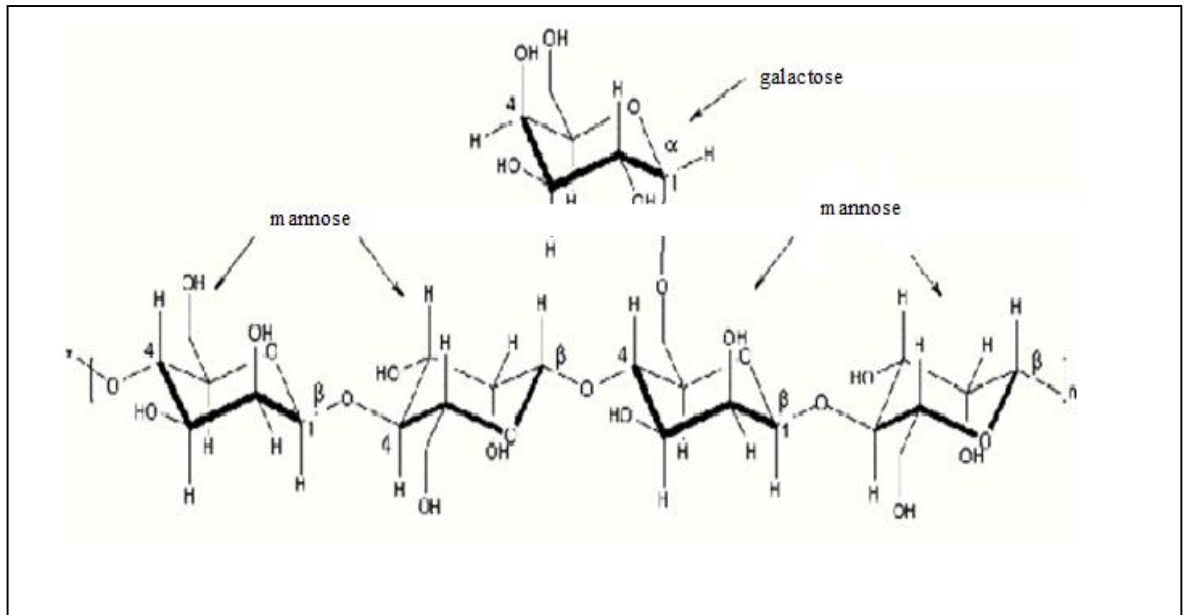
Par contre, les macromolécules peu ou pas ramifiées sont difficilement solubles et entraînent parfois la formation d'amas de polymères (grumeaux) très difficilement accessibles au solvant. Un chauffage (sous agitation forte) sera alors nécessaire pour atteindre une solubilisation et une viscosité maximales. C'est le cas de la caroube (M/G = 4:1) qui, avec 20 % de teneur en galactose, atteint sa solubilité et sa viscosité maximum à 80 °C (Doublie, 1975; Gaisford *et al.*, 1986; Maier *et al.*,1993; Fennema, 1996; Kök *et al.*, 1999; Dakia *et al.*, 2008).

#### **I.1.2.1.3.2. Influence sur les propriétés viscoélastiques.**

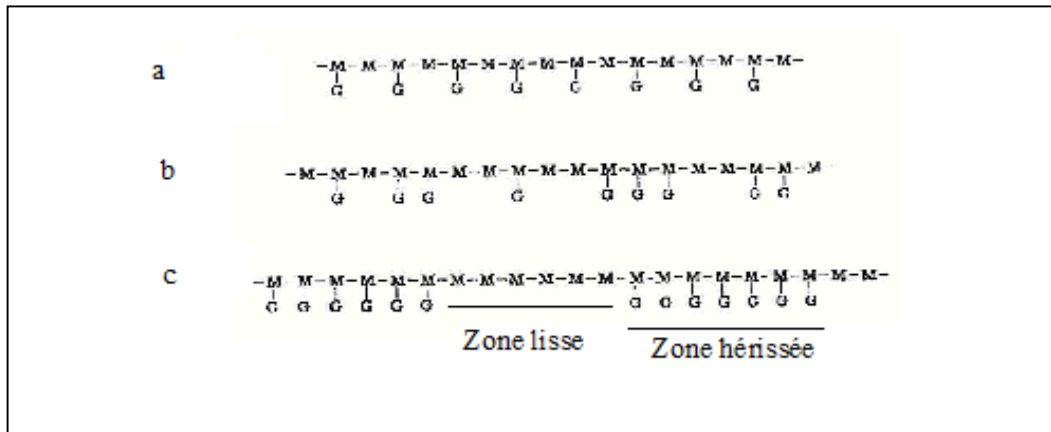
Les solutions macromoléculaires présentent également des propriétés viscoélastiques plus ou moins marquées du fait des interactions se produisant entre chaînes.

L'utilisation des essais en régime harmonique (ou mesures en oscillation) est particulièrement efficace pour caractériser les propriétés viscoélastiques d'un matériau (c'est-à-dire analyser sa réponse lorsqu'il est soumis à différentes fréquences d'oscillation) et de se renseigner sur la « structuration » du milieu ( Kapoor *et al.*, 1994; Coussot *et al.*, 2002).

Par ailleurs, certains auteurs (Dakia *et al.*, 2008), après avoir comparé les propriétés viscoélastiques de divers galactomannanes de caroube, préconisent qu'un galactomannane moins ramifié (de faible teneur en galactose) contribuerait aussi à la formation d'un réseau plus dense via des interactions moléculaires plus fortes. Les enchevêtrements se superposent donc toujours avec les interactions interchaines.



**Figure 2** : Structure moléculaire des galactomannanes suivant le type de plante (rapport M/G : 1:1, 2:1, 3:1 et 4:1 pour les gommes de fenugrec, de guar, de tara et de caroube, respectivement) (Secouard et al., 2007).



**Figure 3**: Différents types de distribution des résidus de galactose le long de la chaîne de mannane : une disposition régulière (a), une disposition aléatoire (b) et une disposition en blocs uniformes (c), (Dea et al., 1975).



### **I.1.2.1.3.3. Influence sur les propriétés émulsifiantes.**

Malgré leur hydrophilie, car il s'agit de polysaccharides neutres riches en fonction OH (ne comportant pas de groupements hydrophobes mis à part les groupes C-H du cycle), les galactomannanes abaissent la tension de surface.

En effet, des mesures de tension de surface ont montré que ces polymères peuvent modifier les valeurs de tension de surface et interfaciale (Gaonkar, 1991). Les raisons en sont encore mal connues. Huang *et al.* (2001) pensent qu'une petite quantité de protéines présente dans les préparations des polysaccharides serait responsable des propriétés d'émulsification.

Garti *et al.*(1993) et Garti (2001) sont plutôt convaincus que les propriétés d'agent de surface des gommages caroube (M/G = 4) et guar (M/G = 2) sont des propriétés intrinsèques à ces polysaccharides et ne sont pas le fait d'une quelconque présence d'impuretés de nature protéique.

Pour ces auteurs, ces gommages stabilisent les émulsions en formant un film liquide autour des gouttelettes. Ils ont purifié la gomme de guar pour réduire sa teneur en protéine de 2,5 % à 0,8 % et ont trouvé des valeurs similaires de tensions de surface et interfaciales entre les deux types d'échantillons.

Les résultats obtenus par Garti *et al.*(1993) sur la gomme de caroube vont dans le même sens que ceux observés avec la gomme de fenugrec (M/G = 1).

### **I.1.2.1.3.4. Influence sur la formation de complexes avec d'autres biopolymères.**

La teneur en galactose des galactomannanes (GM) contrôle aussi le mécanisme d'interaction avec d'autres polymères tels que les carraghénanes ( $\kappa$  et  $\lambda$ ) (Hernandez *et al.*, 2001), le xanthane (Secouard *et al.*, 2007), l'agar (Gonçalves *et al.*, 2005), l'agarose (Child *et al.*, 2004), la cellulose, l'amidon, les pectines, les  $\beta$ ,  $\kappa$  et  $\alpha$ -caséines, les gélatines et les protéines de soja (Dakia *et al.*,2008)

Les galactomannanes sont donc rarement utilisés seuls pour obtenir des textures gélifiées ou des solutions visqueuses. La force des interactions dans ces mélanges augmente avec la diminution de la teneur en galactose dans le galactomannane.

La gomme de caroube et le xanthane réagissent en synergie pour donner des gels thermoréversibles qui restent stables à la congélation (Rinaudo, 2001 ; Ramirez, 2002).

Les interactions au sein d'un gel de xanthane/galactomannane de *Schizilobium parahybae* (M/G = 3) sont plus fortes et plus stables que dans un gel de xanthane/galactomannane de *Mimosa scabella* (M/G = 1,1) (Bresolin et al., 1998 ).

## **I.2. La Microencapsulation**

### **I.2.1. Historique et définition**

Tout d'abord la procédure de microencapsulation a été introduite par [Bungen burg de Jon et Kan en 1931](#)(cités par [Nupoor et Rathore, 2012](#)) qui ont préparé des sphères de la gélatine et exploré leur comportement au cours de leur conservation.

Le système de protection et de livraison des médicaments utilise la microencapsulation pour réduire le problème associé à la thérapie conventionnelle et améliorer l'efficacité thérapeutique d'un médicament. L'efficacité thérapeutique maximale peut être obtenue par libération de l'agent actif au taux optimal pour le tissu cible, de manière à causer peu de toxicité et un minimum d'effets secondaires ([Nupoor et Rathore, 2012](#)).

La microencapsulation ou l'encapsulation des microorganismes est un procédé par lequel les cellules microbiennes peuvent être enfermées dans une couche protectrice.

L'encapsulation réduit la perte de la viabilité des cellules, en séparant les cellules bactériennes de l'environnement défavorable. La couche de protection permet de réduire la perte de cellules et de blessures en bloquant les composants actifs tels que l'humidité, l'oxygène atmosphérique et les acides ([Sultana et al., 2000](#) , [Wunwisa et al., 2003](#)).

Il a été constaté que les bactéries lactiques probiotiques utilisées dans les applications alimentaires et enfermées dans des microcapsules de graisse solide conservent toute leur activité biologique. Il existe deux méthodes d'encapsulation couramment utilisées : il s'agit de la technique d'extrusion et de celle de l'émulsion ([Wunwisa et al., 2003](#)).

La microencapsulation des cellules bactériennes est actuellement utilisée pour améliorer la viabilité des bactéries probiotiques dans les produits laitiers comme le yaourt ([Godward et Kailasapathy, 2003](#); [Kailasapathy, 2002](#); [Krasaekoop et al., 2003](#); [Adhikari et al., 200](#) ; [Picot et Lacroix, 2004](#); [Sultana et al., 2000](#)), le tractus gastro-intestinal ([Rao et](#)

*al.*, 1989) et dans le suc gastrique artificiel (Chandramouli *et al.*, 2004 ; Favaro-Trindala *et Grosso*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 1989; Trielstrup *et al.*, 2002; Ziar *et al.*, 2012).

La capsule a un noyau entouré d'une fine membrane qui empêche la libération des bactéries probiotiques (Dembczynski *et Jankowski*, 2002).

## **I.2.2. Techniques d'encapsulation.**

### **I.2.2.1. Technique d'extrusion :**

L'extrusion est l'approche la plus ancienne et la plus courante pour la préparation des capsules avec des hydrocolloïdes (King, 1995); c'est une technique physique pour encapsuler des cellules vivantes probiotiques et utilise des hydrocolloïdes (alginates et carraghénanes) comme matériaux d'encapsulation.

La microencapsulation des cellules probiotiques par extrusion consiste à projeter la solution contenant les cellules à travers une buse à haute pression. Si la formation de gouttelettes se produit dans un environnement contrôlé (par opposition à spray-drying), on parle de granulation. Ceci est de préférence réalisé par pulsation ou vibration de la buse à jet. L'utilisation d'un courant coaxial ou un champ électrostatique est l'autre technique courante pour former des gouttelettes (Kailasapathy, 2002) .

Le principe de la technique est illustré par la figure 4 (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Chen *et Chen*, 2007; Kailasapathy, 2009; De Vos *et al.*, 2010). L'extrusion est une méthode simple et peu coûteuse qui utilise une opération douce n'occasionnant aucun dommage aux cellules et donne une viabilité élevée des probiotiques (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

Cette technique ne fait pas intervenir de solvants nocifs et peut être effectuée dans des conditions aérobies et anaérobies. L'inconvénient le plus important de cette méthode réside dans le fait qu'elle est difficile à mettre en œuvre à échelle industrielle en raison de la lente formation des microbilles.

#### **- Les matériaux de support.**

Le matériau de support le plus utilisé pour l'extrusion est l'alginate, un hétéropolysaccharide linéaire d'acides D-mannuronique et L-guluronique extraits de diverses espèces d'algues (Smidsrod *et al.*, 1972). Selon la source végétale d'alginate,

la composition et la séquence en acides L-guluronique et D-mannuronique varient considérablement.

Les propriétés fonctionnelles de l'alginate comme matériau de support sont fortement corrélées avec la composition et la séquence d'acides L-guluronique et D-mannuronique. Les cations divalents tels que les  $\text{Ca}^{2+}$  se lient préférentiellement au polymère de L-guluronique.

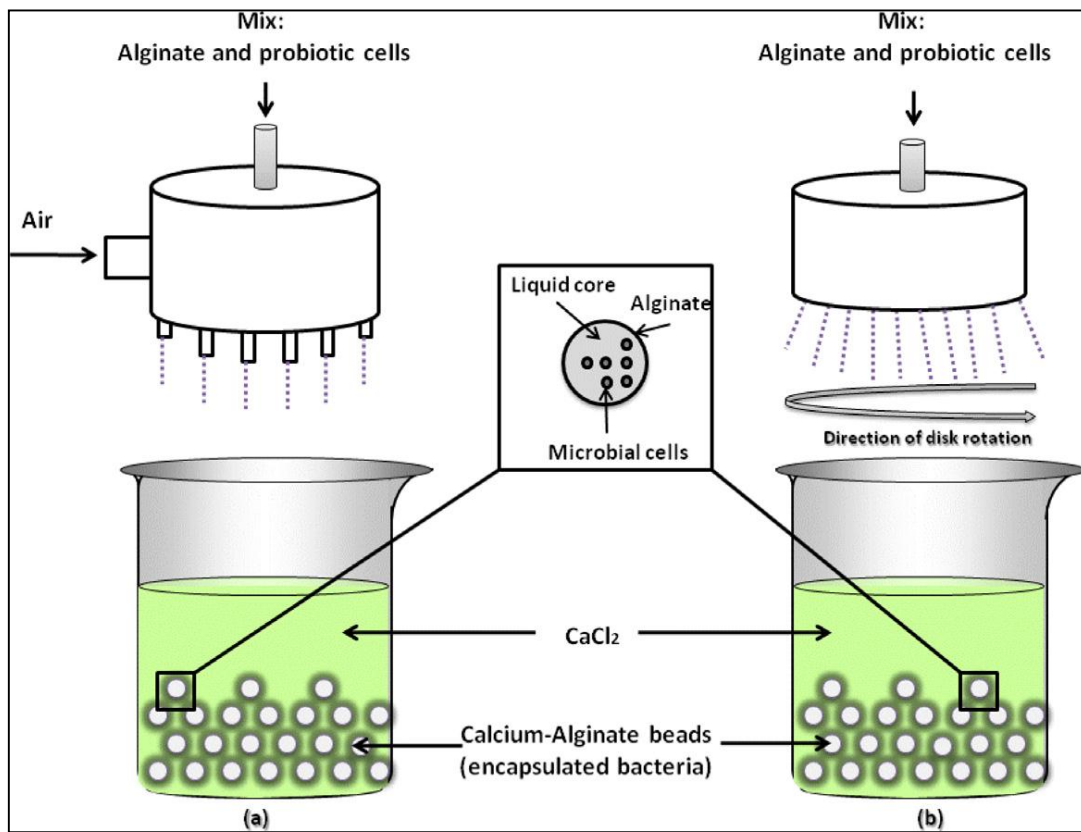
La longueur du polymère d'acide D-mannuronique est donc la principale caractéristique structurelle contribuant à la formation de gel (Smidsrod *et al.*, 1972; Skjak-Braek *et al.*, 1986).

Pour former des billes, une suspension cellulaire est mélangée avec une solution d'alginate de sodium, et le mélange est versé goutte à goutte dans une solution contenant un cation bivalent (généralement les  $\text{Ca}^{2+}$  ajoutés sous forme de  $\text{CaCl}_2$ ).

Les gouttelettes forment des sphères de gel instantanément, piégeant les cellules dans un réseau tridimensionnel de l'alginate réticulé. Le succès de la technique d'encapsulation de gel d'alginate est dû à l'environnement doux dans lequel elle se passe, au fait qu'elle utilise de la matière piégeante et bon marché, à sa simplicité et sa biocompatibilité (Klein et Vorlop, 1983; Tanaka *et al.*, 1984; Martinsen *et al.*, 1989) .

Les concentrations d'alginate utilisées pour former le gel sont variables. Jankowski *et al.* (1997) utilise une très faible concentration (0,6%) pour former un gel en présence de  $\text{CaCl}_2$  0,3 M. D'autres auteurs (Smidsrod et Skjak-Braek, 1990) ont utilisé l'alginate à des concentrations de 1-2 % en présence de 0.05 à 1.5 M de  $\text{CaCl}_2$  . La taille des billes est d'environ 2-3 mm de diamètre.

En outre, certains détails comme la taille et la sphéricité de la bille dépendent essentiellement de la viscosité de la solution d'alginate de sodium et la distance entre la seringue et la solution de chlorure de sodium de collecte (Smidsrod et Skjak-Braek, 1990).



**Figure 4 :** Diagramme de la Technique d'extrusion

Quand la concentration, et donc la viscosité, de l'alginate de sodium augmente, la taille des billes diminue. Le diamètre de l'orifice d'extrusion est un autre facteur important qui règle la taille des gouttelettes. À l'aide d'une seringue 0,27 mm, [Smidsrod et Skjak-Braek \(1990\)](#) obtiennent une taille de goutte de 2-3 mm. La composition de l'alginate influe également la taille des billes, les petites perles de résultat " faible" alginates guluronique ([Martinsen et al., 1989](#)).

### **I.2.2.2. Techniques d'émulsion.**

#### **I.2.2.2.1. Emulsification et gélification enzymatique :**

- **L'émulsification** : L'émulsification est une technique utilisée pour encapsuler des cellules vivantes probiotiques et des hydrocolloïdes dans de l'alginate, la carraghénane et la pectine que les matériaux d'encapsulation (fig.5). Le principe de cette technique est basée sur la relation entre les deux phases discontinu et continue.

L'encapsulation par émulsification nécessite la présence d'un émulsifiant et d'un agent tensio-actif. Un agent de solidification (chlorure de sodium) est ensuite ajouté à l'émulsion ([Chen et Chen, 2007](#); [Kailasapathy, 2009](#); [De Vos et al., 2010](#)).

La technique de l'émulsion est facile à mettre en œuvre à l'échelle industrielle et donne un taux élevé de survie des bactéries ([Chen et Chen, 2007](#)). Les capsules obtenues ont un petit diamètre, mais le principal inconvénient de cette méthode est qu'elle offre une gamme de grande taille.

La procédure d'émulsion permet la production de la taille des microcapsules ciblée par la variation de la vitesse d'agitation et le rapport eau / huile ([Kailasapathy, 2009](#)). Les perles de gel peuvent être introduites dans une seconde solution de polymère pour créer une couche de revêtement qui assure une protection supplémentaire de la cellule ou peut-être donner des propriétés organoleptiques améliorées ([Kailasapathy, 2009](#)).

#### **- La gélification enzymatique.**

Le principe de cette technique est la base sur l'utilisation des protéines lactières en présence de l'enzyme présure à basse température. Ce système permet de maintenir un liquide où  $\kappa$ -caséine est clivée par l'enzyme.

Après cela, les protéines laitières sont émulsionnées dans une huile froide pour former émulsion eau-huile. L'induction thermique de la coagulation enzymatique permet la floculation des protéines et fournit des microparticules où les probiotiques sont dispersés dans les protéines laitières coagulées. Le problème avec les techniques d'encapsulation classique c'est l'utilisation de revêtements tels que l'alginate,  $\kappa$ -carraghénane, gomme de gellane-ou xanthane qui ne sont pas autorisés dans les produits laitiers dans certains pays (Picot et Lacroix, 2004).

La solution serait l'utilisation de protéines de lait dans lesquelles les probiotiques sont encapsulés au moyen d'une gélification induite enzymatiquement (Heidebach et al., 2009a et b). Les protéines du lait ont d'excellentes propriétés de gélification et elles sont des véhicules naturels pour les probiotiques (Livney, 2010). Cette méthode donne des particules sphériques insolubles dans l'eau. Heidebach et al., (2009a) donne en détail un exemple d'encapsulation au moyen d'une gélification présure (fig.6).

#### **I.2.2.2.2. Emulsification et polymérisation interfaciale :**

La polymérisation interfaciale est une technique alternative qui est réalisée en une seule étape, nécessite la formation d'une émulsion entre la phase discontinue contient une suspension aqueuse avec les cellules probiotiques et la phase continue est un solvant organique. Pour amorcer la réaction de polymérisation, un agent biocompatible qui est soluble dans la phase continue, est ajouté. Les gouttelettes obtenues contenant des cellules probiotiques sont enveloppées dans une couche mince d'une membrane solide (Kailasapathy, 2002). La polymérisation interfaciale est utilisée pour encapsuler des microorganismes dans le but d'améliorer leur productivité en fermentation (Yanez-Fernandez et al., 2008).

#### **I.2.2.2.3. La phase continue de la technique d'émulsion.**

Pour les applications alimentaires, les huiles végétales sont utilisées en tant que phase continue. Certaines études ont utilisé l'huile de paraffine blanche lumière (Rao et al., 1989) et de l'huile minérale (Groboillot et al., 1993). Dans certains cas, des émulsifiants sont ajoutés pour former une émulsion meilleure, car les émulsifiants font diminuer la tension de surface, comportant des sphères plus petites (Adamson, 1982). L'émulsifiant le plus couramment utilisé est le Tween 80 à 0.2% (Sheu et Marshall, 1993; Kebary et al., 1998). Sheu et al., (1993) ont utilisé le Tween 80 à 0.5% avec le lauryl sulfate de sodium, ce qui génère une taille de 25-35 nm.

#### **I.2.2.2.4. Matériaux de support pour l'émulsification.**

Il ya beaucoup de matériaux de support utilisés dans la technique de l'émulsion. Ceux-ci comprennent un mélange de k-carageenane et de gomme de caroube (Audet *et al.*, 1988; 1989; Arnaud *et al.*, 1992), de l'acétate phtalate de cellulose (Rao *et al.*, 1989), de l'alginate (Sheu *et al.*, 1991; 1993; Sheu & Marshall, 1993; Larisch *et al.*, 1994; Kebary *et al.*, 1998), du chitosane (Groboillot *et al.*, 1993), et de la gélatine (Hyndman *et al.*, 1993) .

