

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem Faculté des
sciences de la nature et de la vie



جامعة عبد الحميد ابن باديس
مستغانم

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de sciences alimentaires

Mémoire de fin d'étude

Préparé par :

Melle Moulefida Khadidja

Melle Boukhatem Imène

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire

Thème

**Étude de l'encapsulation des probiotiques et
la fermentation du jus de grenade**

Devant le Jury :

Président	M. BENABDELMOUMEN Djilali	Grade	MCA
Encadrant	M. BENBOUZIANE Bouasria	Grade	MCA
Examineur	M. ZABOURI Younes	Grade	MCA
Co-encadrant	M. BENTAHER Mohamed Cherif	Grade	Doctorant

*Thème réalisé au laboratoire pédagogique de biologie moléculaire de la
faculté des sciences de la nature et de la vie*

Année universitaire : 2023/2024

Remerciement :

Je tiens à exprimer notre profonde gratitude à notre encadrant, **M.BENBOUZIANE Bouasria**, pour sa précieuse guidance, ses conseils avisés et son soutien tout au long de ce travail. Ses orientations nous ont été d'une grande aide et ont grandement contribué à l'aboutissement de ce projet.

Je remercie également sincèrement notre co-encadrant, **M. BENTAHAR Mohamed Cherif**, pour ses encouragements constants et sa disponibilité, ainsi que pour avoir mis à notre disposition les ressources nécessaires au sein du laboratoire.

Je tiens également à exprimer notre reconnaissance aux membres du jury, et en particulier à l'examineur **M. ZABOURI Younes** et au président du jury **M. BENABDELMOUMEN Djilali**, pour avoir accepté d'évaluer notre travail. Leur expertise et leurs remarques constructives nous ont permis d'approfondir notre réflexion et d'améliorer la qualité de ce mémoire.

Dédicace

*Je dédie ce mémoire à ma famille, source de mon courage et de ma motivation. À la mémoire de mon deuxième père, feu **TAILEB Abdelkader**, qui continuent d'inspirer mes pas.*

*À mon père, **MOULEFIDA Mohamed**, pour son soutien indéfectible*

*À ma mère, **TAILEB Nacera**, et à ma deuxième mère, **BELAZOUGUI Nacera**, pour leur amour inconditionnel et leurs encouragements constants*

*À mes deux sœurs, **Fatima** et **Nassima**, pour leur présence réconfortante et leur soutien.*

*À mon petit ange le nouveau membre de notre famille **Haythem Abdelkader**.*

*À toute la famille **TAILEB**, pour leur présence et leur soutien.*

*À mon binôme, **BOUKHATEM Imen**, pour son aide précieux et sa collaboration durant ce travail.*

*À mes amis **Zineddine**, **Khadidja**, **Soumia**, et **Houda**, pour leur amitié, leur soutien, et les moments partagés qui ont enrichi cette aventure.*

*À toute la promotion de **QPSA 2023/2024***

MOULEFIDA Khadidja

Dédicace

*Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères dans ma vie mes chers parents **BOUKHATEM Ali et BELGHENNOU Nacera** .Merci mes parents pour m'avoir toujours encourager, vous avez été ma force motrice que dieu les garde pour moi*

*A ma sœur **Meriem** et mon petit frère **Ayoub** pour leur encouragement et leur soutien*

*A tous la famille **BELGHENNOU** qui me soutient toujours pour réussir dans mes études durant toutes ces années et pour travailler avec plus de courage*

*A mon binôme **MOULEFIDA Khadidja** pour sa présence et son soutien*

*A mes amis : **Khadidja,Houda et Soumia***

*A la famille **BOUKHATEM***

A mes collègues de promotion de master qualité des produits et sécurité alimentaire