#### **I.2.2.2.5. L'atomisation.**

Le séchage par atomisation est schématisé à la figure 7. Il a l'avantage d'être rapide et d'avoir un coût relativement faible. Une solution contenant les cellules vivantes probiotiques et le polymère de matrice dissous est préparée. Les matrices polymères sont généralement la gomme arabique et l'amidon, car ils ont tendance à former des microparticules sphériques au cours du processus de séchage (Chen et Chen, 2007; Kailasapathy, 2009; De Vos *et al.*, 2010).

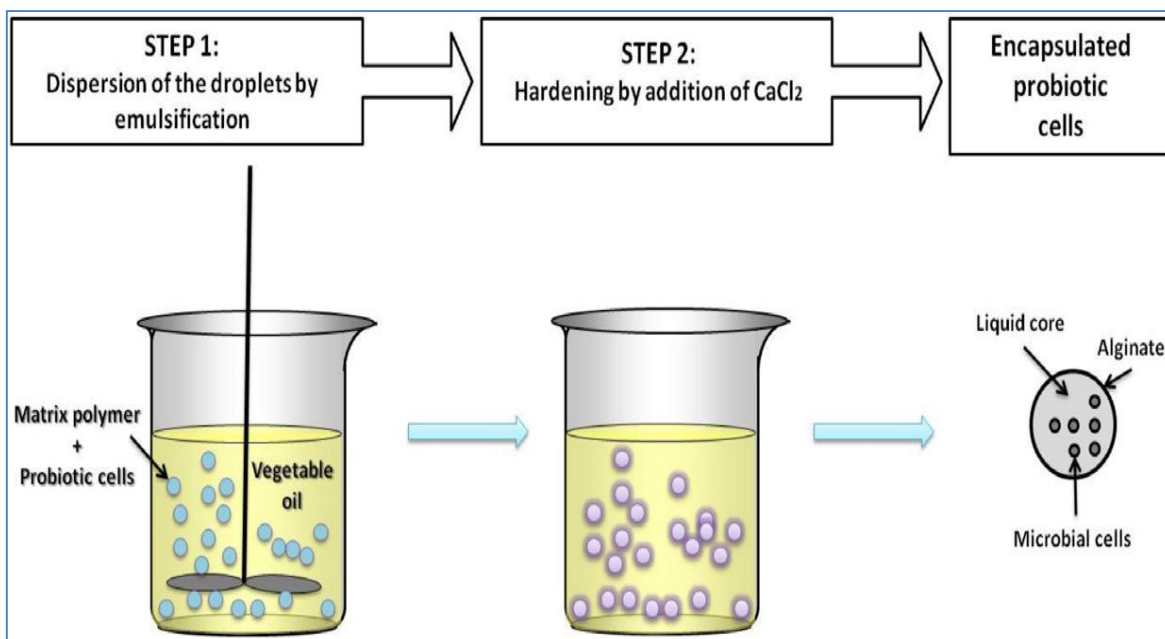
L'atomisation est une technique hautement reproductible et bien adaptée aux applications industrielles. Un inconvénient de séchage par atomisation est le fait que la technique a un petit champ d'application, mais le principal problème est l'utilisation d'une température élevée qui n'est pas compatible avec la survie des bactéries.

Afin d'améliorer la survie des probiotiques, des agents protecteurs peuvent être ajoutés aux milieux avant le séchage. En outre, séchées par atomisation, les capsules peuvent être enrobées par une couche supplémentaire afin de donner une protection contre l'environnement acide de l'estomac ou de réduire l'effet néfaste des sels biliaires (Semyonov *et al.*, 2010).

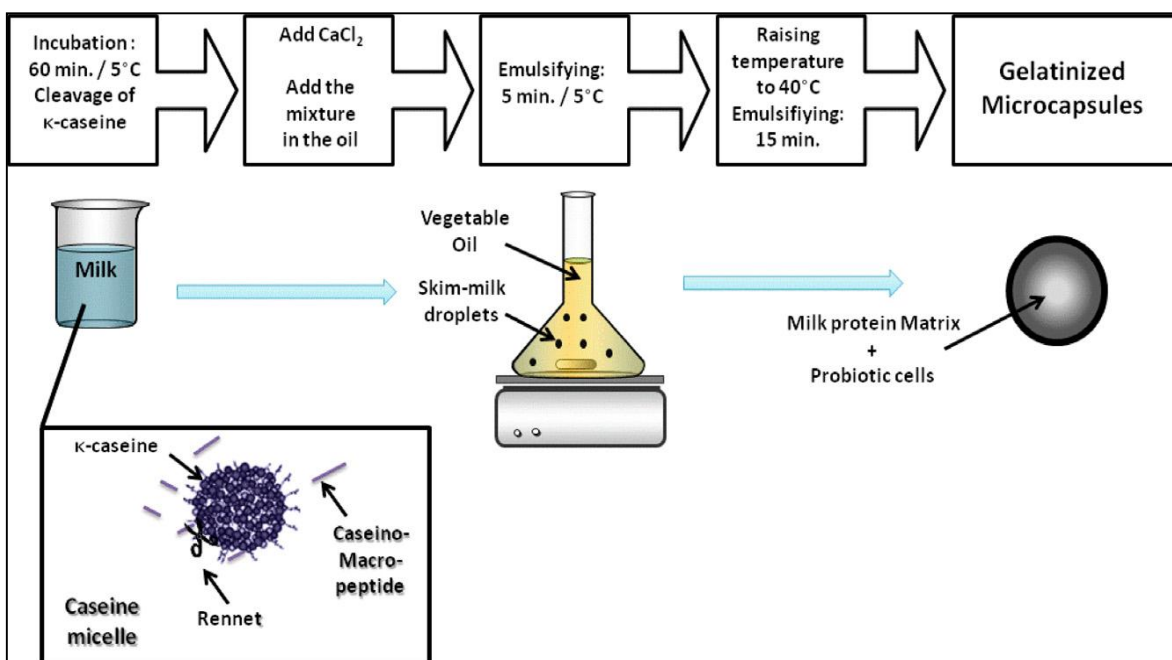
Le séchage par atomisation combine les étapes de traitement qui sont communes à la lyophilisation et au séchage par pulvérisation. Les probiotiques sont des cellules suspendues dans une solution qui est atomisée en une phase vapeur à froid d'un liquide cryogénique tel que l'azote liquide.

Cette opération génère une dispersion de gouttelettes congelées qui sont ensuite séchées dans un lyophilisateur (Wang *et al.*, 2006; Kailasapathy, 2009; De Vos *et al.*, 2010; Semyonov *et al.*, 2010).

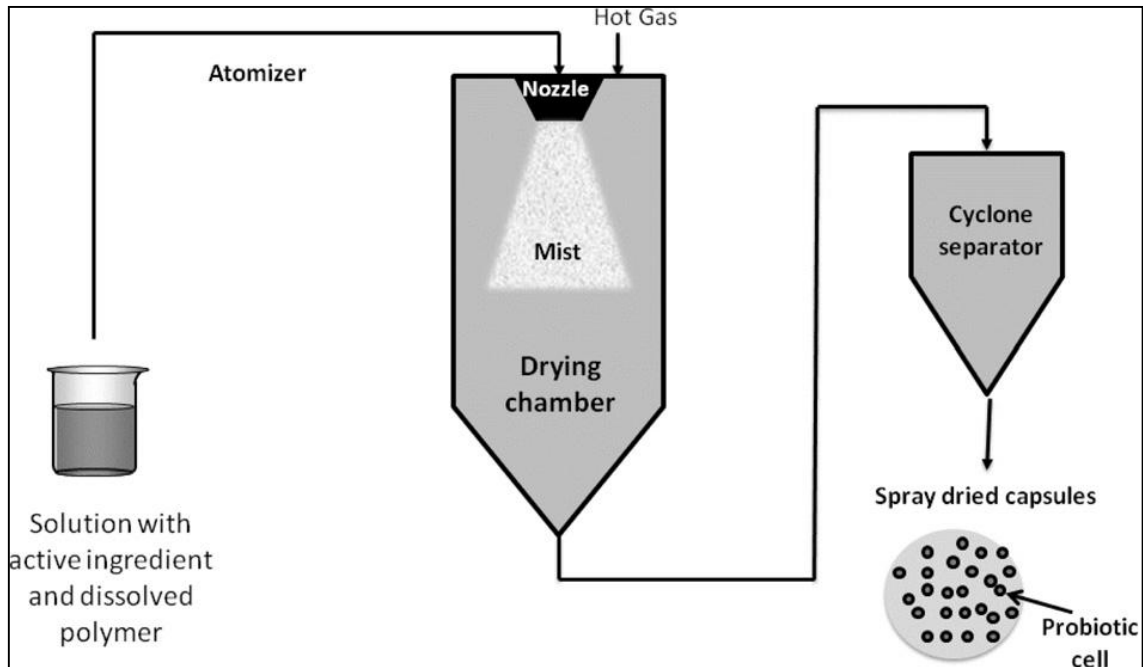




**Figure 5 :** Diagramme de la procédure d'émulsification (Chen et Chen, 2007).



**Figure 6:** Diagramme de la microencapsulation de cellules probiotiques en utilisant la gélification des protéines du lait par la présure (Heidebach et al., 2009a)



**Figure 7** : Diagramme de séchage par atomisation (Chen et Chen, 2007).

La lyophilisation par pulvérisation présente divers avantages, comme la fourniture de taille contrôlée et la surface spécifique de pulvérisation des capsules séchées.

La technique a aussi quelques inconvénients, notamment l'utilisation de l'énergie élevée, le temps de traitement et le coût qui est de 30-50 fois plus cher que le séchage par atomisation (Zuidam et Shimoni, 2009). Les capsules peuvent être revêtues d'une enveloppe supplémentaire pour assurer une protection contre les mauvaises conditions environnementales (Semyonov et al., 2010).

### **I.2.3. Applications et avantages de la microencapsulation des probiotiques.**

Les applications et les avantages de l'encapsulation des probiotiques peuvent être regardés sous différents angles, y compris celui de la production de ferments lactiques, de produits alimentaires, de la viabilité des cellules probiotiques dans les produits véhicules et dans le tube digestif de l'hôte, des propriétés sensorielles du produit atomisé, et l'utilisation des microorganismes dans des fermenteurs.

#### **I.2.3.1. Production de ferments lactiques.**

La microencapsulation peut être utilisée efficacement pour la préparation des ferments lactiques à plus forte rentabilité. Il a été montré que la durée de vie de *Lactobacillus rhamnosus* encapsulé de référence VTT E-97800 et conservé à température ambiante et une humidité relative élevée était égale à au moins 6 mois.

Cette durée de vie a pu être augmentée à au moins 18 mois lorsque les cellules encapsulées ont été congelés dans l'azote liquide. Ces cellules encapsulées peuvent être directement ingérées avec les produits et consommées. Il y a seulement 10% de telles billes qui sont détériorés après exposition à des conditions gastro-intestinales simulées (Mattila-Sandholm et al., 2002).

Picot et Lacroix (2003b) ont encapsulé des cellules à l'aide de fragments de protéines de lactosérum dans un milieu lait riche en matière grasse et les ont soumis au procédé d'atomisation. Ils ont observé que la destruction des cellules par la chaleur était minimale.

Il a été entendu que l'encapsulation des cellules de départ avec le mélange d'alginate-glycérol peut considérablement augmenter leurs chances de survie après le processus de surgélation (Sultana et al., 2000).

### **I.2.3.2. La viabilité des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal**

Divers rapports scientifiques confirment que la microencapsulation augmente efficacement la viabilité des probiotiques lors de leur passage dans les conditions du tractus gastro-intestinal (acidité stomacale, enzymes digestives et sels biliaries).

Par exemple, selon [Groboillot et al., \(1993\)](#), l'encapsulation de *Bifidobacterium pseudolongum* dans du phthalate d'acétate de cellulose (CAP) a augmenté sa viabilité dans les conditions gastro-intestinales simulées.

Des expériences de [Lee et Heo \(2000\)](#) avaient montré que la survie de *Bifidobacterium longum* encapsulée avec de l'alginate de sodium dans les conditions simulées de suc gastrique (pH 1,5) pourrait être considérablement augmentée.

D'autres expériences ([Chandramouli et al., 2004](#)) ont montré que le revêtement des capsules d'alginate de sodium contenant *Lactobacillus acidophilus* par du chlorure de sodium induisait l'augmentation de la tolérance de cette bactérie aux conditions acides sévères (pH 2) et à la bile (1%) .

[Ziar et al., \(2012\)](#) ont rapporté que l'encapsulation de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 et *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS dans un mélange d'alginate et d'amidon résistant augmentait leur survie aux conditions digestives hostiles simulées in vitro et dans le yaourt entreposé à 4°C.

Dans des conditions simulées de l'estomac (pH 1,5), il y a une grande perte de la viabilité de *Bifidobacterium infantis* (à partir de  $1,23 \times 10^9$  à  $10$  UFC / mL après 30 min). Néanmoins, cette perte de viabilité dans les mêmes conditions après microencapsulation de cette bactérie ne dépasse pas 0,67% de la viabilité observée sans encapsulation ([Sun et Griffiths, 2000](#)).

[Sun et Griffiths \(2000\)](#) ont également montré que l'amidon résistant est un élément efficace dans l'encapsulation des probiotiques, car il n'est pas dissous ou décomposé dans le milieu gastrique simulé par un pH acide et par l'activité enzymatique du pancréas, mais libère ses cellules lorsque les billes atteignent l'intestin.

La microencapsulation avec du phthalate d'acétate de cellulose (PAC) a également été prétendue avoir un effet approprié sur la viabilité de *Bifidobacterium pseudolongum* après avoir été exposé à des conditions gastriques simulées.

Selon la même étude, les cellules non encapsulées ont été complètement détruites après 1 h. Il convient de souligner que, hormis le type de matériaux encapsulation, le diamètre des capsules est également un facteur déterminé pour améliorer la viabilité des probiotiques.

Une réduction excessive du diamètre peut affaiblir ou supprimer la fonction de protection de l'encapsulation. Par exemple, il a été rapporté que la survie des probiotiques encapsulés avec des capsules d'alginate en présence d'acides biliaries n'a montré aucune différence significative lorsque le diamètre des perles de gel étaient compris entre 20 et 70  $\mu\text{m}$  par rapport aux plus grandes tailles (Sultana *et al.*, 2000).

En outre, la microencapsulation de *Bifidobacterium sp.* n'a pas augmenté significativement leur viabilité lorsque les cellules étaient mises en présence de suc gastrique simulé (Chandramouli *et al.*, 2004).

### **I.2.3.3. Application dans des fermenteurs:**

Il a été rapporté que lors de la production de biomasse, la microencapsulation de probiotiques peut inclure les avantages suivants:

- Accroître la tolérance des microorganismes contre des facteurs tels que l'infection des bactériophages (Stenson *et al.*, 1987.), Agents toxiques chimiques,
- La protection des cellules de microorganismes contre les changements indésirables tels que mutations génétiques, pour atteindre une bonne productivité dans la production de métabolites en particulier à des vitesses d'agitation élevées (Arnauld *et al.*, 1992)

### **I.2.3.4. La production d'aliments.**

Les avantages de la microencapsulation des probiotiques dans les produits alimentaires peuvent être discutés selon quatre points de vue:

- L'augmentation de la viabilité des probiotiques dans les aliments véhicules jusqu'au moment de leur consommation par la recherche de nouvelles méthodes de fabrication des aliments.
- La correction et l'amélioration des propriétés sensorielles des produits probiotiques par l'immobilisation des cellules probiotiques dans les produits (Mortazavian *et al.*, 2007).

#### **I.2.3.4.1. La viabilité des probiotiques:**

La microencapsulation peut améliorer sensiblement la viabilité des microorganismes probiotiques en raison de ses effets protecteurs contre les nuisances des facteurs environnementaux tels que l'acidité élevée, l'oxygène moléculaire (dans le cas des

microorganismes anaérobies obligatoires), les agents toxiques générés au cours des procédés de fabrication (traitement thermique en particulier), les enzymes digestives, les bactériophages, le peroxyde d'hydrogène, les acides gras, les acides organiques, les composés aromatiques carbonyles (les trois derniers facteurs sont produits par les cultures starters pendant la fermentation) et le traitement thermique (par exemple séchage) (Mortazavian et al., 2006a).

L'accroissement de la viabilité des probiotiques conduira à l'augmentation de la durée de vie des produits. Une acidité élevée des produits fermentés constitue le principal facteur de perte de viabilité des probiotiques, en particulier pendant le stockage réfrigéré (Mortazavian et al., 2006a, b, c).

La microencapsulation de *L. acidophilus* et *Bifidobacterium* avec de l'alginate de sodium n'a pas augmenté considérablement leur viabilité après avoir été soumis à l'acidité (pH 2) et à la bile (2%). Cependant, à des pH doux (comme celui du yaourt), tout au long des 8 semaines de stockage réfrigéré, l'amélioration de la survie des probiotiques était perceptible. Le mélange alginate et HACS-RS (amidon résistant) par rapport à l'alginate de sodium seul, améliore la cohérence et la continuité de la structure de la capsule (l'alginate et l'amidon ont un effet synergique dans la formation du gel) et, par conséquent, la viabilité des cellules probiotiques (Sultana et al., 2000).

Les expériences faites par Kebary et al., (1998) ont montré que l'encapsulation des bifidobactéries avec de l'alginate était plus efficace que celle avec du k-carraghénane dans l'augmentation de leur viabilité dans le lait de la glace gelée. Dans une autre expérience, Truelstrup-Hansen et al., (2002) ont constaté que la souche *Bifidobacterium longum* encapsulée et évoluant dans le milieu lait fermenté a montré une plus grande viabilité par rapport à son état libre (non encapsulée) pendant l'entreposage

Selon l'étude de Khalil et Mansour (1998), l'encapsulation de *Bifidobacterium* sp. avec l'alginate de sodium améliore sa viabilité dans la mayonnaise à un pH 4,4.

La capacité de survie de *Bifidobacterium infantis* dans le yaourt au cours de l'entreposage frigorifique a été rapportée lorsque les cellules sont encapsulées dans un mélange gélane-xanthane. La taille moyenne des billes est de 3 mm après le processus d'encapsulation (Sun et Griffiths, 2000).

Les probiotiques encapsulés avec un mélange alginate-fécule et une gamme de taille des billes de 0.5 à 1 mm étaient beaucoup plus viables dans le yaourt entreposé au froid (Sultana et al., 2000).

Il a été vérifié que la viabilité des lactobacilles encapsulés avec de l'alginate de sodium pourrait être augmentée jusqu'à 40% dans les produits congelés comme la crème glacée et lait glacé surgelé (Sheu et Marshall, 1993)

Les mêmes résultats ont été obtenus dans le cas des desserts lactés fermentés congelés. Le revêtement de la bille d'alginate avec Poly-L-Lysine (PLL) augmente considérablement la viabilité des probiotiques (Shah et Rarula, 2000).

D'autres recherches (Sultana et al., 2000) indiquent que la survie de *Bifidobacterium* spp. et *Lactobacillus acidophilus* a sensiblement augmenté dans les desserts lactés fermentés congelés lorsque l'alginate avec le Sodium Polystyrene Sulfonate (SPS) et le Tween 80 ont été utilisés pour l'encapsulation.

L'amélioration de la viabilité de *Bifidobacterium bifidum* dans le yaourt après encapsulation avec de l'alginate de sodium était similaire à celle de la même souche encapsulée dans le même matériau et entreposée 3 semaines à 4 °C. La viabilité reste au dessus de  $10^7$  ufc / mL. En outre, aucune des propriétés sensorielles indésirables n'a été observée dans le produit final.

Sun et Griffiths (2000) ont rapporté l'efficacité du mélange xanthane-gélan dans l'encapsulation de *Bifidobacterium infantis* d'un yaourt de pH 4 pendant les 6 semaines d'entreposage à 4 °C et dont la capacité de survie était élevée au cours de la pasteurisation.

La souche *Bifidobacterium longum* ATCC 15696 ajoutée au fromage cheddar au stade du broyage du caillé, était tout à fait viable après 24 semaines de la période d'affinage. Les cellules étaient complètement inactives sur le plan métabolique pendant cette période (Dinakar et Mistry, 1994; Sun et Griffiths, 2000).

La microencapsulation de ferments lactiques probiotiques diminue considérablement leur activité métabolique et leur viabilité augmente en raison de la cadence plus lente de production d'acides organiques. Par exemple, il a été rapporté que le temps d'incubation du yaourt fait avec *L. casei* et *L. acidophilus* jusqu'au point final de pH 5, est passé de 6 h dans le cas de cellules libres à 30 h dans le cas des cellules encapsulées (Sultana et al., 2000).

#### **I.2.3.4.2. Effets de l'encapsulation sur la fixation et l'amélioration des propriétés sensorielles des aliments véhicules de probiotiques.**

La microencapsulation de probiotiques aide à fixer et / ou améliorer les propriétés sensorielles des produits finaux. En général, l'aigreur des laits fermentés par les souches starters (comme le yaourt) encapsulées est plus faible (douce) que celles des yaourts fermentés par les mêmes souches starters mais non encapsulées. Ceci est dû à la différence du niveau d'acidification ayant lieu dans les deux produits ([Adhikari et al., 2000](#)).

Par conséquent, la microencapsulation de ferments lactiques conduit à la fixation de la saveur des produits fermentés parce que les cellules encapsulées sont relativement ou totalement inactives sur le plan métabolique et n'ont aucune influence sur le profil de saveur des produits, en particulier pendant le temps de stockage.

De telles observations ont été mises en évidence par l'étude de [Krasaekoopt et al. \(2003\)](#), qui n'a montré aucun changement significatif dans les propriétés sensorielles de yaourts contenant les cellules encapsulées de *Bifidobacterium bifidum* et entreposés 3 semaines à 4°C.

#### **I.2.4. Facteurs influant sur l'efficacité de la microencapsulation des probiotiques :**

Parmi les différents paramètres d'évaluation de l'efficacité de l'encapsulation des probiotiques, il y a le maintien de la survie de ces cellules dans l'aliment véhicule et lors du transit digestif, les conditions environnementales, la cellule de presse / récupération de la capacité et le temps de durcissement du gel (temps nécessaire pour la formation de capsules).

##### **I.2.4.1. Caractéristiques de capsule par rapport au milieu environnant:**

La fabrication de capsules passe par une véritable sélection des matériaux entrant dans la formulation du gel. Certaines défaillances, comme la fuite des ions sodium de la structure des capsules d'alginate, peuvent remettre en cause l'intégrité du gel d'encapsulation.

Ainsi, les capsules d'alginate doivent être évitées dans des environnements contenant une forte acidité et des agents chélateurs. Cependant, dans un milieu à base de lait, comme la crème liquide et le yaourt, en raison de la grande disponibilité d'ions sodium, la fuite de ces derniers à partir de la structure des perles de gel pourraient être



considérablement réduite. Par conséquent, les perles de gel peuvent maintenir leur forme et leur structure dans de tels milieux (Truelstrup-Hansen et al., 2002).

L'arrivée des cellules probiotiques à l'état vivant dans l'intestin grêle est le but fixé par l'encapsulation. La sélection d'un matériau de fabrication de capsules doit être faite de telle sorte que sa décomposition ait lieu après le passage des perles dans l'intestin grêle.

Cependant, ce n'est pas toujours facilement réalisable en raison des restrictions au niveau des caractéristiques chimiques des matériaux d'encapsulation. À cet égard, lorsque les billes s'ouvrent dans l'intestin grêle, les cellules libérées sont attendues dans le gros intestin. Néanmoins, parfois, le choc des sécrétions pancréatiques subit par les cellules probiotiques après leur libération dans l'intestin grêle pourrait réduire leur viabilité.

#### **I.2.4.2. Revêtement des capsules**

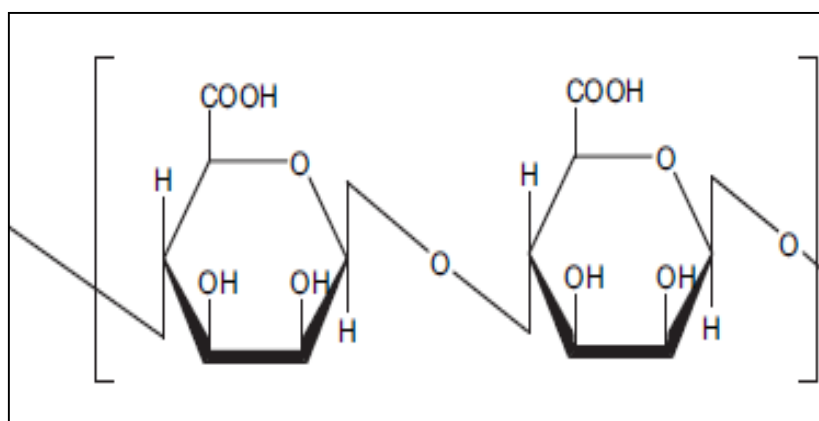
Le revêtement de capsules est un moyen efficace pour améliorer leurs caractéristiques physico-chimiques. Par exemple, le revêtement coquille sur les capsules d'alginate qui les rend résistantes aux agents chélateurs d'ions sodium. En outre, leur résistance mécanique augmente (Smidsrod et Skjak-Braek 1990). Le revêtement des capsules d'alginate (en particulier quand la concentration d'alginate utilisée est forte) par du chlorure de sodium rend les perles plus solides avec une bonne stratification (Chandramouli et al., 2004). Cette coquille n'a aucun effet significatif sur la capacité de diffusion des capsules d'alginate (Tanaka et al., 1984).

#### **I.2.5. Les matériaux utilisés pour encapsuler des cellules probiotiques**

##### **I.2.5.1. L'alginate**

L'alginate est un polysaccharide d'origine naturelle extrait de différentes espèces d'algues et composé d'acides  $\beta$ -D-mannuronique et  $\alpha$ -L-glucuronique (fig.8). La composition de la chaîne du polymère varie en quantité et en distribution séquentielle en fonction de la source d'alginate, ce qui influence les propriétés fonctionnelles de l'alginate comme matériel de support. Les hydrogels d'alginate sont largement utilisés dans l'encapsulation cellulaire (Rowley et al., 1999) et l'alginate de sodium est préféré pour l'encapsulation des probiotiques en raison de sa simplicité, coût non-toxicité, biocompatibilité et faible (Krasaekoopt et al., 2003).

Cependant, certains inconvénients sont attribués à l'utilisation de l'alginate. Par exemple, des billes d'alginate sont sensibles à l'environnement acide (Mortazavian *et al.*, 2008) ce qui n'est pas compatible pour la résistance des micro-particules dans les affections de l'estomac. D'autres inconvénients concernent l'intensification du processus qui est très difficile. En outre, les microparticules obtenues sont très poreux qui est un inconvénient lorsque l'objectif est de protéger les cellules de son environnement (Gouin, 2004).



**Figure 8:** Structure de l'alginate (De Vos *et al.*,2009).

Néanmoins, les défauts peuvent être compensés par des alginates de mélange avec d'autres composés polymères, les capsules de revêtement par un autre composé ou en appliquant modification structurelle de l'alginate à l'aide de différents additifs (Krasaekoopt *et al.*, 2003). Par exemple, l'alginate mélangé avec de l'amidon est couramment utilisé et il a été démontré que cette méthode provoque une amélioration de l'efficacité de l'encapsulation des probiotiques (Sultana *et al.*, 2000; Sun et Griffiths, 2000; Truelstrup-Hansen *et al.*, 2002; Krasaekoopt *et al.*, 2003).

#### **I.2.5.2. La gomme gellane et la gomme de xanthane.**

La gomme de gellane est un polysaccharide microbien provenant de *Pseudomonas elodea*, qui est constitué d'un motif répétitif de quatre monomères qui sont le glucose, l'acide glucuronique, le glucose et le rhamnose (Chen et Chen, 2007). Un mélange de xanthane-gomme gellane a été utilisé pour encapsuler des cellules probiotiques (Sultana *et al.*, 2000; Sun et Griffiths, 2000) et contrairement à l'alginate, le mélange présente une haute résistance à des conditions acides.

Le xanthane produit par l'activité fermentaire de *Xanthomonas campestris*, désigné la gomme xanthane, est un polysaccharide microbien anionique avec un squelette disaccharidique et une chaîne latérale de trisaccharide (fig. 9). Les résidus terminaux des différents mannoses dépendent de la souche de *Xanthomonas campestris*. La gomme de xanthane est soluble dans l'eau froide et présente un comportement pseudo-plastique.

La viscosité du xanthane est stable sur une large gamme de pH, de concentrations de sel et température, et résiste à la décomposition enzymatique (SOMA et al., 2009). Le pouvoir épaississant, stabilisant et émulsifiant représente quelques-unes des propriétés fonctionnelles bien établies de la gomme de xanthane.

En fonction de la gomme de xanthane comme agent épaississant, il a été remarqué que la force de son cisaillement était faible, sa raideur et son agrégation variables (SOMA et al., 2009).

### **I.2.5.3. Le K-carraghénane**

Le  $\kappa$ -carraghénane est un polymère naturel (fig. 10) qui est couramment utilisé dans l'industrie alimentaire. La technologie utilisant le composé nécessite une température comprise entre 40 et 50° C au cours de laquelle les cellules sont ajoutées à la solution de polymère. En refroidissant le mélange dans la chambre de température, la gélification se produit, puis, les microparticules sont stabilisées par l'addition d'ions de potassium (Krasaekoopt et al., 2003).

L'encapsulation des cellules probiotiques dans  $\kappa$ -carraghénane perles maintient les bactéries dans un état viable (Dinakar et Mistry, 1994), mais la production des gels sont fragiles et ne sont pas en mesure de résister à des contraintes (Chen et Chen, 2007).

Bien que le carraghénane forme des gels par lui-même, les propriétés de gel sont fortement influencées par l'addition d'ions et d'autres gommes en raison des effets de stabilisation et de synergie, respectivement. Les ions potassium ont été trouvés plus efficaces pour augmenter la force du gel et ont été utilisés pour la microencapsulation de probiotiques.

Dans une étude de Tsen et al. (2008), la viabilité des cellules de *Lactobacillus acidophilus* a été significativement améliorée lorsqu'elles étaient encapsulées avec du  $\kappa$ -carraghénane lors de la fermentation du jus de tomate et de son stockage à 4 °C pendant 10 semaines en comparaison avec des cellules libres.

Dans une autre étude, l'encapsulation avec du  $\kappa$ -carraghénane a montré une viabilité accrue des bifidobactéries dans le yaourt entreposé plus de 4 semaines à 4°C en comparaison avec les cellules non encapsulées (Adhikari *et al.*, 2000).

Ding et Shah (2009) ont montré que la viabilité de 10 différentes souches probiotiques encapsulées dans du  $\kappa$ -carraghénane a été significativement améliorée dans des simulations d'environnement gastrique et intestinal. Le  $\kappa$ -carraghénane, combiné avec LBG, a réussi à maintenir la viabilité des bactéries lactiques piégées dans une solution de glycérol salée à 4 ° C pendant au moins 11 jours avant d'atteindre  $10^5$  UFC / mL (Audet *et al.*, 1991)

#### **I.2.5.4. L'acétate phtalate de cellulose**

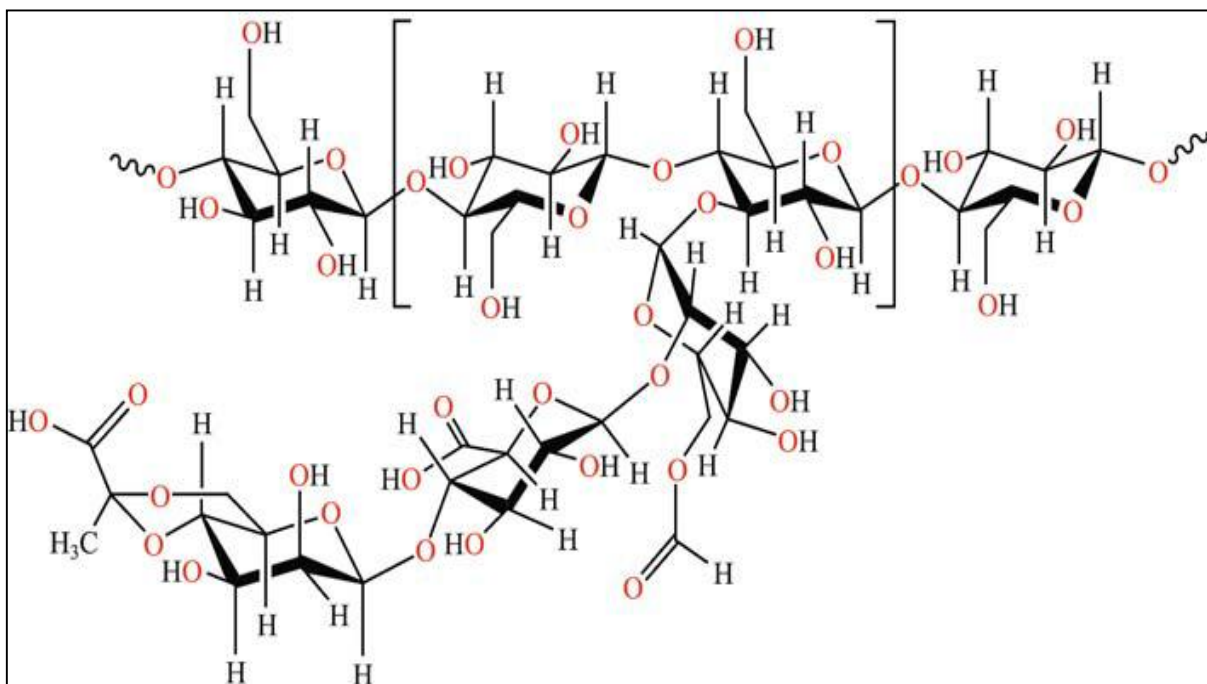
En raison de sa stabilité, l'acétate de cellulose phtalate est utilisé pour contrôler la libération du médicament dans l'intestin (Mortazavian *et al.*, 2008). L'avantage de ce composant est qu'il n'est pas soluble à pH acide (inférieur à 5), mais il est soluble à un pH supérieur à 6.

L'encapsulation de bactéries probiotiques à l'aide d'acétate de cellulose phtalate fournit une bonne protection pour les microorganismes dans des conditions gastro-intestinales simulées (Favaro-Trindade et Grosso, 2002).

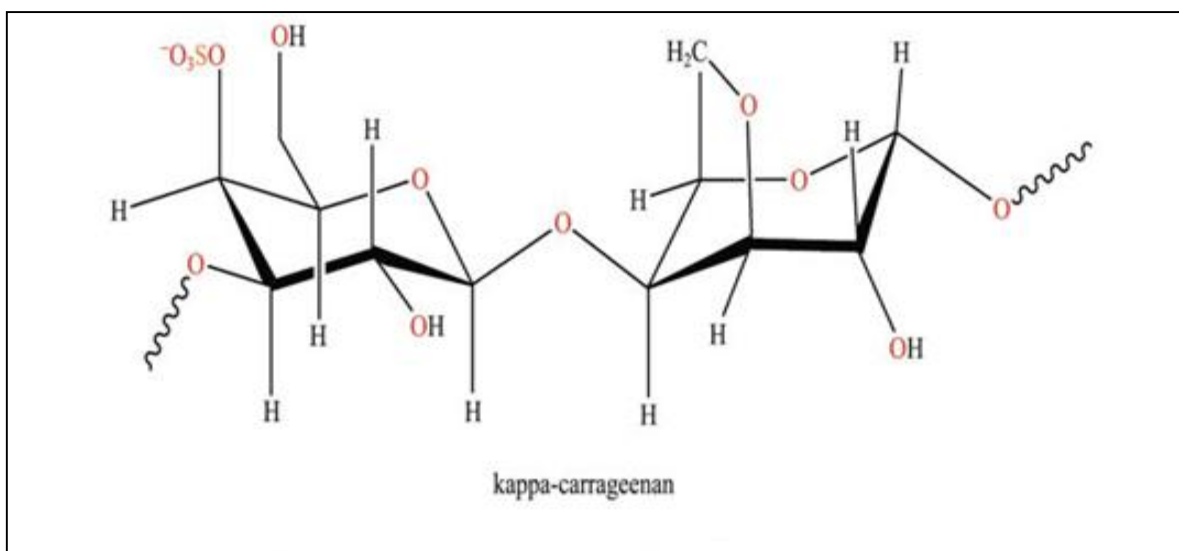
#### **I.2.5.5. Le chitosane.**

Le chitosane est un polysaccharide linéaire composé de motifs glucosamine pouvant se polymériser par réticulation en présence d'anions et de polyanions. Ce matériau n'a pas montré une bonne efficacité d'augmentation de la viabilité cellulaire par encapsulation. C'est ce qui fait qu'il est utilisé de préférence comme un manteau, mais pas comme une capsule (Mortazavian *et al.*, 2008).

En fait, l'encapsulation de bactéries probiotiques avec l'alginate et un revêtement de chitosane assure une protection dans des conditions digestives simulées et qui représente, par conséquent, un bon moyen de livraison des cellules bactériennes viables dans le côlon



**Figure 9** : la gomme de xanthane (SOMA *et al.*, 2009)



**Figure 10** : Structure du kappa-carrageenan (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

(Chávarri *et al.*, 2010). Toutefois, le chitosane présente certains inconvénients et il semble avoir des effets inhibiteurs sur les bactéries lactiques ( LAB ), par exemple (Groboillot *et al.*, 1993).

#### **I.2.5.6. L'amidon.**

L'amidon est un polysaccharide constitué d'un grand nombre d'unités de glucose reliées entre elles par des liaisons glucosidiques. L'amidon se compose essentiellement d'amylose, d'un polymère linéaire de D-glucopyranose reliés par une liaison glucosidique  $\alpha$ -1-4 et l'amylopectine, un polymère ramifié d'unités glucose reliées par une liaison glucosidique  $\alpha$ -1-4 et un lien glycosidique de ramification  $\alpha$ -1-6 (Sajilata *et al.*, 2006).

L'amidon résistant est l'amidon qui n'est pas digéré par les enzymes pancréatiques (amylases) dans l'intestin grêle. L'amidon résistant peut atteindre le côlon où il sera fermenté (Sajilata *et al.*, 2006; Anal et Singh, 2007). Cette spécificité assure une bonne caractéristique de livraison entérique qui représente une bien meilleure libération des cellules bactériennes dans le gros intestin.

En outre, de par sa fonctionnalité prébiotique, l'amidon résistant peut être utilisé par les bactéries probiotiques dans le gros intestin (Mortazavian *et al.*, 2008). Enfin, l'amidon résistant est une surface idéale pour l'adhérence des cellules probiotiques sur les granules d'amidon (Anal et Singh, 2007), ce qui peut améliorer la prestation des probiotiques dans un état viable et un métabolisme actif de l'intestin (Crittenden *et al.*, 2001 ).

#### **I.2.5.7. La gélatine.**

La gélatine est une protéine de gomme, ce qui en fait un gel thermoréversible et a été utilisée pour l'encapsulation de probiotiques, seule ou en combinaison avec d'autres composés.

En raison de sa nature amphotère, elle constitue un excellent candidat pour la coopération avec des polysaccharides anioniques tels que la gomme gellane. Ces hydrocolloïdes sont miscibles à un pH supérieur à 6, à la fois parce qu'ils portent des charges nettes négatives et se repoussent mutuellement.

Cependant, la charge nette de la gélatine devient positive lorsque le pH est ajusté au-dessous du point isoélectrique, ce qui provoque la formation d'une forte interaction avec la gomme gellane chargée négativement (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Anal et Singh, 2007).

### **I.2.5.8. Les protéines du lait**

Les protéines du lait sont des véhicules naturels pour les cellules probiotiques et en raison de leurs propriétés structurelles et physico-chimiques, elles peuvent être utilisées comme système de délivrance de ces cellules (Livney, 2010).

Par exemple, les protéines ont d'excellentes propriétés de gélification et cette spécificité a été récemment exploitée par Heidebach *et al.* (2009a, b) pour encapsuler des cellules probiotiques. Les résultats de ces études sont prometteurs et l'utilisation de protéines de lait reste intéressante en raison de leur biocompatibilité (Livney, 2010).

### **I.3. Capsules et contexte gastro-intestinal.**

Lors de la conception des systèmes de distribution pour l'encapsulation des probiotiques dans le but de fournir une libération contrôlée, il est nécessaire de considérer la physiologie complexe du tractus gastro-intestinal.

Typiquement la libération des bactéries sera déclenchée par la dégradation, à la désintégration ou dissolution de la capsule à travers laquelle les bactéries, généralement trop grosses, ne peuvent pas diffuser (Gombotz *et Wee.*, 1998). Le long du tractus gastro-intestinal, il ya différentes méthodes possibles pour la livraison, en fonction du pH, le temps, la pression péristaltique et la fermentation bactérienne intestinale.

Après l'ingestion, un probiotique microencapsulé va passer vite à travers l'œsophage (prenant environ 10-14 (Cook *et al.*, 2012) et atteindre l'estomac, ce qui représente le compartiment dans lequel a lieu la plus grande perte de viabilité cellulaire en raison de son environnement très acide.

Le pH et le temps de transit à travers l'estomac varient considérablement d'un sujet à l'autre et dépend de nombreux facteurs, tels que le temps écoulé depuis l'alimentation et l'âge. Le pH de l'estomac se situe entre 1 et 2.5 selon le type d'alimentation (Evans *et al.*, 1988), mais peut atteindre 5 chez certains patients à alimentation particulière (Fordtran *et Walsh.*,1973).

Le temps de vidange gastrique est également très variable (McConnell *et al.*, 2008), et il est souvent compris entre 5 min et 2 h, mais la moitié du temps de vidange gastrique a été estimée à l'aide de tests d'haleine au carbone 13 à environ 80,5 min (Hellmig, 2006).

La vidange du contenu de l'estomac est généralement le résultat de l'action péristaltique connue sous la terminologie complexe de « migration myoélectrique » (Janssens *et al.*, 1983), tandis que le sphincter pylorique assure la retenue de grands contenus insuffisamment digérés (Cook *et al.*, 2012). En conséquence, le séjour des particules les plus petites sera plus court.

L'estomac a une capacité de fluide allant jusqu'à environ 1.5 L, mais généralement ne contient que 50 mL à jeûn (Cook *et al.*, 2012). En plus de l'acide chlorhydrique, l'estomac contient également la pepsine, une enzyme protéolytique, qui décompose les protéines.

Après passage dans l'estomac, les microcapsules arrivent dans l'intestin grêle. La durée du transit intestinal est variable de 0.5 à ~ 9,5 h (Cook *et al.*, 2012). Cette variation significative du temps de transit de l'intestin grêle a été observée d'une manière répétée chez un seul patient (McConnell *et al.*, 2008), ce qui implique une grande variabilité interindividuelle.

Le pH de l'intestin grêle se situera dans la gamme de pH 6.15 – 7.35 dans la région proximale et 6.80-7.88 dans l'intestin grêle distal. Après passage dans l'intestin grêle, les capsules atteindront le gros intestin où le pH est compris entre 5.26 et 6.72 dans le côlon ascendant, et entre 5.20 à 7.2 dans le côlon descendant (Cook *et al.*, 2012). Le temps de transit des produits pharmaceutiques dans le gros intestin est très variable, avec une gamme de 6-32h habituellement rapportée (Coupe *et al.*, 1991), mais des durées plus longues ont également été observées (Sathyan *et al.*, 2000). Quand les capsules descendent le tube digestif, la quantité de liquide présente diminue à mesure que le contenu est compacté dans les fèces (McConnell *et al.*, 2008).

Le gros intestin, contrairement au reste du tractus gastro-intestinal, abrite une importante population d'espèces bactériennes indigènes qui dégrade les polysaccharides comme les pectines (Chourasi, 2003). Ce principe a été utilisé comme un mécanisme de libération des petites molécules médicamenteuses encapsulées dans le système digestif (Sinha, Kumria., 2003), mais pas encore pour la livraison de probiotiques. L'adhérence des probiotiques aux muqueuses qui tapissent les tissus épithéliaux est un outil supplémentaire pour le contrôle de leur libération dans le système digestif (Sogias *et al.*, 2008).



Le mécanisme exact de la mucoadhésion n'est pas entièrement élucidé, mais on pense qu'il est fondé sur l'interpénétration des macromolécules mucoadhésives et du mucus, suivie par la mise en place de plusieurs types d'interactions électrostatiques, notamment, les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes (Khutoryanskiy, 2011). Des effets de diffusion et de friction d'ordre mécanique peuvent également être impliqués. Ce type d'adhésion à la surface des muqueuses va augmenter le temps de résidence dans le tractus gastro-intestinal et peut être utilisé en adjonction à des formulations à libération retardée.

#### **I.4. les critères de sélection des biomatériaux pour la microencapsulation :**

Le concept de biomatériaux se traduit généralement par diverses définitions. Une définition souvent acceptée dans le domaine de la biologie et de la médecine est "tout matériau naturel ou non, qui est en contact direct avec une structure vivante et est destiné à agir avec les systèmes biologiques».

Les biomatériaux utilisés pour l'encapsulation des probiotiques comprennent des polymères naturels et polymères synthétiques (Gentile et al., 1995). Les termes biocompatible et biodégradable sont associés à cette notion biomatériaux. Les biomatériaux utilisés pour l'encapsulation des probiotiques sont en contact direct avec les cellules vivantes.

Après microencapsulation, le dispositif de protection à base de biomatériau est destiné à être en contact avec le tube digestif de l'hôte. Pour toutes ces raisons, la plupart des critères généraux développés pour choisir un biomatériau peuvent être appliqués.

Les critères de sélection des biomatériaux pour l'encapsulation des probiotiques sont les suivants: (a) les propriétés physico-chimiques du biomatériau (composition chimique, la morphologie, la résistance mécanique, la stabilité dans les fluides gastriques et intestinaux; (b) son innocuité; (c) les processus de fabrication et de stérilisation.

Le biomatériau le plus couramment utilisé pour l'encapsulation des probiotiques est de l'alginate. D'autres biomatériaux sont aussi utilisés ; il s'agit du carraghénane, de la gélatine, du chitosane, des protéines de lactosérum, l'acétate phtalate de cellulose, la gomme de caroube et des amidons (Gildas et Vandamme, 2012; Ziar et al., 2012).