BOUKHATEM Imène

Liste des tableaux

Tableau 1 : composition du jus de grenade naturel	7
Tableau 2: composition de l'Elixir du jus de grenade fermenté	10
Tableau 3: les espèces des micro-organismes considérées comme probiotiques	15
Tableau 4: les critères de sélection des probiotiques	16
Tableau 5: les effets thérapeutiques des probiotiques et leurs métabolites sur la santé humaine..	22
Tableau 6: les voies de fermentation	22
Tableau 7: quelques propriétés technologiques et nutritionnelles des bactéries.....	22
lactiques.....	22
Tableau 8: les techniques d'encapsulation les plus courantes, leurs avantages et leurs	
désavantages.....	28
Tableau 9: Les biopolymères utilisés en encapsulation	31
Tableau 10: les souches lactiques	46
Tableau 11: les souches pathogènes	46
Tableau 12: observations selon les concentrations d'alginate	62
Tableau 13: des résultats d'encapsulation à plusieurs pourcentages	62
Tableau 14: la vitesse d'agitation(extrusion, emulsion)	64
Tableau 15: taille de capsules observée	65
Tableau 16: observation des capsules.....	66
Tableau 17: température de conservation.....	66
Tableau 18: type de l'huile.....	67
Tableau 19: type de stabilisant et sa concentration	67
Tableau 20: le volume de CaCl	68
Tableau 21: viabilité des souche après 35 jours.....	72
Tableau 22: taux de viabilité des souches à To et après 3h	73
Tableau 23: taux de sucres réducteurs avant et après fermentation.....	75
Tableau 24: dénombrement des souches après 21 jours de fermentation.....	76
Tableau 25: activité antimicrobienne contre S.aureus	78
Tableau 27: activité antimicrobienne contre E.coli.....	79

Liste des figures

Figure 1 : l'arbre de grenade.....	5
Figure 2 : voie métabolique des bactéries lactiques homofermentaires (ligne continue) et hétérofermentaires (ligne pointillée)	22
Figure 3 : les facteurs influents sur les probiotiques.....	23
Figure 4 : types de probiotiques	24
Figure 5 : facteurs influents sur la technique d' encapsulation	39
Figure 6 : centrifugeuse à 10000 RPM/min à 4°C	51
Figure 7 : les flacons des capsules	55
Figure 8 : des tube du jus de grenade fermenté par les bactéries libres.	58
Figure 9 : jus de grenade fermenté par les bactéries encapsulées	59
Figure 10 : évolution de l'indice de consommation durant les semaines d'élevage	70
Figure 11 : évolution des poids vifs durant les différentes semaines d'élevage	71
Figure 12 : pH des souche durant le test d'acidification.....	74
Figure 13 : pH du jus de grenade avant et après fermentation	76
Figure 14 : activité anti microbienne contrs <i>S.aureus</i> et <i>E.coli</i>	80

Les abréviations

MRS : Man Rogosa et Sharpe

BPS : bouillon phosphate saline

DO : densité optique

NO : nombre des bactéries lactiques avant le test à temps 0.

FPJ: jus fermenté par les bactéries libres

C FPJ :jus fermenté par les bactéries encapsulées

C PJ+B : capsules de jus de grenade + bactéries

LGG :*Lactobacillus rhamnosus GG*

DC1 : *Levilactobacillus brevis*

DC4 : *Lactiplantibacillus pentosus*

TF3: *Levilactobacillus brevis*

TF13: *Levilactobacillus brevis*

E.coli : *Escherichia coli*

S.aureus : *Staphylococcus aureus*

Résumé :

Ce mémoire explore les paramètres physico-chimiques influençant l'encapsulation, notamment les techniques de l'émulsion et de l'extrusion, l'encapsulation des probiotiques par extrusion, leur co-encapsulation, ainsi que leur utilisation dans la fermentation du jus de grenade. Une vitesse d'agitation de 2, une concentration d'alginate de 2,5 % et un temps de solidification de 25 minutes ont permis la formation de capsules aux caractéristiques appropriées pour l'encapsulation des souches. Dans le test in vivo, une diminution de l'indice de consommation des poulets de 0,8 à 1,1, ainsi qu'une augmentation du poids vif de plus de 200 g par rapport au régime contrôle, ont été observées après l'administration des capsules (TF3, LGG, DC4) pendant les semaines d'élevage. Après une conservation de 35 jours, la souche LGG a enregistré le taux de viabilité le plus élevé (92 %), contrairement à la souche DC4 (64 %). Cependant, la co-encapsulation a révélé une forte diminution de la viabilité des souches, avec des taux variant entre 1 % et 64 % par rapport aux souches encapsulées seules. Le nombre de bactériesensemencées a augmenté après la fermentation du jus de grenade de $2,92 \times 10^9$ à $8,58 \times 10^9$ pour les bactéries à l'état libre, et de 1×10^1 à $1,64 \times 10^1$ pour les bactéries à l'état encapsulé, avec une diminution parallèle du taux de sucres réducteurs de 1,08 à 3,9 et une variation du pH de 0,1 à 0,2 unité.