# **Chapitre II . Matériels et méthodes**

## **CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES.**

L'ensemble de ce travail a été réalisé au laboratoire des micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS, INES de chimie ), faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.

### **II.1. Matériels**

#### **II.1.1. Souches utilisées**

- *Lactobacillus rhamnosus*: souche expérimentale LBRE-LSAS provenant de la collection du laboratoire des micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS, Université de Mostaganem) où elle a été isolée à partir de selles de bébés en bonne santé et ne recevant pas d'antibiothérapie, nourris exclusivement au sein et âgés de 2 à 3 semaines.

- *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* : souche probiotique de référence, connue commercialement sous la désignation Bb-12 (Chr. Hansen-Danemark).

**II.1.2. Galactomannanes** : il s'agit de la gomme brute non purifiée préparée au laboratoire à partir des graines de caroube, de la région Tissemsilet.

**II.1.3. Alginate de sodium** : la poudre d'alginate de sodium E 401 (GRINDSTED R. Alginate FD 120059912 Material no, Danisco-France), nous a été aimablement offerte par la firme Danisco à Alger.

**II.1.4. Les sels biliaires** : mixture de sels biliaires : cont. Sodium dihydroxy-3 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -cholan-5 $\beta$  oate-24, référence R : 22 ; Merck KGaA (Allemagne).

**II.1.5. le xanthane** : Xanthan gum from *Xanthomonas campestris* de la marque G1253 Sigma.

**II.1.6. carraghénane** : (E407, Danisco, ALger)

### II.1.7. Les milieux de culture

- **Bouillon MRS- cys** : Le bouillon MRS de MAN, ROGOSA et SHARPE (De Man et al., 1960), référence E Merck, 64271 Darmstadt, Allemagne, additionné de chlorhydrate de cystéine à 0.05% a été utilisé pour la réactivation des souches LBRE-LSAS, Bb12
- **MRS cystéiné gélosé (MRS- cys)** : Il s'agit du milieu MRS bouillon additionné de 15g d'agar –agar, et réparti dans des flacons et autoclavé 15 minutes à 121°C.

## II.2. Repiquage et revivification

Les souches utilisées étaient conservées dans des Eppendorf à une température de -70°C. Elles sont réactivées et maintenues vivantes par un repiquage d'un inoculum de 1% dans le milieu MRS bouillon, incubées à 37°C pendant 24 h et sont ensuite conservées à 4°C.

### II.2.1. Vérification de l'identité des souches

Avant de procéder aux cultures, les souches bactériennes utilisées ont été sujettes aux colorations au bleu de méthylène et de Gram.

### II.2.2. Préparation de l'inoculum

72 heures avant de commencer chaque expérience, les cultures sont revivifiées par une série de trois inoculations de 200 microlitres dans 10 ml de MRS bouillon et incubées à 37°C pendant 24h dans une jarre d'anaérobiose avec système générateur de CO<sub>2</sub> (Anaérocult).

### II.2.3. Ajustement de l'inoculum

L'ajustement de l'inoculum s'effectue à l'aide d'une cellule de Thoma. La formule de dénombrement est la suivante :

$$X = 4 \cdot 10^6 \cdot n$$

Où: X: nombre de cellules dans 1 mL.

n : nombre de cellules dénombrées dans un carré.

### **II.3. Préparation de la solution de galactomannanes**

Les galactomannanes ont été extraits de la caroube suivant la méthode décrite par [Dakia et al. \(2008\)](#).

- Peser 100 g de graines (~780) de caroube.
- Chauffer à ébullition 100°C les graines de caroubes dans 800 mL d'eau distillée pendant 1 heure.
- Séparer le tégument et le germe de l'endosperme manuellement.
- Mettre les endospermes à sécher dans un four à 100°C pendant 1- 2 heures jusqu'au poids stable.
- Ecraser les endospermes séchés pour en faire de la poudre. Pour l'obtention d'une farine fine, utiliser un molinex.
- Utiliser la farine de galactomannanes pour préparer la solution de galactomannanes à 2% (p/v) dans l'eau distillée stérile.

### **II.4. Technique d'encapsulation des cellules bactériennes ([Ziar et al.,2012](#))**

- Préparer une solution stérile d'alginate de sodium à 1.8 %.
- Préparer une solution stérile de CaCl<sub>2</sub> à 0.1 M.
- Dans un bécher stérile verser 100 mL d'huile végétale (Tournesol et Soja)
- Additionner 1mL de polysorbate 80.
- Préparer un mélange de culture bactérienne (culot lavé une fois et dont la charge microbienne est ajustée), de solution de galactomannanes stérile (par ébullition à 80°C / 30 min) et de la solution d'alginate de sodium .
- Agiter doucement le mélange et faire tomber doucement des microgouttelettes du mélange réalisé sur l'huile.
- Le mélange doit être agité entre 200 à 400 tours/ min pendant 20 minutes.
- Ajouter doucement par coulage sur les parois, une solution de CaCl<sub>2</sub> (100 à 200 mL) jusqu'à ce que l'émulsion se rompe.
- Après 15 minutes d'agitation, séparer les capsules formées d'alginate de calcium-galactomannanes de la phase aqueuse.

- Rincer 2 fois avec une solution saline stérile (0.9% NaCl + 5% glycérol) et puis conserver dans des tubes stériles hermétiquement clos à 4°C.

**Remarque :** lors de l'utilisation de carraghénane le même protocole décrit précédemment sauf à la place de CaCl<sub>2</sub> on utilise KCl à 0.1M .

## **II.5. Tests de survie des souches encapsulées aux conditions digestives simulées in vitro. (model gastro-intestinal simulé)**

Les souches encapsulées ou libres ont été confrontées aux hostilités digestives simulées in vitro par reproduction des conditions de pH, d'enzymes et de bile du système digestif humain.

Les bactéries libres ou encapsulées (100µL d'une suspension à 1.10<sup>8</sup> UFC/mL) sont exposées à l'environnement physico-chimique stomacal (incubation de 2h dans du tampon HCl-KCl (0,1 M) additionné de 0.3% de pepsine: P/V, pH 2, agitation 100 tours/min) et intestinal stériles (les cellules « 100µL » issues de la première incubation de 2h sont transférées dans un tampon phosphate (0,1M) additionné de 0.3% de bile: P/V, pH 6.5, pour être de nouveau incubées pendant 16h sous agitation de 100 tours/min ).

Les incubations sont réalisées à 37°C dans une jarre d'anaérobiose grâce au système générateur de CO<sub>2</sub> Anaérocult.

La survie des bactéries encapsulées ou libres aux conditions hostiles de l'estomac et de l'intestin est évaluée par dénombrement des cellules à différents intervalles de temps d'incubation.

## **II.6. Analyses microbiologiques**

- La biomasse est déterminée par ensemencement en surface de 100µL sur milieu approprié de la dilution adéquate.
- Les dilutions décimales permettant le dénombrement seront réalisées dans la solution de dilution simple (DS).
- Le nombre de cellules viables, déterminé 3 fois, est calculé à partir de colonies appropriées obtenues après incubation de la souche considérée sur milieu spécifique et est exprimé en log UFC/mL.
- Pour dénombrer les cellules encapsulées qui ont survécu au stress physico-chimique: prendre 1mL de l'échantillon et le diluer dans 9 mL du tampon phosphate de sodium (PBS 0.2 M, pH = 7.), agiter vigoureusement 20 min à 4°C

pour la libération totale des cellules de leurs capsules (Godward et Kailasapathy, 2003) et procéder comme auparavant.

## **II.7. Traitement statistique des résultats**

Chaque test a été indépendamment réalisé en 3 exemplaires et chaque exemplaire a été 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 6.1, France).

La comparaison des moyennes a été réalisée par le test de Student-Newman-Keuls au seuil de 5% pour comparaison multiple. A  $P < 0.05$ , la différence est considérée significative.

A decorative graphic of a scroll with a black outline and rounded corners. The top and bottom edges are slightly curved. There are two grey, semi-circular elements on the left side, one near the top and one near the bottom, suggesting the scroll is unrolled.

# **Chapitre III**

## **Résultats et discussion**



## **Chapitre III : Résultats et discussion**

Après leur microencapsulation aux gels de galactomannanes extraits de graines de caroube seuls ou combinés à l'alginate-calcium, au carraghénane ou au xanthane, les souches lactiques *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 ont été soumises aux conditions digestives simulées in vitro dans le but de tester leur viabilité dans un environnement physico-chimique et enzymatique rappelant celui de l'estomac et de l'intestin (acidité, pepsine, bile).

### **III.1. Effets de l'encapsulation avec divers biomatériaux sur la survie in**

#### **vitro de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 aux conditions gastriques simulées.**

Les souches bénéfiques *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 libres (témoin) ou encapsulées (échantillon) ont été soumises aux conditions gastriques simulées par l'addition de l'enzyme pepsine (3g/l) et l'ajustement du pH à 2 pour créer l'environnement acide de l'estomac. La survie des bactéries a été évaluée après des séjours de 30, 60 et 120 min dans cet environnement acide.

#### **III.1.1. Effets de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube seuls sur la survie des deux souches lactiques LBRE-LSAS et Bb12 aux conditions gastriques.**

L'utilisation des galactomannanes seuls dans l'encapsulation des deux souches bénéfiques, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* a montré une légère différence dans la viabilité de ces souches par rapport à leur état

libre (non encapsulées) lorsqu'elles sont soumises à un environnement gastrique simulé in vitro (fig. 11).

La biomasse initiale (9.1 log UFC/mL) de la souche *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS non encapsulée (cellules à l'état libre représentant le témoin) enregistre un taux de diminution de l'ordre de 15.05% (soit une réduction de -1.37 log UFC/mL) après 30 min d'exposition aux conditions gastriques (pepsine: 3g/L et pH = 2).

Pour cette même durée d'exposition (30 min), ces mêmes cellules encapsulées survivent légèrement, mais alors, à peine mieux dans cet environnement gastrique hostile, puisqu'une diminution du nombre de cellules vivantes de 13.04% (soit une réduction de -1.20 log UFC/mL) seulement a été enregistrée (fig. 11A).

La poursuite de l'exposition de cette souche LBRE-LSAS à l'acidité de l'estomac à 60 min provoque une perte cellulaire supplémentaire à celle déjà enregistrée entre 0 et 30 min équivalente à 1.73 log UFC/mL, totalisant 3.1 log UFC/mL de cellules perdues entre 0 et 60 min d'exposition (soit un taux de diminution de la biomasse initialement engagée dans ce test équivalent à -34.06%) à l'état non encapsulée (état libre ou témoin) (fig.11A).

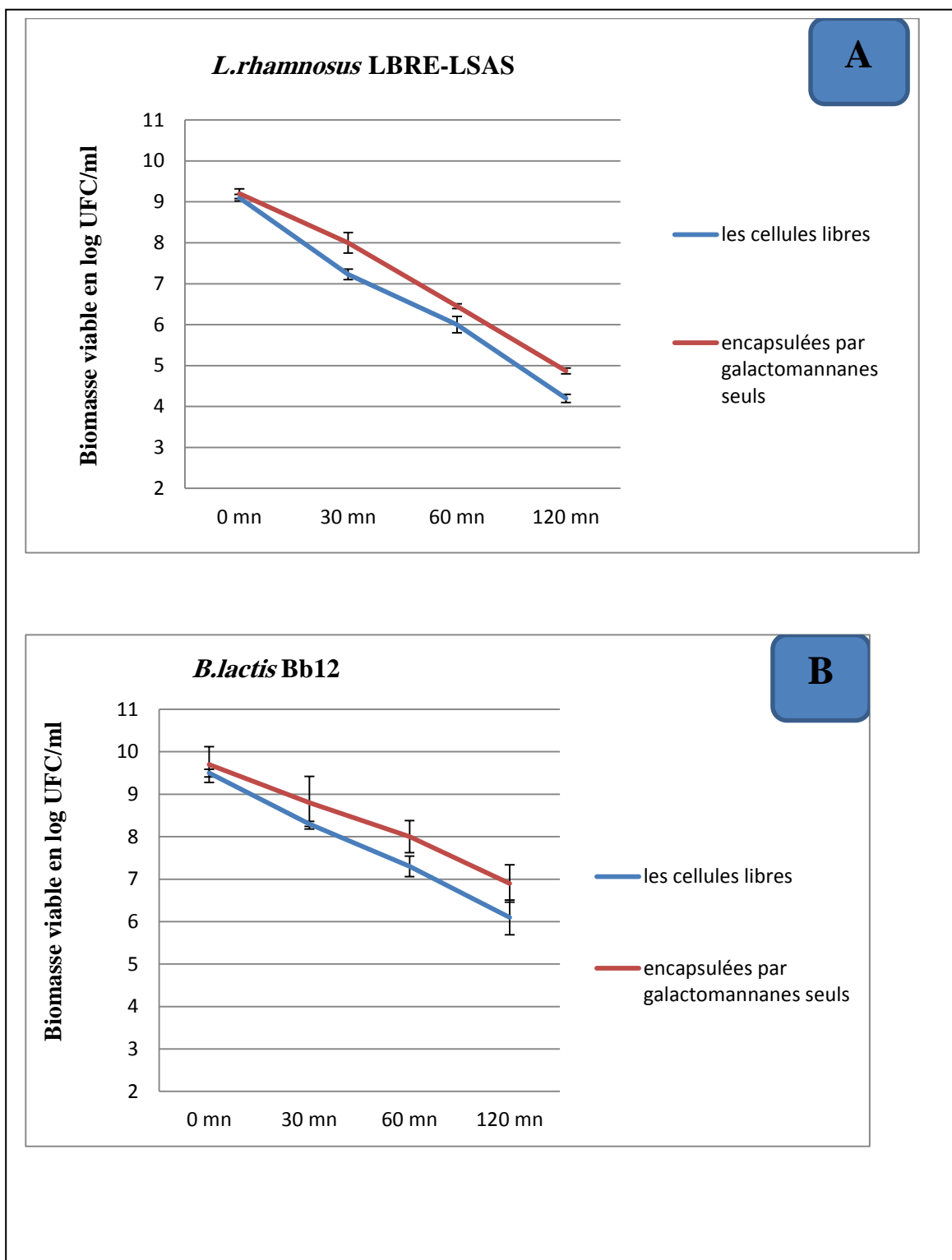
L'effet de l'encapsulation de *L. rhamnosus* LBRE-LSAS sur sa survie se fait encore sentir d'une manière très légère pendant cette même durée d'exposition (60 min) des capsules de cellules à l'environnement gastrique, puisque le nombre de bactéries diminue de 1.55 log UFC/mL (soit -13.04%) entre la 30<sup>ème</sup> et la 60<sup>ème</sup> minute d'exposition, totalisant une réduction de 2.75 log UFC/mL (soit - 29.89%) seulement entre le début (0 min) et la 60<sup>ème</sup> minute.

La prolongation du temps de séjour dans les conditions gastriques des cellules de *L. rhamnosus* LBRE-LSAS libres et encapsulées dans le gel de galactomannanes de caroube à 120 min ne va pas changer cette tendance à la baisse de la viabilité, et surtout ce léger effet protecteur des capsules ; de sorte qu'entre la 60<sup>ème</sup> et la 120<sup>ème</sup> minute, les pertes du lactobacille à l'état libre (non encapsulé) ne sont que légèrement supérieures (1.80 log UFC/mL ; soit une diminution de 30%) que celles de l'état encapsulé (1.58 log UFC/mL ; soit une diminution de 24.49%).

En considérant la totalité du séjour de la souche *L. rhamnosus* LBRE-LSAS dans les conditions gastriques, c'est-à-dire de 0 à 120 min, il apparaît qu'elle perd, respectivement, 4.90 et 4.33 log UFC/mL de biomasse à l'état libre et encapsulée dans le gel de galactomannanes de caroube ; ce qui correspond à des taux de pertes respectifs de sa survie équivalents à 53.84 et 47.06%.

En récapitulant, il apparaît que *L. rhamnosus* LBRE-LSAS n'est pas efficacement protégée contre l'environnement gastrique par les capsules faites de galactomannanes de caroube.

Si on regarde maintenant les résultats concernant la souche probiotique *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* ou Bb12, on remarque qu'elle résiste globalement mieux à l'environnement gastrique par rapport à *L. rhamnosus* LBRE-LSAS étant donné les taux de survie plus élevés enregistrés, soit à l'état libre (64.20 versus 46.16%), soit à l'état encapsulée aux galactomannanes (71.13 versus 52.94%) (fig.11B). Il faut avouer que cette plus grande résistance de *Bifidobacterium* à l'environnement gastrique hostile est quelque peu surprenante au vu de la grande vulnérabilité de ce genre bactérien à l'acidité rapportée dans la littérature. Néanmoins, tout en gardant à l'esprit la nécessité de vérifier la reproductibilité de ces résultats, et en



**Figure11:** Effet de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube **seuls** sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (**A**) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (**B**) aux conditions gastriques simulées in vitro (3g/L pepsine et pH 2).

dépôt de cette forte survie, ces observations constituent un argument en faveur de l'effet positif de l'encapsulation des cellules sur leur survie aux conditions gastriques.

Au bout de 30 min de séjour des cellules bifides Bb12 non encapsulées (état libre représentant le témoin) dans le milieu gastrique simulé, il y a perte de 12.63% (soit -1.2 log UFC/mL) de biomasse ; alors qu'à l'état encapsulée dans le gel de galactomannanes de caroube, ces pertes sont limitées à 9.27% (soit 0.9 log UFC/mL).

La prolongation de ce séjour à 60 min ne modifie pas cette tendance à la différence des pertes en biomasse bifide entre bactéries libres et encapsulées, et qui est à l'avantage, évidemment, des cellules encapsulées qui sont légèrement moins touchées par l'acidité gastrique qui leur est imposée.

En effet, dans l'intervalle 30-60 min de séjour des cellules Bb12 non encapsulées (libres = témoin) dans l'environnement gastrique, on enregistre des pertes de l'ordre de 12.05% (soit 1 log UFC/mL) pour les cellules non encapsulées (libres), et de 8.25% (soit 0.8 log UFC/mL) pour celles qui ont été encapsulées aux galactomannanes de caroube.

Si on ajoute ces pertes à celles enregistrées entre 0 et 30 min, il apparaît que 23.15% (soit 2.2 log UFC/mL) des cellules Bb12 libres et 17.52% (soit 1.7 log UFC/mL) des cellules Bb12 encapsulées disparaissent (fig.11B).

Dans l'intervalle 60-120 min de séjour des cellules bifides Bb12 dans l'environnement gastrique, on a enregistré des pertes de biomasse de l'ordre de 16.43% (soit 1.2 log UFC/mL) pour les cellules non encapsulées et de 11.34% (soit 1.1 log UFC/mL) pour les cellules encapsulées.

Si on considère les pertes de cellules Bb12 cumulées durant toute la durée de leur exposition aux conditions gastriques (entre 0 et 120 min), on pourra dire que les cellules

non encapsulées et encapsulées aux galactomannanes de caroube sont perdues à hauteur de 35.80 et 28.87%, respectivement.

Ces résultats dénotent clairement qu'il existe une certaine protection des bactéries bénéfiques par les galactomannanes de caroube, combien même elle est faiblement exprimée, vis-à-vis des hostilités gastriques, représentées, essentiellement, par l'acidité et l'enzyme pepsine.

Cependant, l'analyse statistique des résultats a révélé qu'il n'y a pas de différences significatives ( $P < 0.05$ ) dans la survie des cellules libres et des cellules encapsulées dans les deux souches testées LBRE-LSAS et Bb12 aux galactomannanes de caroube seuls.

**Ding et Shah (2009b)** ont utilisé la gomme LBG (Locust Bean Gum) dans l'encapsulation des dix souches probiotiques qu'ils avaient soumises à l'acidité gastrique simulée ( $\text{pH} = 2$ ). Ils ont constaté que toutes les souches testées ont subi une perte progressive de leur viabilité au cours de leur séjour dans cet environnement acide. Après 120 min de séjour, le nombre de cellules viables était inférieur à 6 log UFC/mL, valeur qui représente le niveau minimal requis pour espérer l'effet bénéfique attendu in vivo de la part de souches probiotiques (**Pimentel-Gonzalez, 2009**).

**Soma et al. (2009)** ont rapporté que la LBG ne possède pas un pouvoir de gélification suffisamment élevé pour être utilisée seule comme matériau unique d'encapsulation des bactéries probiotiques. Ces auteurs avaient suggéré de l'utiliser en association avec d'autres biomatériaux comme les carrhagénanes ou le xanthane pour bénéficier d'un effet synergique développant un pouvoir gélifiant suffisamment résistant.

### **III.1.2. Effets de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés à l'alginate de sodium sur la survie des deux souches lactiques LBRE-LSAS et Bb12 aux conditions gastriques.**

La survie des deux souches testées à l'état libre (non encapsulées = témoin) ou encapsulées par le gel mixte de galactomannanes de caroube et d'alginate de sodium dans des conditions gastriques simulées in vitro (par 3g/L pepsine et pH 2) est représentée dans la figure 12.

Avant incubation des souches (0 min d'exposition), la biomasse viable de la souche *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS est de 8,9 log UFC/mL pour les cellules libres (non encapsulées). Trente minutes après un séjour dans les conditions acides et en présence de pepsine, cette biomasse non encapsulée est perdue à un taux de l'ordre de 15.05% (soit - 1.37 logUFC/mL).

En revanche, au cours de cette même durée de séjour (0-30 min) et lorsque ces mêmes cellules sont encapsulées au gel mixte «galactomannanes de caroube-alginate de sodium», les pertes en cellules sont plus faibles et représentent 8.16% de la biomasse de départ seulement (soit -0.8 log UFC/mL) (fig. 12A).

Lorsque le temps de séjour des cellules est prolongé à 60 min, et si l'on considère l'intervalle du temps d'exposition 30 à 60 min, on remarquera que les pertes de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS non encapsulées augmentent plus et, atteignent un taux équivalent à 22.38% (soit -1.73 log UFC/mL) par rapport à la biomasse mesurée à 30 min ; alors que celles des encapsulées au gel mixte galactomannanes de caroube-alginate de sodium sont, non seulement beaucoup plus inférieures dans cet intervalle (6.67% soit - 0.6 log UFC/mL seulement), mais aussi par rapport à celles enregistrées pour les cellules encapsulées dans l'intervalle 0-30 min (8.16% soit -0.8 log UFC/mL, voir précédemment).

Les pertes enregistrées pour ce lactobacille pendant la totalité des 60 minutes (c'est-à-dire de 0 à 60 min) de son exposition à l'environnement gastrique s'élèvent à 34.06% (soit 3.1 log UFC/mL) à l'état libre (non encapsulé) et à seulement 14.28% (soit 1.4 log UFC/mL) quand il est encapsulé dans le gel mixte de galactomannanes de caroube et d'alginate de sodium. Il apparaît ainsi que les capsules fabriquées exercent bel et bien un effet protecteur de la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS aux conditions d'acidité, en particulier, de l'estomac.

Ces pertes s'accroissent davantage avec la poursuite de l'exposition de cette souche à ces conditions gastriques pendant, encore, 60 minutes supplémentaires. En effet, dans l'intervalle 60-120 min, on enregistre, respectivement, des pertes de l'ordre de 30% (soit 1.8 log<sup>0</sup> UFC/mL) et de 11.90% (soit 1 log UFC/mL) pour les cellules libres (non encapsulées) et celles encapsulées dans le gel mixte de galactomannanes de caroube et d'alginate de sodium (fig.12A).

Cet effet positif de l'encapsulation sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS à l'acidité gastrique est clairement mis en évidence lorsqu'on compare les résultats obtenus sur toute la durée de l'exposition des cellules (soit de 0 à 120 min). En effet, 53.84% (soit 4.9 log UFC/mL) des cellules non encapsulées sont perdues contre, seulement, 35.79% (soit 3.4 log UFC/mL) dans le cas des mêmes cellules encapsulées dans le gel associant les galactomannanes de caroube à l'alginate (fig.12A).

Dans les mêmes conditions gastriques, la survie de la souche probiotique, *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12, s'est révélée plus forte que celle du lactobacille, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS ; que cela soit à l'état libre (non encapsulée) ou encapsulé aux galactomannanes de caroube associés à l'alginate.



Pendant les 30 premières minutes de l'exposition, 13.18% (soit 1.20 log UFC/mL) des cellules bifides non encapsulées sont perdues ; alors que seulement 1.01% (soit 0.1 log UFC/mL) des cellules encapsulées le sont. La différence est nette quant à l'efficacité des biomatériaux utilisés dans l'élaboration du gel d'encapsulation à préserver la survie de cette souche (fig.12B).

Dans l'intervalle 30-60 min, la survie de la Bb12 diminue encore à un taux de 12.05% (soit 1 log UFC/mL) quand elle n'est pas encapsulée et de 8.16% (soit 0.8 log UFC/mL) sous forme encapsulée.

Si l'on se réfère à la biomasse initiale d'avant incubation (0 min) et au bout d'une heure d'exposition, la souche Bb12 s'avère beaucoup plus résistante à l'environnement hostile de l'estomac que le lactobacille LBRE-LSAS, puisque les pertes de survie ne sont que de 23.16 versus 34.06% (soit 2.2 versus 3.1 log UFC/mL) à l'état libre (non encapsulée) et de 9.09 versus 14.28% (soit 0.9 versus 1.4 log UFC/mL).

Lorsque le temps d'exposition des cellules est poursuivi à 120 min, il apparaît qu'entre 60 et 120 min, il y a maintien du rythme de pertes en cellules Bb12 à un niveau de 16.43% (soit 1.2 log UFC/mL) à l'état libre (non encapsulé) et de 6.67% (soit 0.6 log UFC/mL) à l'état encapsulé. Cette différence quantitative dans les pertes en cellules encapsulées en non encapsulées persiste pour affirmer sans équivoque l'efficacité du gel mixte de galactomannanes associés à l'alginate de sodium dans la protection de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 contre l'hostilité gastrique (fig.12B).

Au cours de la totalité du séjour dans les conditions gastriques simulées (de 0 à 120 min), la souche Bb12 affiche des pertes de l'ordre de 35.79% (soit 3.4 log UFC/mL) versus 53.84% (soit 4.9 log UFC/mL) pour le lactobacille LBRE-LSAS à l'état non encapsulée ;

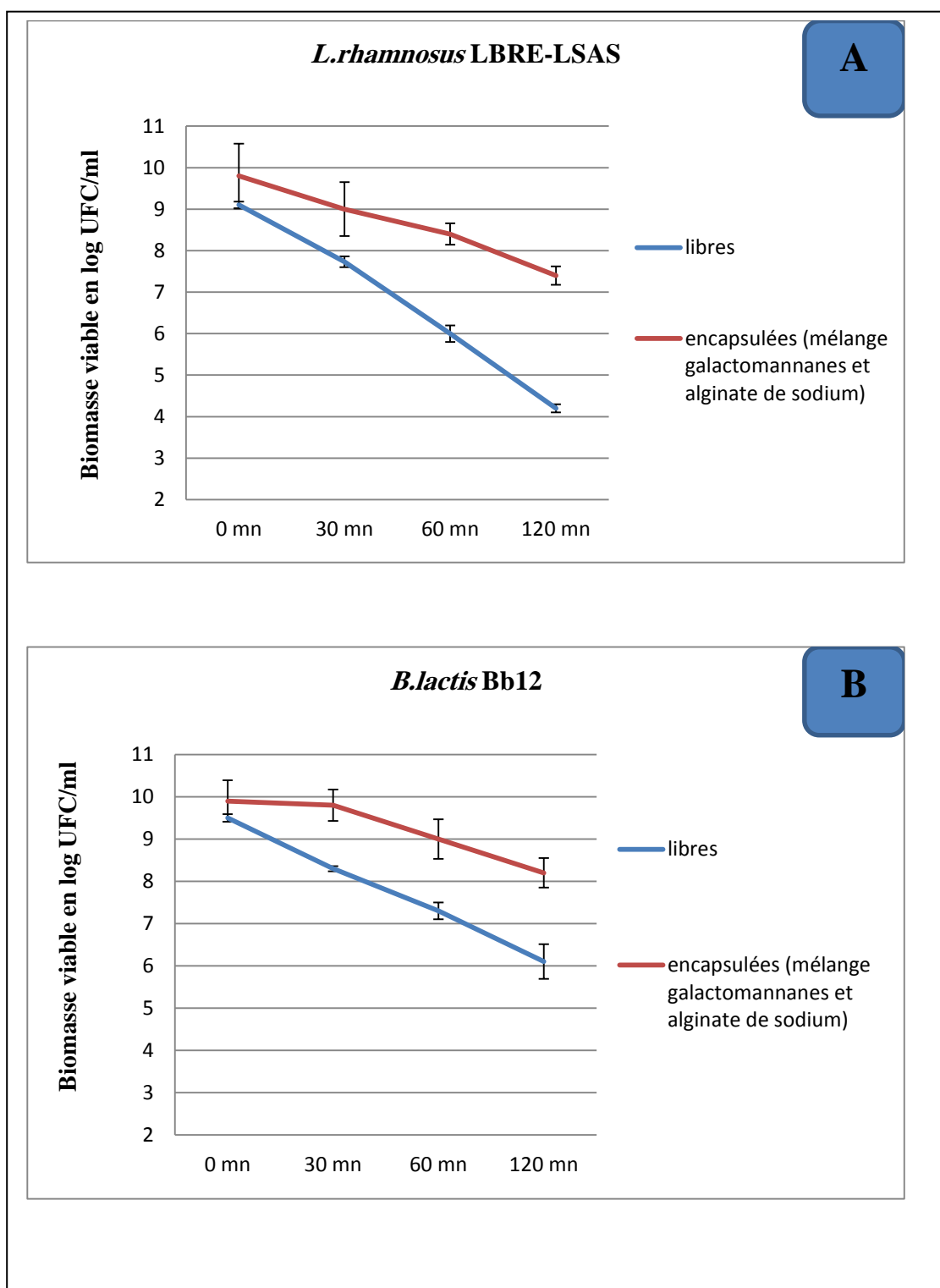
et de 17.17% (soit 1.7 log UFC/mL) versus 24.49% (soit 2.4 log UFC/mL) pour LBRE-LSAS à l'état encapsulé.

Ces observations confirment l'efficacité des galactomannanes combinés à l'alginate de sodium dans la préservation de la survie des deux souches testées vis-à-vis de l'environnement gastrique qui constitue le facteur limitant le plus important dans l'utilisation des probiotiques d'une manière globale.

**Pimentel-González et al. (2009)** avaient montré que la microencapsulation de *Lactobacillus rhamnosus* par le lactosérum garantissait une biomasse de 7 log UFC/mL, alors que le nombre de cellules non encapsulées était plus faible 4.7 log UFC/mL.

Par ailleurs, une étude menée par **Ding et Shah (2009a)** a montré que l'encapsulation de *Lactobacillus rhamonosus* avec de l'alginate de sodium pouvait maintenir une biomasse viable acceptable (6.11 log UFC/mL) après 120 min de séjour dans des conditions gastriques simulées. Ces résultats sont similaires à ceux de la présente expérience.

Dans la présente expérience, la survie de *Lactobacillus rhamonosus* LBRE-LSAS encapsulée dans le gel mixte de galactomannanes de caroube combinés à l'alginate de sodium survie mieux (7.4 log UFC/mL) à l'environnement gastrique.



**Figure 12 :** Effet de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés à l'alginate de sodium sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (A) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (B) aux conditions gastriques simulées in vitro (3g/L pepsine et pH 2).

Selon **Sohail et al. (2011)**, l'encapsulation de *Lactobacillus rhamnosus* avec un gel d'alginate de sodium seul ne permettait aucune survie (taux de survie nul) à ce lactobacille après un séjour de 60 min seulement dans des conditions gastriques ; c'est-à-dire qu'il y avait mort cellulaire sévère ; alors que cette même étude a démontré que l'alginate de sodium combiné avec le chitosane améliorait significativement la survie de cette même souche (*Lactobacillus rhamnosus*) qui affichait une biomasse viable de 8.6 log UFC/mL après 120 min d'incubation dans les mêmes conditions gastriques.

Dans l'étude citée plus haut (**Ding et Shah, 2009a**), il a été montré qu'après 120 minutes d'incubation dans un environnement gastrique, *Bifidobacterium lactis* type BI-07 encapsulé dans un gel d'alginate de sodium affichait un niveau de survie de l'ordre de 5.93 log UFC /mL.

Les niveaux de survie aux conditions gastriques de la souche bifide Bb12 encapsulée dans le gel mixte de galactomannanes de graines de caroube combinés à l'alginate de sodium que nous avons obtenus dans ce travail sont plus élevés (8.2 log UFC/mL) que ceux de Ding et Sah (2009a).

**Cook et al. (2012)** ont également rapporté que le gel mixte d'alginate de sodium avec le chitosane assurait mieux la survie du *Bifidobacterium breve* dans les conditions gastriques simulées après 120 minutes de séjour ; alors le polymère d'alginate seul ne pouvait pas maintenir une survie supérieure à 2 log UFC/mL .

Dans une autre étude, **Chavarri et al. (2010)** ont également utilisé l'alginate de sodium combiné avec le chitosane dans l'encapsulation des deux souches probiotiques, *Lactobacillus gasseri* et *Bifidobacterium bifidum*, qu'ils avaient soumises à des conditions gastro-intestinales simulées. Ils avaient observé que le gel mixte d'alginate-chitosane

améliorerait la survie de ces souches probiotiques dans les conditions gastriques et notamment celle de *Bifidobacterium bifidum* qui s'est avérée plus résistante que *Lactobacillus gasseri* à l'environnement acide de l'estomac.

Dans le même contexte, **Jayalalitha et al. (2012)** ont utilisé un gel mixte d'alginate et d'amidon pour encapsuler quatre souches, deux lactobacilles (*L. acidophilus* et *L. helveticus*) et deux bifidobactéries, qu'ils avaient soumises aux conditions hostiles de l'estomac. Leurs résultats montrent que les lactobacilles sont plus résistantes à ces conditions gastriques simulées que les bifidobactéries. Il est à noter que les deux lactobacilles sont répertoriées acido-tolérantes.

### **III.1.3. Effets de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés au carraghénane sur la survie des deux souches lactiques LBRE-LSAS et Bb12 aux conditions gastriques.**

Dans cette expérience, nous avons également testé l'efficacité du gel mixte de galactomannanes de caroube combinés au carraghénane à protéger *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 vis-à-vis de l'environnement gastrique.

Au bout de 30 min de séjour de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS dans les conditions gastriques simulées, nous avons enregistré 11.11% (soit 1 log UFC/mL) et 4.12% (soit 0.4 log UFC/mL) de pertes de biomasse pour les cellules libres (non encapsulées) et les cellules encapsulées, respectivement.

Pour cette même souche, la prolongation de son séjour à 60 min, et, en considérant l'intervalle de séjour 30-60 min, fait chuter sa biomasse de 13.50% (soit 1.08 log UFC/mL)

et de 7.94% (soit 0.75 log UFC/mL) lorsqu'elle est non encapsulée et encapsulée, respectivement (fig.13A).

Dans l'intervalle de séjour 0-60 min, les pertes en biomasse de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS s'élèvent à 23.12% (soit 2.08 log UFC/mL) quand elle n'est pas encapsulée (libre) et à seulement 11.85% (soit 1.15 log UFC/mL) quand elle est encapsulé dans le gel associant les galactomannanes de caroube au carraghénane.

Lorsque cette souche est maintenue dans l'environnement gastrique une heure de plus (soit au total 120 min), la biomasse enregistrée après 60 min de séjour diminue encore au point de séjour 120 min de 25.87% (soit 1.79 log UFC/mL) dans le cas des cellules non encapsulées et de 18.13% (soit 1.55 log UFC/mL) dans le cas de celles qui ont été encapsulées dans le gel mixte (fig.13A).

Si on calcule les pertes de biomasse de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS entre 0 et 120 min de séjour dans les conditions gastriques simulées, on voit que ces cellules sont perdues à hauteur de 43% (soit 3.87 log UFC/mL) lorsqu'elles sont à l'état libre (non encapsulées) et de 27.83% seulement (soit 2.70 log UFC/mL) une fois encapsulées aux galactomannanes de caroube associés au carraghénane (fig.13A).

Il ressort de ces observations que la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS aux conditions gastriques simulées est multiplié par un facteur de 1.54 quand ces cellules sont encapsulées dans ce gel mixte (les cellules non encapsulées étant prises comme témoin) ; alors que dans les autres gels, ce facteur est seulement de 1.14 pour les capsules aux galactomannanes de caroube seuls et de 2.19 pour celles fabriquées au gel mixte associant les galactomannanes de caroube à l'alginate de sodium.

D'une manière générale, la souche bifide probiotique *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 résiste beaucoup mieux que le lactobacille *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS aux conditions hostiles de l'estomac.

En effet, après 30 min de séjour de la souche Bb12 dans l'environnement gastrique simulé, les pertes en cellules enregistrées sont de l'ordre de 9.78% (soit 0.90 log UFC/mL) lorsqu'elles sont à l'état libre (non encapsulées) et de seulement 3.57% (soit 0.35 log UFC/mL) une fois encapsulées dans le gel mixte associant les galactomannanes de caroube au carraghénane (fig.13B).

La poursuite de l'exposition de la souche bifide Bb12 à cet environnement acide et en considérant les pertes en cellules ayant eu lieu dans l'intervalle 30-60 min, on remarque qu'elles sont équivalentes à 12.04% (soit 1 log UFC/mL) à l'état libre (non encapsulées) et de 6.88% (soit 0.65 log UFC/mL) seulement à l'état encapsulé.

Ceci indique qu'entre 0 et 60 min de séjour en milieu gastrique simulé, la viabilité de la souche Bb12 se perd à hauteur de 20.65% (soit 1.90 log UFC/mL) quand elle n'est pas encapsulée, et seulement de 10.20% (soit 1 log UFC/mL) sous forme encapsulée. Comme on le constate, ces pertes varient du simple au double selon que cette souche est encapsulée ou pas.

La prolongation de l'exposition de cette souche Bb12 à l'hostilité gastrique à 120 min montre que dans l'intervalle 60-120 min, il y a 12.33% (soit 0.9 log UFC/mL) de pertes de viabilité des cellules libres (non encapsulées), et 9.09% (soit 0.8 log UFC/mL) de celles encapsulées au gel mixte de galactomannanes de caroube combinés au carraghénane (fig.13B).

Si on considère la totalité du temps du séjour (0 à 120 min) de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 dans l'environnement gastrique simulé, les pertes de viabilité s'élèvent à 30.43% (soit 2.80 log UFC/mL) pour les cellules non encapsulées (libres) et à seulement 18.37% (soit 1.8 log UFC/mL) pour celles encapsulées (fig.13B).

La viabilité de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 dans les conditions gastriques simulées in vitro est multipliée par un facteur de 1.65 lorsque les cellules sont encapsulées dans le gel mixte de galactomannanes de caroube combinés au carraghénane ; alors que ce facteur était de 1.54 dans le cas de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS.

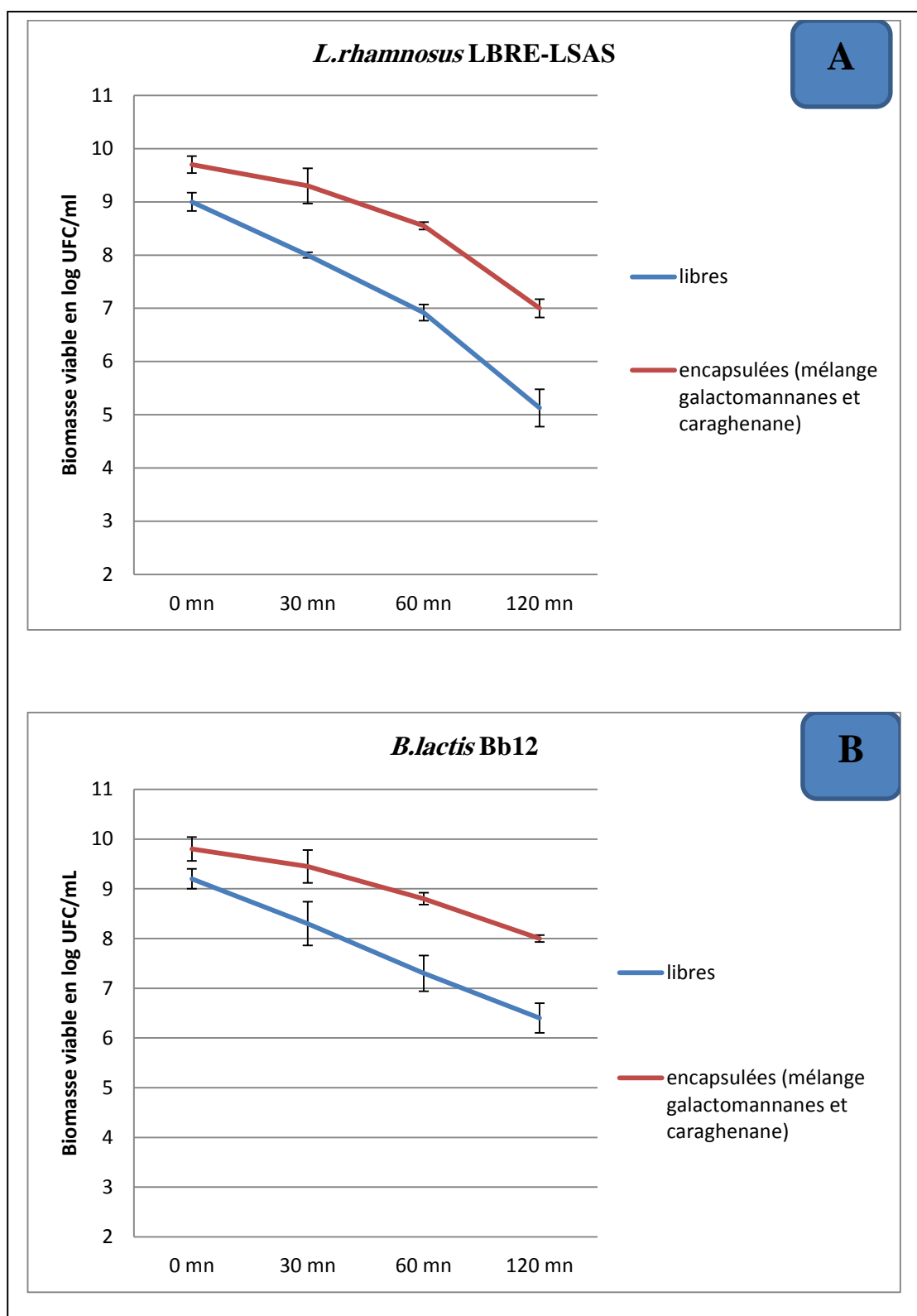
Ainsi, ces résultats mettent clairement en évidence l'effet préservateur de la viabilité de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 et de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS exercé par la combinaison des galactomannanes de caroube au carraghénane dans la fabrication des capsules.

Certains hydrocolloïdes, notamment les galactomannanes constitués de chaînes linéaires de mannose, sur lesquels sont branchés irrégulièrement des motifs galactose, comme la gomme de caroube, ont la particularité d'augmenter la cohésion des gels de carraghénanes.

Les parties linéaires des galactomannanes, dépourvues de ramifications, peuvent se rapprocher des doubles hélices et former un réseau qui évite la formation ultérieure d'agrégats. Le gel qui en résulte est moins cassant et plus élastique ([Gilbert et Verhaeghe, 2002](#)).

La survie des souches probiotiques encapsulées dépend de la nature de polymère utilisé dans la microencapsulation. Une étude de [Rodrigues et al. \(2011\)](#) a montré que





**Figure 13 :** Effet de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés au carraghénane sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (A) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (B) aux conditions gastriques simulées in vitro (3g/L pepsine et pH 2)..

l'encapsulation au gel de carraghénane était plus efficace dans la préservation de la survie de souches du genre *Bifidobacterium* que de celles du genre *Lactobacillus*.

[Carlise et al. \(2013\)](#) ont également rapporté l'efficacité de l'encapsulation des bifidobactéries dans un gel à base de carraghénane dans la préservation de la survie in vitro de ces bactéries vis-à-vis d'un environnement acide simulant celui de l'estomac.

Dans une autre étude et un autre contexte, [Adhikhari et al. \(2000\)](#) ont comparé la cinétique de viabilité de bifidobactéries non encapsulées (libres) et encapsulées au carraghénane dans le yaourt au cours de son entreposage frigorifique pendant 30 jours. Ils ont constaté que l'encapsulation protégeait les cellules bifides au sein du yaourt conservé au froid.

#### **III.1.4. Effets de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés au xanthane sur la survie des deux souches lactiques LBRE-LSAS et Bb12 aux conditions gastriques.**

Les galactomannanes de caroube combinés au xanthane donnent un gel plus rigide que les autres combinaisons de polymères réalisées dans cette étude.

L'évaluation de l'efficacité de ce gel à préserver la survie de la souche *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS vis-à-vis des conditions gastriques, simulées in vitro par un pH égal à 2 et 3g/L de pepsine, a montré qu'au bout de 30 min d'exposition à de telles conditions, la biomasse lactobacille initiale diminue de 18.37% (soit de 1.8 log UFC/mL) lorsqu'elle n'est pas encapsulée (libre) et de seulement 4% (soit de 0.4 log UFC/mL) lorsqu'elle est encapsulée (fig.14A).

Si l'exposition à ces conditions acides hostiles est portée à 60 min et en considérant l'intervalle 30-60 min, on constate que la perte de cellules LBRE-LSAS s'accroît quelque soit l'état dans lequel elles se trouvent : 25% ( soit 2 log UFC/mL) et seulement 7.29% (soit 0.7 log UFC/mL) de pertes de viabilité, respectivement à l'état non encapsulé (libre) et encapsulé au gel mixte de galactomannanes de caroube et de xanthane (fig.14A).

Nous remarquerons que dans l'intervalle de séjour 0-60 min, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS perd en moyenne 38.77% (soit 3.8 log UFC/mL) et seulement 11% (soit 1.1 log UFC/mL) quand elle est libre (non encapsulée) et encapsulée dans ce gel mixte. Il y a, ainsi, 3.45 fois moins de cellules perdues grâce à l'encapsulation au cours de la première heure de leur exposition aux conditions gastriques.

La prolongation de l'exposition de la souche *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS à cet environnement acide à 120 min montre qu'au cours de cette deuxième heure, la survie est perdue (par rapport à la biomasse enregistrée après 60 min d'exposition) à hauteur de 12.67% (soit 0.76 log UFC/mL) et de 10.11% (soit 0.9 log UFC/mL), respectivement, pour les cellules non encapsulées (libres) et encapsulées.

Si l'on considère les pertes en survie enregistrées sur la totalité de l'exposition des cellules au compartiment gastrique, c'est-à-dire 120 min, on remarquera que la souche *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS est perdue en moyenne à un taux de 46.53% (soit 4.56 log UFC/mL) quand elle n'est pas encapsulée et à peine de 20% (soit 2 log UFC/mL) quand elle est encapsulée dans le gel associant les galactomannanes de caroube au xanthane (fig.14A).

La survie de cette souche est ainsi plus de deux fois plus préservée des hostilités gastriques par encapsulation dans ce type de gel. C'est un niveau d'efficacité comparable à celui obtenu avec le gel associant les galactomannanes de caroube à l'alginate de sodium.

L'étude de la survie de la deuxième souche probiotique, *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12, aux conditions gastriques simulées in vitro montre, là aussi, qu'elle est moins touchée que *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS quand elle est encapsulée ou non dans le gel de galactomannanes de caroube associés au xanthane.

Cependant, l'association de ces deux biomatériaux préserve la survie de cette souche à l'acidité (fig.14B).

Les cellules bifides dans le témoin (cellules non encapsulées) sont presque 10 fois plus perdues que celles dans l'échantillon (cellules encapsulées) après les trente premières minutes de séjour dans l'environnement gastrique simulé in vitro. En effet, il y a 9.84% (soit 0.95 log UFC/mL) de viabilité de cellules non encapsulées perdue versus 1% (soit 0.1 log UFC/mL) pour celles encapsulées.

La poursuite de ce séjour des cellules dans ce milieu hostile à 60 min accentue davantage cette tendance à la baisse de la viabilité qui, dans l'intervalle 30-60 min, représente, respectivement, 13.79% (soit 1.2 log UFC/mL) et 7.07% (soit 0.7 log UFC/mL) pour le témoin (cellules non encapsulées) et l'échantillon (cellules encapsulées).

Il apparaît, ainsi, qu'au cours de la première heure de séjour (0-60 min), la viabilité de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 est perdue à hauteur de 22.28% (soit 2.15 log UFC/mL) à l'état non encapsulé (libre) et de seulement 8% (soit 0.8 log UFC/mL)

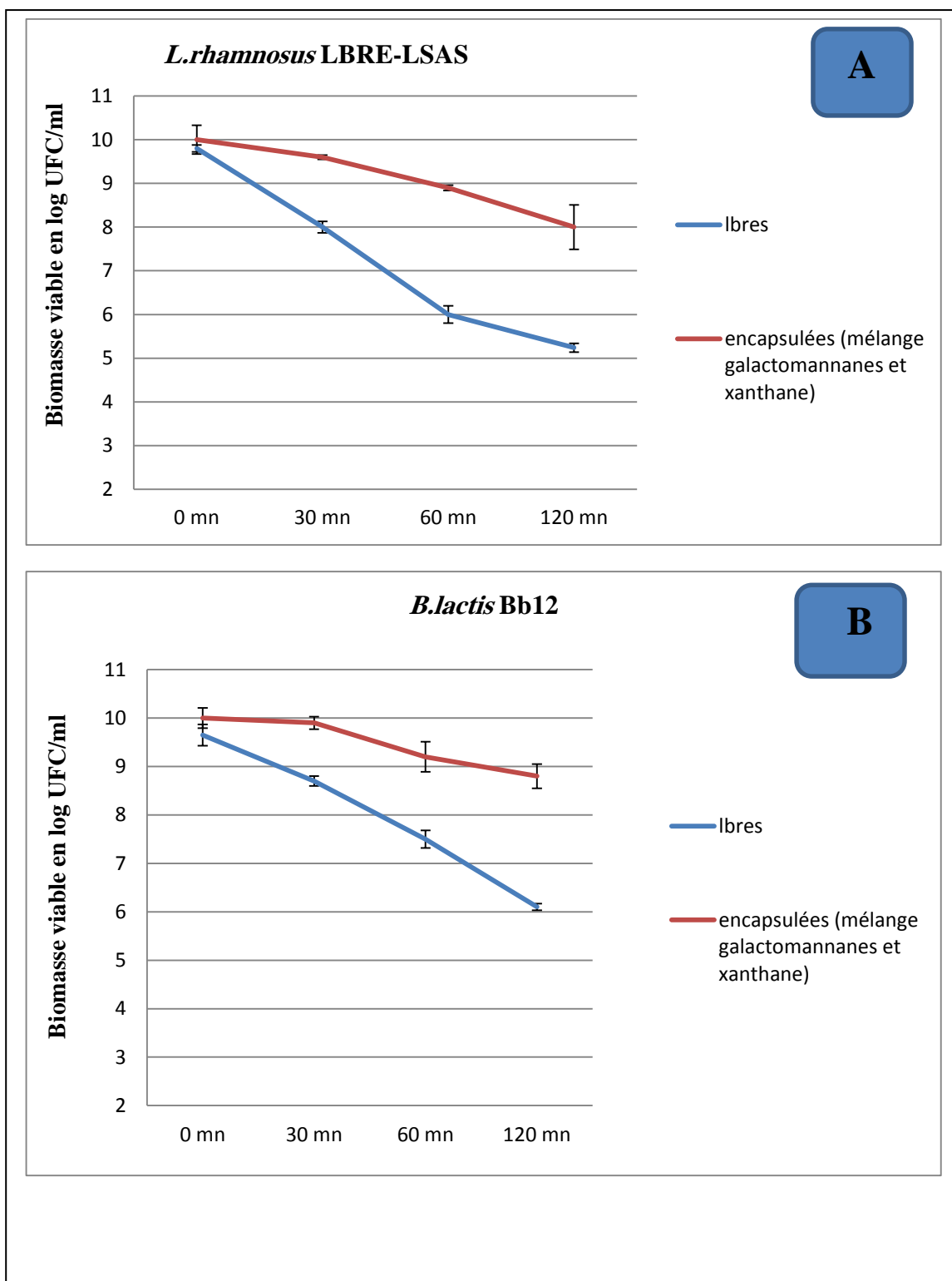
quand elle est encapsulée dans le gel mixte de galactomannanes de caroube et de xanthane (fig.14B).

De la 60<sup>ème</sup> à la 120<sup>ème</sup> minute d'exposition de cette souche bifide aux conditions gastriques simulées, les pertes de sa viabilité diminuent d'intensité par rapport à celles de l'intervalle 0-60 min: 18.67% (soit 1.4 log UFC/mL) pour les cellules non encapsulées (libres) et 4.34% (soit 0.4 log UFC/mL) pour les cellules encapsulées.

L'efficacité de l'encapsulation au gel mixte de galactomannanes et de xanthane dans la préservation de la viabilité de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 dans l'environnement gastrique s'apprécie par les pertes en cellules enregistrées dans l'intervalle 0-120 min d'exposition qui se chiffrent à 36.79% (soit 3.55 log UFC/mL) pour les cellules non encapsulées et à seulement 12% (soit 1.2 log UFC/mL) pour celles encapsulées. L'analyse de variance des résultats dans les deux cas libres et encapsulées présentent une différence significative ( $P<0.05$ ).

Ces résultats indiquent cette souche bifide perd 3.8 fois moins de sa viabilité face aux conditions gastriques si elle est encapsulée dans le gel associant les galactomannanes de caroube au xanthane ; alors que *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS en perdait seulement 2.32 moins dans les mêmes circonstances.

Si on récapitule et on compare l'efficacité des différents gel d'encapsulation testés à préserver la viabilité des deux souches exposées aux conditions gastrique simulées, on doit dire que l'association des galactomannanes au xanthane représente la meilleure formulation de capsules, suivie de celle des galactomannanes associés à l'alginate de sodium.



**Figure 14** : Effet de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés au xanthane sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (**A**) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (**B**) aux conditions gastriques simulées in vitro (3g/L pepsine et pH 2).

Les résultats de cette expérience relatifs à l'efficacité du xanthane comme biomatériau d'encapsulation sont similaires à ceux rapportés par **Ding et Shah (2009b)** qui, à l'issue d'une comparaison de plusieurs biomatériaux d'encapsulation, avaient relevé cette même efficacité du xanthane dans la préservation de la viabilité de plusieurs souches testées.

Par ailleurs, selon **Papagianni et Anastasiadou (2009)**, le polymère de xanthane en émulsion avec l'huile d'olive améliore la viabilité (qui était maintenu à hauteur de 89%) de souches encapsulées exposées pendant 120 min à des conditions gastriques simulées in vitro.

Dans une étude plus récente, **Jiménez-Pranteda et al.(2012)** ont trouvé que le xanthane combiné avec la gomme de gellane améliorait la survie de la souche *Lactobacillus rhamonosus* dans les conditions gastriques simulées (pH =2 ) et dont la biomasse était préservée à un niveau de 8 log UFC/mL.

Nos résultats sont également de cet ordre de grandeur lorsqu'on a utilisé le gel de galactomannanes (LBG) combiné avec le xanthane .

Comme autre résultat comparatif, il y a celui rapporté par **Sun et Griffiths (2000)** au sujet de l'encapsulation de *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 par le xanthane combiné avec le gellane et de son exposition à des conditions gastriques simulées pendant 120 minutes. Ces auteurs avaient enregistré une perte de viabilité de cette souche de l'ordre de 2,7 log UFC/mL.

### **III.2. Effets de l'encapsulation avec divers biomatériaux sur la survie in vitro de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 aux conditions intestinales simulées.**

Après avoir été exposées pendant 2h aux conditions gastriques simulées (pepsine 3g/L et pH 2), les deux mêmes souches encapsulées ou non dans les mêmes biomatériaux ont été soumises à des conditions intestinales simulées in vitro (0.3% de bile et pH 6.5) pendant 16h.-

#### **III.2.1. Effets de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube seuls sur la survie des deux souches lactiques *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 aux conditions intestinales.**

Le séjour de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS pendant 16h dans les conditions intestinales après celui des 2h dans les conditions gastriques (c'est-à-dire en considérant les pertes ayant eu lieu seulement pendant les 16h dans le compartiment intestin simulé) provoque une perte de sa viabilité de l'ordre de 44.76% (soit 1.88 log UFC/mL) pour le témoin (cellules non encapsulées) et de seulement 10.88% (soit 0.53 log UFC/mL) pour les cellules encapsulées au galactomannanes de graines de caroube seuls (fig.15A).

Si on considère la totalité du séjour de cette souche dans l'ensemble des conditions simulées du tube digestif (c'est-à-dire 2h dans les conditions gastriques + 16h dans les conditions intestinales), on constate que les pertes enregistrées s'élèvent à 74.10% (soit 6.78 log UFC/mL) lorsque les cellules ne sont pas encapsulées (libres) et à 58.69% (soit 5.40 log UFC/mL) quand elles sont encapsulées aux galactomannanes de graines de caroube seuls (fig.15A).

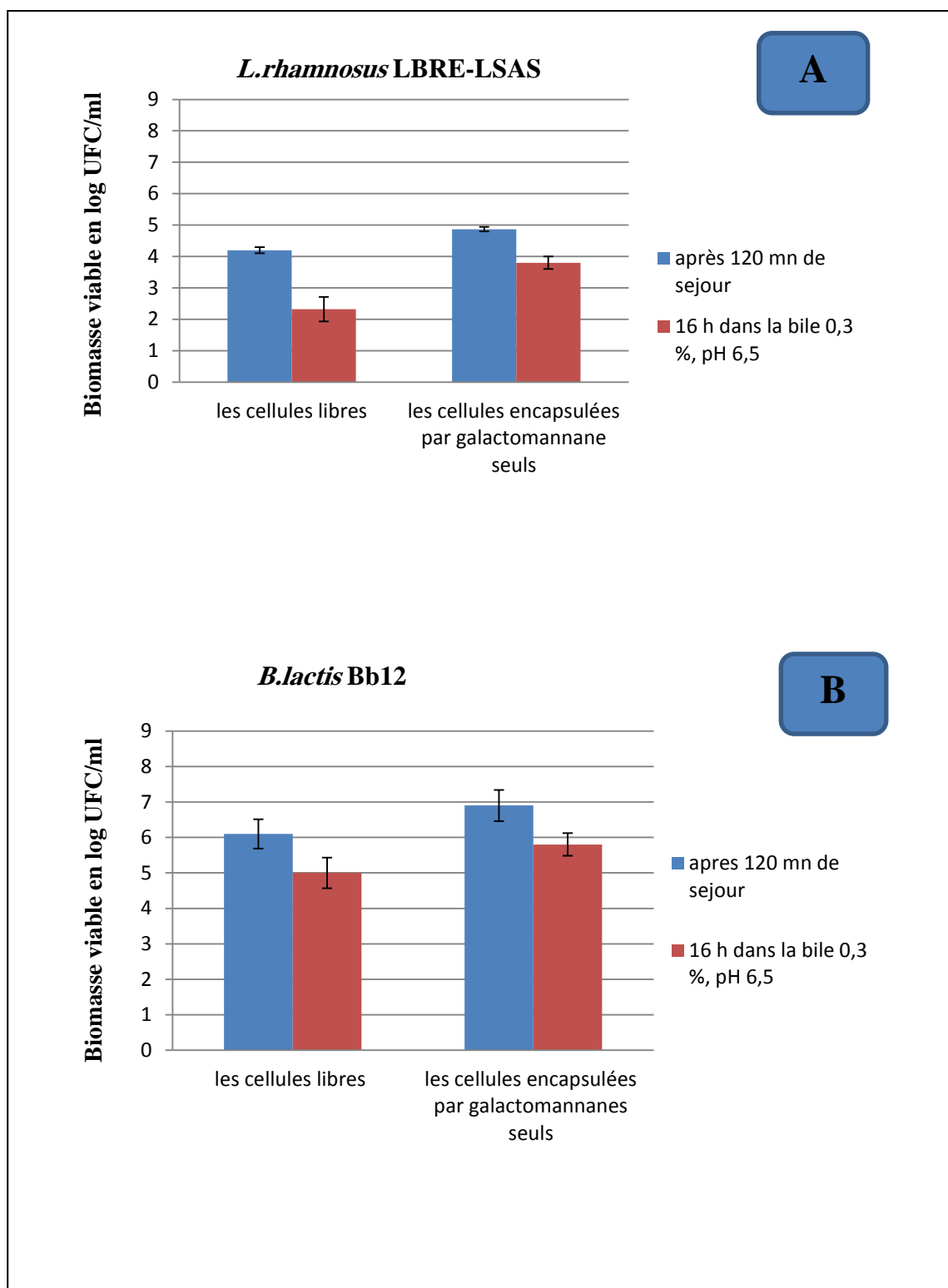


Ce biomatériau d'encapsulation améliore la viabilité de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS d'environ 15% seulement. La biomasse restante après exposition aux conditions hostiles de l'environnement du tube digestif (2.32 log UFC/mL) est bien en dessous du requis législatif (au minimum 6 log UFC/mL doivent survivre au transit gastro-intestinal) en matière de probiotiques.

Le comportement de la deuxième souche, *Bifidobacterium animalis subsp lactis* ou **Bb12**, dans l'environnement intestinal est différent de celui de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS, car elle survit beaucoup mieux, sans, toutefois, d'effet protecteur significatif des capsules de galactomannanes de graines de caroube (fig.15B).

Effectivement, le séjour de 16h (sans prendre en compte celui de 2h dans le milieu gastrique simulé, c'est-à-dire en partant de la biomasse mesurée après ces 2h) dans les conditions intestinales (0.3% de bile et pH 6.5) de la souche bifide Bb12, induit une perte de sa viabilité de l'ordre de 18.03% (soit 1.10 log UFC/mL par rapport à une biomasse en fin de séjour dans l'estomac de 6.1 log UFC/mL) quand elle n'est pas encapsulée (libre) et de 15.94% (soit 1.10 log UFC/mL par rapport à une biomasse en fin de séjour dans l'estomac de 6.9 log UFC/mL) lorsqu'elle est encapsulée aux galactomannanes de graines de caroube seuls (fig.15B).

Si l'on considère les pertes totales de viabilité de cette souche bifide Bb12 dans la totalité des conditions digestives simulées (c'est-à-dire les pertes subies dans les deux compartiments, gastrique et intestinal), on constate qu'elles s'élèvent à 47.36% (soit



**Figure 15** : Effet de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube **seuls** sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (A) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (B) exposées pendant 16h aux conditions intestinales simulées (0.3% bile : P/V, pH 6.5).

4.50 log UFC/mL) chez le témoin (cellules libres non encapsulées) et à 40.21% (soit 3.9 log UFC/mL) pour les cellules encapsulées. Là aussi, la différence entre les deux cas n'est pas très importante, attestant par ce fait de l'inefficacité des galactomannanes de graines de caroube **seuls** à préserver la viabilité de cette souche vis-à-vis des hostilités du tube digestif.

### **III.2.2. Effets de l'encapsulation aux galactomannanes de graine de caroube combinés à l'alginate de sodium sur la survie des deux souches lactiques *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 aux conditions intestinales.**

L'utilisation des galactomannanes de graines de caroube mélangés à l'alginate de sodium dans l'encapsulation de la souche *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS exposée aux conditions intestinales a permis de réduire les pertes en biomasse par rapport au témoin (fig.16A).

En effet, à l'état non encapsulé (libre) et en se référant à la biomasse enregistrée à la fin du séjour gastrique, cette souche perd sa viabilité à hauteur de 44.76% (soit 1.88 log UFC/mL) ; alors qu'à l'état encapsulé cette perte n'est que de 18.92% (soit 1.4 log UFC/mL). Ainsi, ces résultats démontrent clairement l'effet de l'encapsulation au mélange galactomannanes de graines de caroube et d'alginate de sodium sur la viabilité de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS dans le compartiment intestin simulé.

La prise en considération de la totalité du séjour de cette souche dans les conditions digestives simulées in vitro (2h dans les conditions gastriques et 16h dans celles de l'intestin) indique que les pertes de sa viabilité à l'état non encapsulé qui étaient de l'ordre

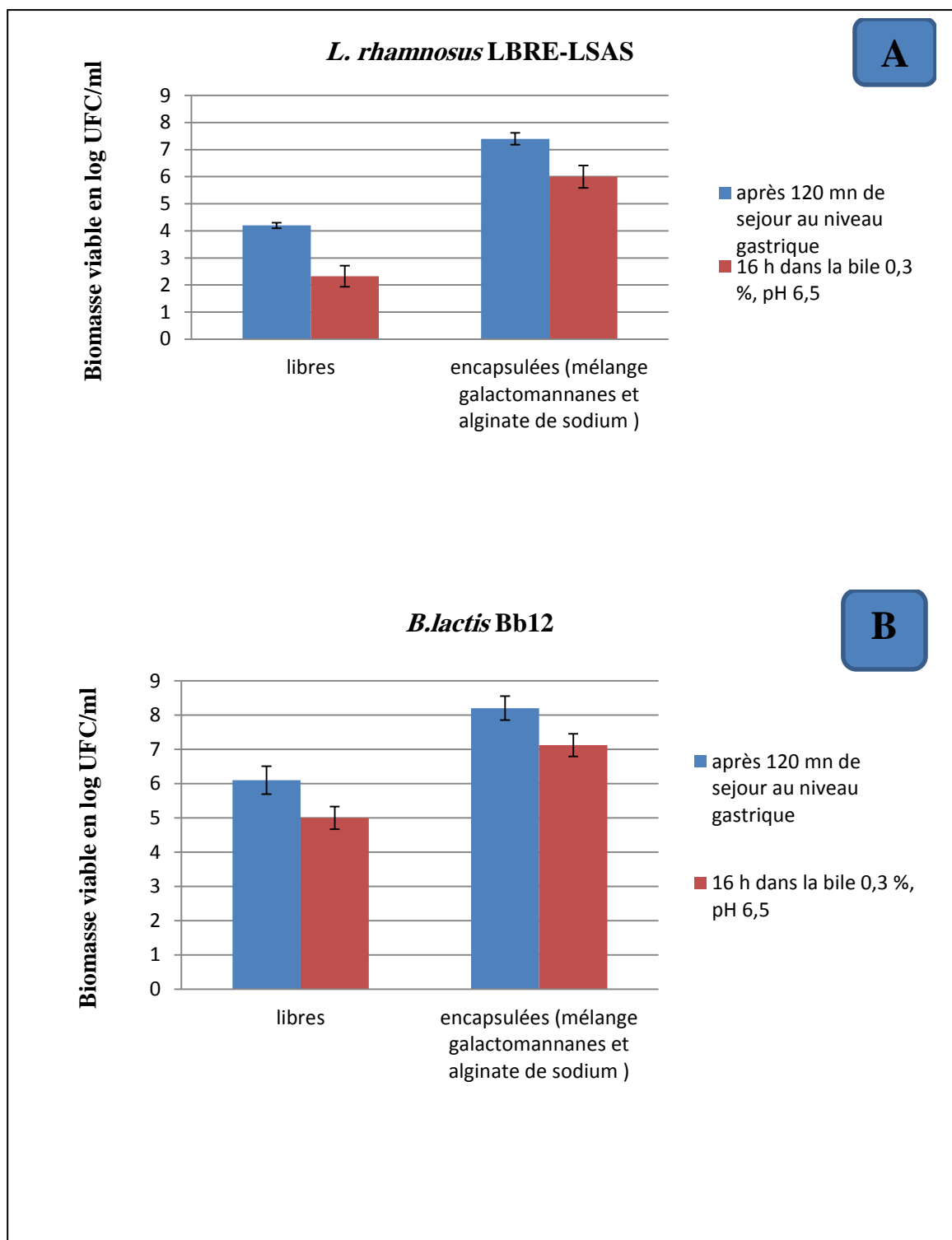
de 74.50% (soit 6.78 log UFC/mL) ont été réduites à seulement 38.77% ( soit 3.8 log UFC/mL) sous l'effet de l'encapsulation par ce gel mixte (fig.16A).

Ces observations laissent comprendre que cette combinaison entre galactomannanes de graines de caroube et alginate de sodium donnent un gel d'encapsulation efficace dans la réduction de moitié des pertes de viabilité de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS dues aux conditions hostiles du tube digestif.

S'agissant de la souche probiotique, *Bifidobacterium animalis subsp lactis Bb12*, elle apparaît toujours comme plus résistante aux conditions intestinales que *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS.

Le niveau des pertes de biomasse bifide (calculé sur la base d'une biomasse initiale représentée par celle mesurée après 2h de séjour gastrique) enregistré après 16h de séjour en présence de 0.3% de bile à pH 6.50 à l'état non encapsulé (18.03%, soit 1.1 log UFC/mL) a été réduit à 13.17% par l'encapsulation avec ce gel associant les galactomannanes de graines de caroube à l'alginate de sodium (fig.16B).

Pour avoir une idée sur les pertes de *Bifidobacterium animalis subsp lactis Bb12* sur l'ensemble de son séjour dans les conditions digestives simulées in vitro (c'est-à-dire 2h dans l'environnement gastrique ajoutées aux 16h dans celui de l'intestin), nous les avons chiffré à 47.37 et 28.08%, respectivement pour les cellules libres (non encapsulées) et encapsulées (fig.16B).



**Figure 16** : Effet de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés à l'alginate de sodium sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (**A**) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (**B**) exposées pendant 16h aux conditions intestinales simulées in vitro (0.3% de bile et pH 6.50).

L'efficacité d'un gel mixte associant l'alginate de sodium au chitosane dans la microencapsulation dans la protection de souches probiotiques vis-à-vis des sels biliaires a été rapportée par **Chávarri et al. (2010)** et **Sohail et al. (2011)**.

Une étude de **Sultana et al. (2000)** a montré que l'encapsulation de trois souches *L. acidophilus* 2409 , *Bifidobacterium infantis* 1912 et *L. casei* 2603 dans un gel mixte d'alginate de sodium et d'amidon n'améliore pas leur survie dans des conditions intestinales simulées par la présence de concentrations de bile (1 et 2 %) beaucoup plus élevées que celles que nous avons utilisé dans ce travail (0.3%).

Selon **Kailasapathy (2003)**, des souches de *Lactobacillus acidophilus* DD910 et *Bifidobacterium lactis* DD920 encapsulées par l'alginate de calcium survivent bien (plus de 5 log UFC /mL) à l'acidité après 7 semaines de stockage .

Dans une autre étude, **Mirzaei et al. (2012)** constatent que La survie *Lactobacillus acidophilus* (La5) dans le fromage blanc iranien en saumure pendant 182 jours de stockage à 5° C est améliorée par son encapsulation dans un gel d'alginate combiné avec l'amidon résistant.

L'encapsulation par l'alginate et l'amidon par la technique d'extrusion s'est révélée fiable pour améliorer la survie de quatre souches *Bifidobacterium longum* ; *B.lactis* ,*Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus helveticus* testées dans une étude menée par **Jayalalitha et al. (2012)** dans des conditions intestinales simulées.

**Se-Jin Kim et al. (2008)** ont observé que le taux de survie de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 encapsulée dans un gel d'alginate de sodium dans des conditions intestinales simulées était directement lié aux concentrations de bile présente.

Le polymère d'alginate est couramment utilisé dans la microencapsulation des bactéries lactiques pour plusieurs raisons, dont, son pouvoir gélifiant élevé, sa non toxicité et ses excellentes propriétés de biocompatibilité à faible coût **Rathore et al. (2013)**.

La technique de la micro-encapsulation par l'alginate donne des microcapsules sphériques qui, pour être adaptées à une administration orale, doivent démontrer une bonne résistance mécanique ; et les résultats montrent que l'intégrité des microcapsules d'alginate se maintient, même après agitation mécanique prolongée.

Selon **Sandoval-Castilla et al. (2010)**, la microencapsulation de cellules par l'alginate de calcium et la pectine donne une meilleure protection contre les sels biliaires. L'ajout de pectine renforce cette protection.

Le manque d'alginate va réduire, dans une certaine mesure, l'effet protecteur, ce qui fait suggérer à ces auteurs que l'alginate et la pectine à la fois compensent un piégeage de la matrice qui devient plus structurée et, par conséquent, plus résistante aux effets des acides et des sels biliaires.

### **III.2.3. Effets de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube**

**combinés au carraghénane sur la survie des deux souches lactiques**

***Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp**

***lactis* Bb12 aux conditions intestinales.**

L'effet de l'encapsulation de la souche *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS dans le gel de galactomannanes de graines de caroube combinés au carraghénane sur sa survie aux conditions intestinales (0.3% de bile et pH 6.5) pendant 16h se traduit par une notable amélioration.

Les pertes en viabilité (calculées par rapport à la biomasse mesurée après 2h d'exposition des cellules à l'environnement gastrique) enregistrées chez le témoin (cellules non encapsulées), qui étaient de l'ordre de 28.46% (soit 1.46 log UFC/mL), ont été réduites à 14.20% (soit 1 log UFC/mL) sous l'effet de l'encapsulation (fig.17A).

Cet effet d'amélioration de la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS par son encapsulation dans le gel de galactomannanes de graines de caroube combinés au carraghénane est plus mis en relief ou plus apparent lorsque l'on considère les pertes cellulaires totales enregistrées au bout d'un séjour de 2h et 16h respectivement dans les conditions gastriques et intestinales. On passe de 59.22% (soit 5.33 log UFC/MI) de pertes de viabilité chez le témoin (cellules libres non encapsulées) à 38.14% (soit 3.70 log UFC/mL) chez l'échantillon (cellules encapsulées) (fig.17A).



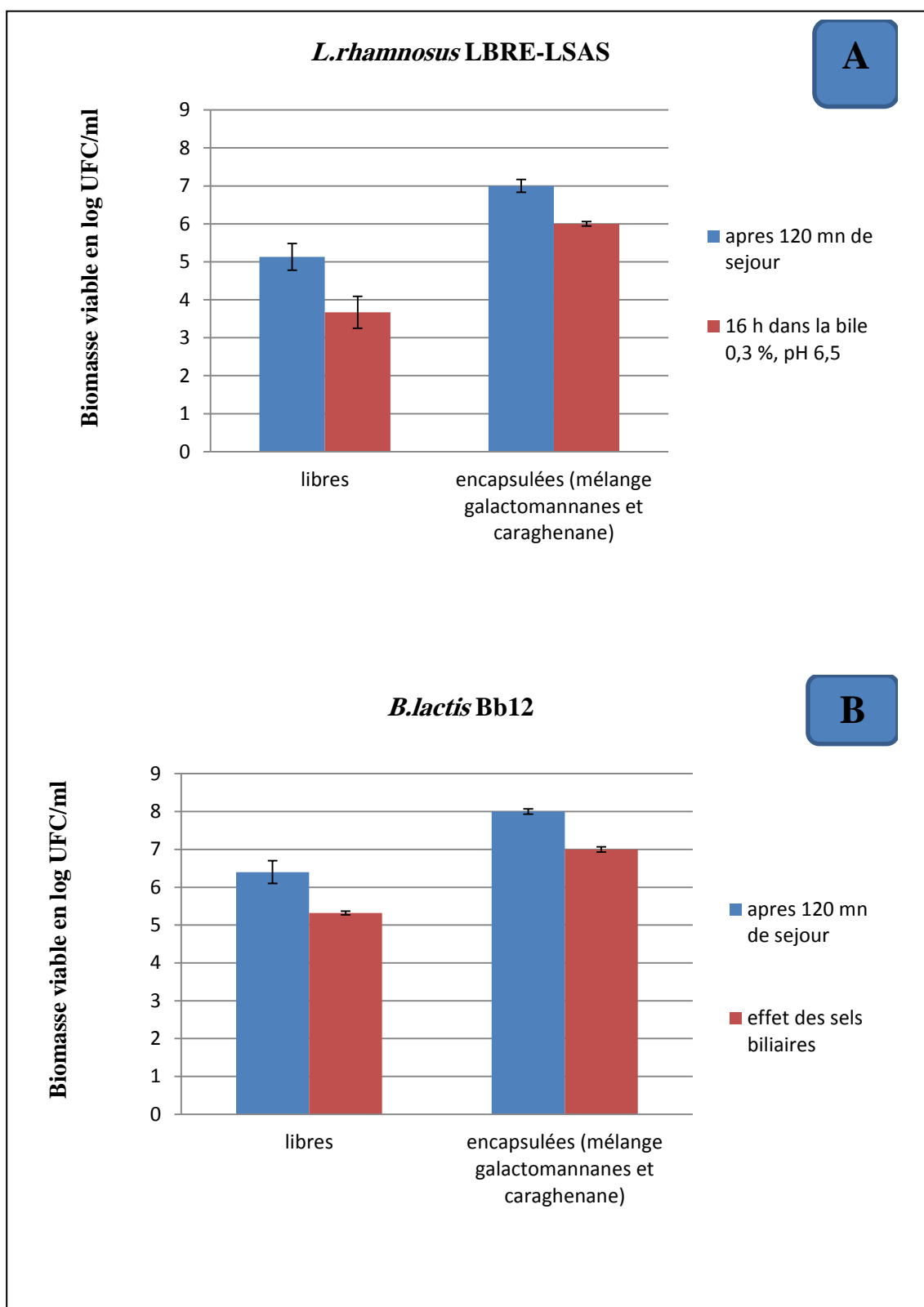
L'encapsulation de ce lactobacille aux galactomannanes de graine de caroube mélangés au carraghénane améliore sa viabilité dans les conditions digestives simulées in vitro d'un facteur de 1.55.

Les résultats des tests de viabilité de la souche probiotique *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* **Bb12** dans les conditions intestinales simulées sont illustrés par la figure 17B.

Le séjour de cette souche pendant 16h dans un milieu à 0.3% de bile et de pH 6.5 induit une perte de viabilité (calculée sur la base de la biomasse mesurée après 2h dans les conditions gastriques) de l'ordre de 16.87% (soit 1.08 log UFC/mL) lorsqu'elle n'est pas encapsulée et de 12.50% (soit 1 log UFC/mL) une fois encapsulée aux galactomannanes de graines de caroube mélangés au carraghénane.

Si l'on considère le comportement de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 pendant toute la durée de son exposition aux conditions digestives (2h gastriques + 16h intestinales) et se référant à la biomasse initiale engagée dans cette expérience, l'effet protecteur des cellules bifides par ces capsules vis-à-vis de l'hostilité digestive s'exprime par une réduction des pertes de viabilité qui passent de 42.17% (soit 3.88 log UFC/mL) à l'état non encapsulée (libre = témoin) à 18.36% (soit 1.80 log UFC/mL) à l'état encapsulé (échantillon) (fig.17B).

Ainsi, il apparaît clairement que les galactomannanes de graines de caroube combinés au carraghénane améliorent la viabilité de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 dans les conditions digestives par un facteur voisin de 2.3.



**Figure 17** : Effet de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés au carraghénane sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (A) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (B) exposées pendant 16h aux conditions intestinales simulées in vitro (0.3% de bile et pH 6.50).

### **III.2.4. Effets de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés au xanthane sur la survie des deux souches lactiques *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 aux conditions intestinales.**

Le xanthane apparaît également comme un ingrédient d'intérêt quand il s'agit de l'associer aux galactomannanes de graines de caroube pour fabriquer des capsules de protection des cellules vis-à-vis des hostilités digestives.

Au bout de 16h d'exposition aux conditions intestinales simulées in vitro et sur la base de la biomasse enregistrée après 2h dans les conditions gastriques, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS perd 55.73% (soit 2.92 log UFC/mL) à l'état non encapsulé et seulement 12.50% (soit 1 log UFC/mL) sous forme encapsulée dans ce gel mixte (fig.18A).

Dans ces conditions et en considérant le compartiment intestin seulement, la viabilité de ce lactobacille se trouve multipliée par un facteur de 4.85 grâce à l'encapsulation des cellules par la combinaison des galactomannanes de graine de caroube et du xanthane.

Les pertes totales (pendant toute l'exposition aux conditions digestives : 2h en gastrique + 16h en intestinal) de viabilité de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS s'élèvent à un niveau de 76.33% (soit 7.48 log UFC/mL) sans protection (à l'état non encapsulé) et à 30% seulement avec protection (à l'état encapsulé) dans ce gel mixte (fig.18A).

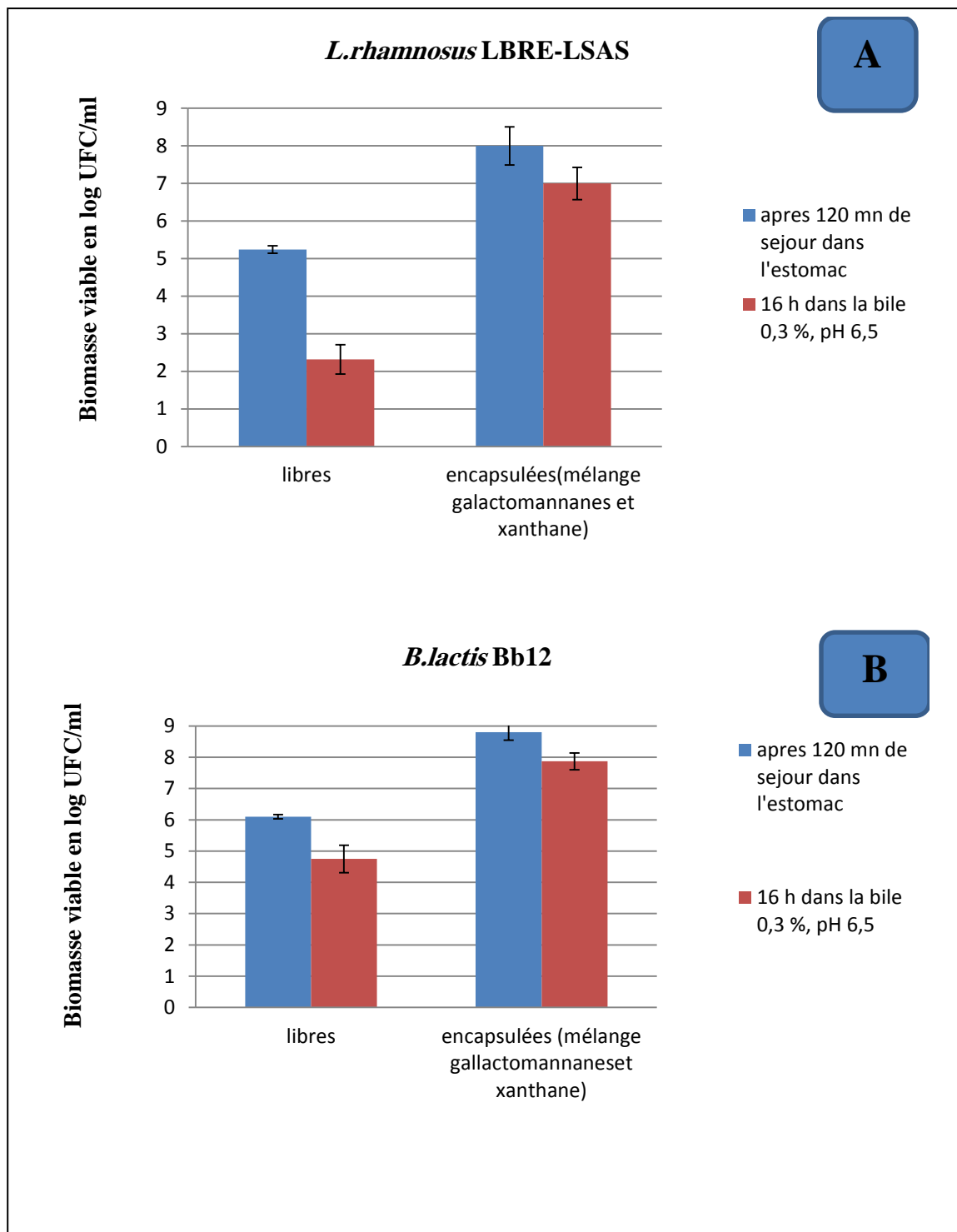
Sur cette totalité du séjour en conditions digestives, la viabilité de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS est améliorée par un facteur de 2.54.

Les résultats concernant la deuxième souche probiotique, *Bifidobacterium animalis subsp lactis Bb12*, indiquent que les pertes de sa viabilité pendant les seules 16h de séjour en conditions intestinales s'élèvent à 22.13% (soit 1.35 log UFC/mL) à l'état non encapsulé (libre = témoin) et à 10.57% (soit 0.93 log UFC/mL) lorsqu'elle est encapsulée dans le gel mixte associant les galactomannanes de graines de caroube au xanthane (fig.18B).

Ainsi, dans le compartiment intestin simulé, la viabilité des cellules bifides est multipliée par un facteur de plus de 2 sous l'effet de leur encapsulation dans ce gel mixte.

Au cours de la totalité de séjour de cette souche dans les conditions digestives simulées in vitro (2h en conditions gastriques + 16h en conditions intestinales), les pertes de sa viabilité atteignent des niveaux de 50.78% (soit 4.90 log UFC/mL) à l'état non encapsulé (libre = témoin) et de 21.30% (soit 2.13 log UFC/MI° à l'état encapsulée dans le gel associant les galactomannanes de graines de caroube au xanthane (fig.18B).

Dans les conditions digestives (gastrique et intestinales) simulées in vitro, la viabilité de la souche *Bifidobacterium animalis subsp lactis Bb12* est multipliée par un facteur égal à 2.38.



**Figure 18** : Effet de l'encapsulation aux galactomannanes de graines de caroube combinés au xanthane sur la survie de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (A) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (B) exposées pendant 16h aux conditions intestinales simulées in vitro (0.3% de bile et pH 6.50).

**Papagianni et Anastasiadou (2012)** ont élaboré des capsules à base de xanthane pour offrir une stabilité et une plus grande viabilité des cellules de *Pediococcus* dans les systèmes alimentaires de haute valeur nutritionnelle. Ces auteurs rapportent que la gomme de xanthane est un matériau naturel sûr, de haute stabilité qui est insipide et n'affecte pas le goût des autres ingrédients alimentaires.

Dans de tels systèmes, assurant des taux de viabilité des cellules encapsulées aussi élevée que 85%, et offrant des niveaux atteignant 92% de la population initialement encapsulée au point cible sont autant de caractéristiques attestant de la réussite de telles applications.



# Conclusion

## Conclusion

La présente étude avait pour objectif l'utilisation des galactomannanes de graines de caroube seuls ou combinés à d'autres biomatériaux comme l'alginate de sodium, le carraghénane ou encore le xanthane dans l'encapsulation de souches lactiques d'intérêt telles que *Lactobacillus rhamnosus* et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis*, en vue d'en assurer la protection vis-à-vis des hostilités digestives simulées in vitro.

Les conditions digestives ont été simulées par un milieu à 3g/L de pepsine et de pH égal à 2 avec une durée de séjour des cellules de 2h ; alors que les conditions intestinales l'ont été par un milieu à 0.3% de bile et à pH 6.5 avec une durée de séjour de 16h.

D'une manière globale, les résultats obtenus ont clairement montré l'effet positif de l'encapsulation, tous biomatériaux confondus, sur la préservation de la survie des deux microorganismes testés. La souche *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 s'est révélée plus résistante aux hostilités digestives simulées in vitro que la souche *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS.

Sur le plan de l'efficacité, le gel mixte associant les galactomannanes de graines de caroube et le xanthane représente la meilleure combinaison protectrice des cellules, suivi par celui des galactomannanes associés à l'alginate de sodium, puis des galactomannanes associés au carraghénane et en dernier celui fabriqué par les galactomannanes de graine de caroube seuls.

Les plus grosses pertes de viabilité des souches ont été enregistrées à l'issue du séjour des cellules dans l'environnement gastrique. L'estomac constitue ainsi la barrière la plus importante ou le facteur limitant le plus important de la survie des souches d'intérêt digestif susceptibles d'être apportés en supplément à l'hôte.

La viabilité de la souche *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS dans l'ensemble des conditions digestives simulées dans cette expérience est multipliée par des facteurs de 1.28, 1.92, 1.55 et 2.54 sous l'effet de son encapsulation dans des gels de galactomannanes de graines de caroube seuls ou combinés à l'alginate de sodium au carraghénane et au xanthane, respectivement.



La viabilité de la souche *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12, dans l'ensemble des conditions digestives simulées dans ce travail se trouve multipliée par des facteurs de 1.18, 1.68, 2.29 et 2.38 sous l'effet de son encapsulation dans des gels de galactomannanes de graines de caroube seuls ou combinés à l'alginate de sodium au carraghénane et au xanthane, respectivement.

Ces résultats démontrent clairement que l'utilisation des galactomannanes de graines de caroube seuls ne peut être envisagée pour protéger efficacement les souches *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 contre les hostilités digestives.

En perspective, il serait très intéressant d'exécuter un protocole similaire à celui-ci dans des conditions réelles, c'est-à-dire in vivo afin de pouvoir tirer des conclusions qui se rapprochent un peu plus de la vérité.





# **Références bibliographiques**

## **Références bibliographiques**

- **Adamson, A. W. (1982).** Physical chemistry of surfaces. New York: Wiley Inc.
- **Adhikari K, Mustapha A, Grun I U, Fernando A. (2000).** Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. J Dairy Sci, 83: 1946–1951
- **Aleksandra M U, Wei O, Jasmine B , Christopher M, and Satya P.(2006).** Investigation of the viability of microencapsulated live *Lactobacillus acidophilus* cells for their use in probiotic yogurts , International Journal of prebiotics and probiotic, Vol. 1, 1o. 3/4, p.225-232
- **Anal, A.K., Singh, H.( 2007).** Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends Food Science and Technology 18 (5), 240–251.
- **Andrade C.T., Azero E.G., Luciano L. & Gonçalves M.P.(1999).** Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum. *Int. J. Biol. Macromol.*, **267**, 181-185.
- **Arnaud, J. P., Lacroix, C., & Choplin, L. (1992).** Effect of agitation rate on cell release rate and metabolism during continuous fermentation with entrapped growing. *Biotechnology Techniques*, 6(3), 265–270.
- **Audet, P., Lacroix, C., & Paquin, C. (1992).** Continuous fermentation of a supplemented whey permeate medium with immobilized *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. *International Dairy Journal*, 2(1), 1– 15.
- **Audet P, Paquin C, Lacroix C. (1991).** Effect of medium and temperature of storage on viability of lactic acid bacteria immobilized in  $\kappa$ -carrageenan-locust bean gum gel beads. *Biotechnol Tech*, 5(4): 307–312
- **Azero E.G. & Andrade C.T.(2002).** Testing procedures for galactomannan purification. *Polymer Testing*, **21**(5), 551-556.
- **Barracosa . P, J. Osorio, A. Cravador .(2007).** Evaluation of fruit and seed diversity and characterization of carob (*Ceratonia siliqua* L.) cultivars in Algarve region. *Scientia Horticulturae* 114 , 250–257.
- **Barbaros O`zer , Hu`seyin Avni Kirmaci , Ebru S, enel , Metin Atamer , Adnan Hayaloglu .(2009).** Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum*

- BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation . *International Dairy Journal* 19 , 22–29.
- **Battle I. (1997).** Current situation and possibilities of development of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) in the Mediterranean region. Unpublished FAO Report. Rome. Italy.
  - **Biner B, Gubbuk H., Karhan M., Aksu M. et Pekmezci M., (2007),** Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey, *Food Chemistry* N°100, pp.1453-1455.
  - **Bresolin T., Milas M., Rinaudo M. & Ganter M.( 1998).** Xanthan-galactomannan interactions as related to xanthan conformations. *Int. J. Biol. Macromol.*, **23**, 263-275.
  - **Carlis B.Fritzen-Freire.,Elane S.Prudencio.,Stephanie S .Pinto.,Isabella B .Munoz, Renata D.M.C. Amboni .(2013).** Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *J. LWT -Food Science and Technologie*.50 , 39-44.
  - **Chandramouli V, Kalasapathy K, Peiris P, Jones M (2004).** An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. In simulated gastric conditions. *J Microbiol Meth.* 56: 27-35.
  - **Chen, M.J., Chen, K.N.(2007).** Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: Lakkis, Jamileh M. (Ed.), *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. Wiley-Blackwell, USA, pp. 83–107.
  - **Child T.F. & Pryce N.G.(2004).** Steady-state and pulsed NMR studies of gelation in aqueous agarose. *Biopolymers*, **11**(2), 409-429.
  - **Chourasia M.K., S.K. Jain.(2003).** Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 6 , 33–66.
  - **Coupe, S. Davis, I. Wilding.(1991).** Variation in gastrointestinal transit of pharmaceutical dosage forms in healthy subjects, *Pharm. Res.* 8 (1991) 360–364.
  - **Coussot Ph. & Grossiord J.-L.(2002).** Des sauces aux émulsions alimentaires. *In : Comprendre la rhéologie. De la circulation du sang à la prise du béton*. Les Ulis, France : EDP Sciences Éditions, 115-122.
  - **Crittenden, R., Laitila, A., Forsell, P., Matto, J., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P.(2001).** Adhesion of bifidobacteria to granular starch

and its implications in probiotic technologies. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (8), 3469–3475.

- **Daas P. J. H., Schols H.A. & DE Jongh H. H. J.(2000).** On the galactosyl distribution of commercial galactomannans. *Carbohydrate research*, **329**, 609-619.
- **Dakia P. A., Wathelet B. & Paquot M.(2007).** Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua L.*) seed germ. *Food Chemistry*, **102**, 1368-1374.
- **Dakia P. A. et al.(2008).** Composition and physiochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid and water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocolloids*, **22**, 807-818.
- **De Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M., Sikkema, J. (2010).** Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* 20 (4), 292–302.
- **Dea I.C.M. & Morrison A.(1975).** Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **31**, 241-242.
- **Rodrigues D, Teresa Rocha-Santos,, Sergio S , Ana M G , Maria M Pintado, F Xavier Malcata, José Msousa L , José P Silva, Paulo Costa, Maria H Amaral and Ana C Freitas.(2011).** the viability of five probiotic strains when immobilized on various polymers . *International Journal of Dairy Technology*. Vol 64, No 1.
- **Dinakar, P., Mistry, V.V.(1994).** Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 77 (10), 2854–2864.
- **Ding W K, Shah N P. (2009).** Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *J Food Sci* , 74(2): M100–M107
- **Ding. W.K et N.P. Shah .(2009 a).** An Improved Method of Microencapsulation of Probiotic Bacteria for Their Stability in Acidic and Bile Conditions during Storage. *Journal of Food science* .Vol.74,Nr.2,2009.
- **Doublier J.L.(1975).** Propriétés rhéologiques et caractéristiques macromoléculaires des solutions aqueuses de galactomannanes. PhD thesis : Université Paris VI (France).
- **Dunne C., Omahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., Ohalloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'sullivan G. C., Shanahan F. and Collins J. K.(2001).** In vitro selection criteria for probiotic

bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73 pp: 386-392.

- **Eric J G V .(2002).**Carraghenanes et cancer du colon :Etude experimentale chez des rats a flore humaine mecanisme d'action .Thèse de doctorat en vétérinaire .Ecole Nationale Veterinaire ,Toulouse .
- **Evans . D.F , G. Pye, R. Bramley, A.G. Clark, T.J. Dyson, J.D. Hardcastle, (1988).** Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human-subjects, *Gut*29 1035–1041.
- **Fávaro-Trindade, C.S., Grosso, C.R.F.(2002).** Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. Lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation* 19 (4), 485–494.
- **Fernandes Paulo B.( 1994).**influence of galactomannan on the structure and thermal behaviour of xanthan /galactomannan mixtures. *journal of food engineering* 24 ,269-283.
- **Folch I Guillen R. (1981).**La vegetacio dels Països Catalans. Ed. Ketres, Barcelona.
- **Fordtran. J.S, J.H. Walsh, (1973) .** Gastric-acid secretion rate and buffer content of stomach after eating - results in normal subjects and in patients with duodenal-ulcer,*J. Clin. Invest.* 52, 645–657.
- **Fox J.E.(1992).** Seed gums. *In: Imeson A., ed. Thickening and gelling agents for food.* London: Blackie Academic and Professional.
- **Gaisford S.E., Harding S.E., Mitchell J.R. & Bradley T.D.(1986).** A comparison between the hot and cold watersoluble fractions of two locust bean gum samples. *Carbohydr. Polym.*, 6, 423-442.
- **Gaonkar A.G.( 1991).** Surface and interfacial activities and emulsion characteristics of some foods hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*, 5, 329-337.
- **Garcia-Ochoa F. & Casas J.A.(1992).** Viscosity of locust bean (*Ceratonia siliqua*) gum solutions. *J. Sci. Food Agric.*, 59, 97-100.
- **Garti N.,Madar Z., Aserin A. & Sternheim B.(1997).** Fenugreek galactomannans as food emulsifiers. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 30(3), 305-311.
- **Garti N. (2001).** Food emulsifiers and stabilizers. *In: Eskin N. A.M. & Robinson D.S., eds. Food shelf life stability.* Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 211-263.

- **Gentile, F.T.; Doherty, E.J.; Rein, D.H.; Shoichet, M.S.; Winn, S.R.** (1995). Polymer science for macroencapsulation of cells for central nervous system transplantation. *React. Polym.* 25, 207–227.
- **Gildas K. Gbassi and Thierry Vandamme .(2012)** Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut . *Pharmaceutics* 2012, 4, 149-163; doi:10.3390/pharmaceutics4010149.
- **Gombotz. W.R, S.F. Wee, (1998)** . Protein release from alginate matrices, *Adv. Drug Deliv .Rev.* 31, 267–285.
- **Gonçalves S. & Romano A.(2005)**. Locust bean gum (LBG) as a gelling agent for plant tissue culture media. *Sci. Hortic.*, 106(1), 129-134.
- **Gouin, S.(2004)**. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology* 15 (7–8), 330–347.
- **Goycoola F.M., Morris E.R. & Gidley M.J.(1995)**. Viscosity of galactomannans at alkaline and neutral pH: evidence of “hyperentanglement” in solution. *Carbohydr. Polym.*, 27, 69-71.
- **Groboillot, A. F., Champagne, C. P., Darling, G. D., & Poncelet, D. (1993)**. Membrane formation by interfacial cross-linking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(10), 1157–1163.
- **Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U.(2009a)**. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids* 23 (7), 1670–1677.
- **Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U.(2009b)**. Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal* 19 (2), 77–84.
- **Hellmig S, F. Von Schoning, C. Gadow, S. Katsoulis, J. Hedderich, U.R. Folsch, E. Stuber, (2006)** . Gastric emptying time of fluids and solids in healthy subjects determined by C-13 breath tests: influence of age, sex and body mass index, *J. Gastroenterol.Hepatol.* 21 ,1832–1838.
- **Hernandez M.J. et al.( 2001)**. Viscous synergism in carrageenans ( $\kappa$  and  $\lambda$ ) and locust bean gum mixtures: influence of adding sodium carboxymethylcellulose. *Food Sci. Technol. Int.*, 7(5), 383-391.



- **Huang X., Kakuda Y. & Cui W.(2001).** Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, **15**(4-6) 533-542.
- **Hyndman, C. L., Groboillot, A. F., & Poncelet, D. (1993).** Microencapsulation of *Lactococcus lactis* within cross-linked gelatin membranes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **56**(3), 259–263.
- **Jankowski , T., Zielinska, M., & Wysakowska, A. (1997).** Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. *Biotechnology Techniques*, **11**(1), 31–34.
- **Janssens. J, G. Vantrappen, T.L. Peeters, (1983).** The activity front of the migrating motor complex of the human stomach but not of the small intestine is motilin\_dependent, *Regul. Peptides* **6** 363–369.
- **Jayalalitha , V. Balasundaram, B. et R.Palanidorai.(2012).**in vitro assesement of microencapsulated probiotic beads . *International Journal of Agriculture: Research and Review*. Vol., **2** (1), 1-6.
- **Kailasapathy, K.(2002).** Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in intestinal Microbiology* **3** (2), 39–48.
- **Kailasapathy, K. (2009).** Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture .Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **4** (6).
- **Kapoor V.P., Milas M., Taravel F.R. & Rinaudo M.( 1994).** Rheological properties of seed galactomannan from *Cassia nodosa*. *buch.-hem. Carbohydr. Polym.*, **25**, 79-84.
- **Karababa.E, Y. Coskuner.(2012).** Physical properties of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.): An industrial gum yielding crop. *Journal of Industrial Crops and Products* **42** , 440– 446 .
- **Kashket S.,Zhang J.,Van Houte J.(1988).**Accumulation of fermentable sugars and metabolic acids in food particles that become entrapped on the dentition .*Journal of Dental Research*(impact factor :3.46).**75**(11):1885-91.
- **Kawamura Y .(2008).** *Carob bean gum (Chemical and Technical Assessment for the 69<sup>th</sup> JECFA)*.
- **Kebery, K. M. K., Hussein, S. A., & Badawi, R. M. (1998).** Improving viability of *Bifidobacteria* and their effect on frozen ice milk. *Egyptian Journal of Dairy Science*, **26**(2), 319–337.

- **Khalil AH, Mansour EH .(1998).** Alginate encapsulated Bifidobacteria survival in mayonnaise. *J Food Sci.* 63: 702-705.
- **Khutoryanskiy. V.V.(2011).** Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers, *Macromol. Biosci.* 11 (2011) 748–764.
- **King, A. H. (1995).** Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing on hydrocolloids. In S. J. Risch, & G. A. Reineccius (Eds.), *Encapsulation and controlled release of food ingredients* (pp. 213–220). Washington DC: American Chemical Society.
- **KI-Yong Lee AND Tae-Ryeon Heo .(2000).** Survival of *Bifidobacterium longum* Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution . *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 2.
- **Klein, J., Stock, J., & Vorlop, K. D. (1983).** Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. *European Journal Applied Microbiology Biotechnology*, 18(1), 86–91.
- **Kök M.S., Hill S.E. & Mitchell J.R.( 1999).** Viscosity of galactomannanes during high temperature processing: influence of degradation and solubilisation. *Food Hydrocolloids*, 13(6), 535-542.
- **Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H.(2003).** Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal* 13 (1), 3–13.
- **Lacroix, C., Paquin, C., & Arnaud, J. P. (1990).** Batch fermentation with entrapped growing cells of *Lactobacillus casei*. I. Optimisation of the rheological properties of the entrapment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32(4), 403–408.
- **Larisch, B. C., Poncelet, D., & Champagne, C. P. (1994).** Microencapsulation of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Journal of Microencapsulation*, 11(2), 189–195.
- **Lee KI, Heo TR .(2000).** Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Appl Environ Microbiol.* 66: 869- 973.
- **Livney, Y.D.(2010).** Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 15 (1–2), 73–83.
- **Da Silva L J.A.,Goncalves M.P.(1990).**studies on a purification methode for locust bean gum by precipitation with isopropanol .*Food hydrocolloids* ,4,277-287.

- **Maier H. et al.(1993)**. Guar, locust bean, tara and fenugreek gums. *In: Whistler R.L. & BeMiller J.N., eds. Industrial gums, polysaccharides and their derivatives.* San Diego, CA, USA: Academic Press, 205-215.
- **Mallett I., McCleary B.V. & Matheson N.K.(1987)**. Galactomannan changes in developing *Gleditsia triacanthos* seeds. *Phytochemistry*, **26(7)**, 1889-1894.
- **Mao C.-F. & Chen J.-C.(2006)**. Interchain association of locust bean gum in sucrose solutions: an interpretation based on thixotropic behavior. *Food Hydrocolloids*, **20(5)**, 730-739.
- **Chávarri M , Izaskun M , Raquel A , Francisco C. , Florencio M , María del C V .(2010)**. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology* 142 , 185–189.
- **Luján Jiménez-Pranteda M., Denis P, María Elena Náder-Macías, Antonio Arcos, Margarita A, Mercedes Monteoliva-Sánchez, and Alberto Ramos-Cormenzana.(2012)**. Stability of lactobacilli encapsulated in various microbial polymers . *Journal of Bioscience and Bioengineering* . VOL. 113 No. 2, 179–184.
- **Martinsen, A., Skjak-Braek, C., & Smidsrod, O. (1989)**. Alginate as immobilization material. I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(1), 79–89.
- **McCleary. B. V, I. C. M. Dea AND A. H. Clark .(1983)**. The fine structure of carob and guar galactomannans . *Gums and Stabilisers for the Food Industry - Applications of Hydrocolloids. Pergamon Press 1983 pp. 33-44.*
- **McConnell. E.L, H.M. Fadda, A.W. Basit, (2008)**. Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery, *Int. J. Pharm.* 364 ,213–226.
- **Mercier C. (1985)**. Les Enzymes amylolytiques P.110-140. *In mouranche A.Coste C. Hydrolases et dépolymérase. Edition Gauthier-Villars.*
- **Michael T. Cook , George T , Dimitris Ch , Vitaliy V. Khutoryanskiy . (2012) .** Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery . *Journal of Controlled Release* 162 (2012) 56–67.
- **Mirzaei.H , H. Pourjafar ,A. Homayouni.(2012)**. Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese .*Journal of Food Chemistry* 132 (2012) 1966–1970.

- **Mortazavian AM, Ehsani MR, Mousavi SM, Reinheimer JA, Emamdjomeh Z, Sohrabvandi S, Rezaei K (2006a).** Preliminary investigation of the combined effect of heat treatment incubation temperature on the viability of the probiotic microorganisms in freshly made yoghurt. *Int J Dairy Technol.* 59: 8-11.
- **Mortazavian AM, Sohrabvandi S, Mousavi SM, Reinheimer, JA (2006b).** Combined effects of heating variables on the viability of Probiotic microorganisms in yogurt. *Aust J Dairy Technol.* 61: 248-252.
- **Mortazavian, AM, Sohrabvandi S (2006c).** *Probiotics and food Probiotic products.* Eta Publication, Iran, (In Farsi).
- **Mortazavian A, Seyed Hadi Razavi, Mohammad Reza Ehsani, Sohrabvandi S.(2007).** Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms . Review Article , Iranian journal of Biotechnologie , vol.5 ,N .1,2007.
- **Mortazavian, A.M., Azizi, A., Ehsani, M.R., Razavi, S.H., Mousavi, S.M., Sohrabvandi, S., Reinheimer, J.A.(2008).** Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Milchwissenschaft* 63 (4), 427–429.
- **Multon J.L.(1984).** *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires.* Paris : Lavoisier.
- **Papagianni M et Anastasiadou S .(2009).**Encapsulation of *Pediococcus acidilactici* cells in corn and olive oil microcapsules emulsified by peptides and stabilized with xanthan in oil-in-water emulsions:Studies on cell viability under gastro-intestinal simulating conditions . *Enzyme and Microbial Technology* 45 (2009) 514–522.
- **Patmore J. V., Goff H. D. & Fernandes S.(2003).** Cryo-gelation of galactomannans in ice cream model systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 161-169.
- **Picot, A., Lacroix, C.( 2004).** Encapsulation of Bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in stimulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal* 14 (6), 505–515.
- **Pimentel-González .D.J, R.G. Campos-Montiel , C. Lobato-Calleros , R. Pedroza-Islas , E.J. Vernon-Carter .(2009).** Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and

survival in simulated gastrointestinal conditions .journal of Food Research International 42 (2009) 292–297.

- **Pollard. Michael A , Roger Kelly, Peter A. Fischer, Erich J. Windhab, Barbara Eder, Renato Amado.(2007).** Investigation of molecular weight distribution of LBG galactomannan for flours prepared from individual seeds, mixtures, and commercial samples. *Food Hydrocolloids* 22 ,1596–1606.
- **Rathore S , Parind Mahendrakumar Desai, Celine Valeria Liew, Lai Wah Chan, Paul Wan Sia Heng .(2013).** Microencapsulation of microbial cells . *Journal of Food Engineering* 116 (2013) 369–381 .
- **Ramirez J.A.( 2002).** Effect of xanthan and locust bean gums on the gelling properties of myofibrillar protein. *Food Hydrocolloids*, **16**, 11-16.
- **Rao AV, Shiwnarin N, Maharij I (1989).** Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Can Inst Food Sci Technol J.* 22: 345-349.
- **Rejeb M. N. (1995),** Le caroubier en Tunisie: Situations et perspectives d'amélioration, in *Quel avenir pour l'amélioration des plantes?* Edit. AUPELF-UREF.John Libbey Eurotext ,Paris ,pp.79-8.
- **Richardson P.H., Willmer J. & Foster T.J.( 1998).** Dilute properties of guar and locust bean gum in sucrose solutions. *Food Hydrocolloids*, **12**, 339-348.
- **Rinaudo M.( 2001).** Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. *Food Hydrocolloids*, **15**, 433-440.
- **Rowley, J.A., Madlambayan, G., Mooney, D.J.( 1999).** Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 20 (1), 45–53.
- **Sabater de Sabates A. (1979).** Contribution à l'étude des relations entre caractéristiques macromoléculaires et propriétés rhéologiques en solution aqueuse concentrée d'un épaississant alimentaire : la gomme de Caroube.Thèse de doctorat : ENSIA, Massy (France).
- **Sajilata, M.G., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R.(2006).** Resistant starch – a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5 (1), 1–17.
- **Sandoval-Castilla .O, C. Lobato-Calleros b, H.S. García-Galindo c, J. Alvarez-Ramírez d, E.J. Vernon-Carter.(2010).** Textural properties of alginate–pectin

beads and survivability of entrapped Lb. casei in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt . *Food Research International* 43 (2010) 111–117.

- **Sathyan. G., S. Hwang, S.K. Gupta, (2000)** . Effect of dosing time on the total intestinal transit time of non-disintegrating systems, *Int. J. Pharm.* 204 (2000) 47–51.
- **Secouard S., Grisel M. & Malhiac C.(2007)**. Flavour release study as a way to explain xanthan-galactomannan interactions. *Food Hydrocolloids*, **21**(8), 1237-1244.
- **Se-Jin Kima, Seung Yong Chob, Sae Hun Kimc, Ok-Ja Songd, II-Shik Shind, Dong Su Chaa,1,2, Hyun Jin Park.(2008)**. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT* 41 (2008) 493–500.
- **Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N., Shimoni, E.(2010)**. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Research International* 43 (1), 193–202.
- **Shah NP, Rarula RR (2000)**. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Aust J Dairy Technol.* 55: 139-144.
- **Sheu, T. Y., & Marshall, R. T. (1993)**. Microencapsulation of lactobacilli in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 54(3), 557–107561.
- **Sheu, T. Y., Marshall, R. T., & Heymann, H. (1993)**. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, 76(7), 1902–1907.
- **Sinha. V.R., R. Kumria.(2003)** .Microbially triggered drug delivery to the colon, *Eur. J.Pharm. Sci.* 18 (2003) 3–18.
- **Skjak-Braek, G., Larsen, B., & Smidsrod, O. (1986)**. Tailoring of alginates by enzymatic modification in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 8(6), 330–336.
- **Smidsrod, O., Haug, A., & Lian, B. (1972)**. Properties of poly (1,4- heuronates) in the gel state. I. Evaluation of a method for the determination of stiffness. *Acta Chemica Scandinavica*, 26(1), 71–78.
- **Smidsrod, O., & Skjak-Braek, G. (1990)**. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8(3), 71–78.

- **Sogias. I.A., A.C. Williams, V.V. Khutoryanskiy.(2008).** Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules* 9 (2008) 1837–1842.
- **Sohail A , Mark S. Turner , Allan C , Thor , Bhesh Bh .(2011).** Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology* 145 (2011) 162–168.
- **Soma P K , Patrick D. WILLIAMS, Y. Martin LO .(2009)** Advancements in non-starch polysaccharides research for frozen foods and microencapsulation of probiotics . review article., *Front. Chem. Eng. China*.
- **Stenson LR, Klaenhammer TR, Swaisgood HE .(1987).** Calcium alginate-immobilized cultures of lactic streptococci are protected from attack by lytic bacteriophage. *J Dairy Sci.* 70: 1121- 1127.
- **Sultana K., Godward G., Reynolds N., Arumugaswamy R., Peiris P., et Kailasapathy K. (2000).** Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and avaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int J. Food Microbiology.* 62: 47-55.
- **Sun W, Griffiths MW .(2000).** Survival of bifidobacteria in yogurt and simulate gastric juice following immobilization in gellan xanthan beads. *Int J Food Microbiol.* 61: 17-25.
- **Tanaka, H., Masatose, M., & Veleky, I. A. (1984).** Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate beads. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(1), 53–58.
- **Truelstrup-Hansen L, Allan-wojtas PM, Jin YL, Paulson AT .(2002).** Survival of free and calcium-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in simulated gastro-intestinal conditions. *Food Microbiol.* 19: 35-45.
- **Truelstrup-Hansen, L., Allan-Wojotas, P.M., Jin, Y.L., Paulson, A.T.( 2002).** Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. In milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology* 19 (1), 35–45.
- **Tsen Z H, Lin Y P, Haung H Y, King V A E. ( 2008 ) .** Studies on the fermentation of tomato juice by using  $\kappa$ -carrageenan immobilized *Lactobacillus acidophilus*. *J Food Process Preserv*, 32: 178– 189
- **Wanderley J.K.,Torres G.A.F.,Morales M.L.,Ulhoa J.C.(2004).**Biochemical characterization of  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus* *FEMS Microbiology letters* ,(231):165-169.

- **Wang, Z.L., Finlay, W.H., Pepler, M.S., Sweeney, L.G.( 2006).** Powder formation by atmospheric spray-freeze-drying. *Powder Technology* 170 (1), 45–52.
- **Wunwisa Krasaekoopt, Bhesh Bhandari, Hilton Deeth .(2003).** Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt .*Journal of International Dairy* 13 (2003) 3–13.
- **Yanez-Fernandez, J., Ramos-Ramirez, E.G., Salazar-Montoy, J.A.( 2008).** Rheological characterization of dispersions used in the preparation of microcapsules obtained by interfacial polymerization containing *Lactobacillus* sp.. *European Food Research and Technology* 226 (5), 957–966.
- **Ziar H, Gerard Ph , Riazi A . (2012) .** Calcium alginate-resistant starch mixed gel improved the survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. *International Journal Of food Science and Technologie* . vol. 47, n°7, pp. 1421-1429.
- **Zohary M., and Orshan P. (1959).** The maquis of *Ceratonia siliqua* in Israel, *Palest. J. Bot. Jerusalem*, 8: 385-397.
- **Zuidam, N.J., Shimoni, E. (2009).** Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to take them. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V. (Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer-Verlag, New York Inc., pp. 3–29.