Mots- clés : probiotiques , souches , bactéries , jus de grenade , encapsulation, co-encapsulation, capsules , fermentation, viabilité..

Abstract:

This thesis explores the physicochemical parameters influencing encapsulation, particularly the techniques of emulsification and extrusion, the encapsulation of probiotics by extrusion, their co-encapsulation, as well as their use in the fermentation of pomegranate juice. An agitation speed of 2, an alginate concentration of 2.5%, and a solidification time of 25 minutes allowed for the formation of capsules with appropriate characteristics for the encapsulation of the strains. In the *in vivo* test, a decrease in the feed conversion ratio of chickens from 0.8 to 1.1, as well as an increase in live weight of more than 200g compared to the control diet, were observed after administering the capsules (TF3, LGG, DC4) during the rearing weeks. After 35 days of storage, the LGG strain recorded the highest viability rate (92%), in contrast to the DC4 strain (64%). However, co-encapsulation revealed a significant decrease in strain viability, with reductions ranging from 1% to 64% compared to singly encapsulated strains. The number of inoculated bacteria increased after the fermentation of pomegranate juice from 2.92×10^9 to 8.58×10^9 for free bacteria, and from 1×10^1 to 1.64×10^1 for encapsulated bacteria, with a parallel decrease in reducing sugar content from 1.08 to 3.9 and a variation in pH from 0.1 to 0.2 units.

Keywords: probiotics, strains, bacteria, pomegranate juice, encapsulation, co-encapsulation, capsules, fermentation, viability

ملخص :

يستكشف هذا البحث العوامل الفيزيائية والكيميائية المؤثرة على التغليف، لا سيما تقنيات الاستحلاب والبثق، تغليف البروبيوتيك بواسطة البثق، تغليفها المشترك، واستخدامها في تخمير عصير الرمان. أسفرت سرعة التحريك 2، وتركيز الألبينات بنسبة 2.5%، ووقت التصلب لمدة 25 دقيقة عن تشكيل كبسولات بخصائص مناسبة لتغليف السلالات. في الاختبار الحي، لوحظ انخفاض في معامل التحويل الغذائي للدجاج من 0.8 إلى 1.1، بالإضافة إلى زيادة في الوزن الحي بأكثر من 200 غرام مقارنة بالنظام الغذائي الضابط، بعد إعطاء الكبسولات (TF3، LGG، DC4) خلال أسابيع التربية. بعد حفظ هذه الكبسولات لمدة 35 يوماً، سجلت سلالة LGG أعلى معدل بقاء بنسبة 92% مقارنة بالسلالة DC4 التي بلغت نسبة بقائها 64%. ومع ذلك، كشف التغليف المشترك عن انخفاض كبير في بقاء السلالات، حيث تراوح بين 1% و 64% مقارنة بالسلالات المغلفة بشكل فردي. زاد عدد البكتيريا المزروعة بعد تخمير عصير الرمان م $10^0 \times 2.92$ إلى $10^0 \times 8.58$ للبكتيريا الحرة ومن $10^1 \times 1$ إلى $10^1 \times 1.64$ للبكتيريا المغلفة، مع انخفاض مواز في نسبة السكريات المختزلة من 1.08 إلى 3.9 وتغير في الأس الهيدروجيني من 0.1 إلى 0.2 وحدة.

كلمات مفتاحية : البروبيوتيك، السلالات، البكتيريا، عصير الرمان، التغليف، التغليف المشترك، الكبسولات، التخمير البقاء.

Sommaire

Introduction générale.....	1
CHAPITRE I : Généralités sur la grenade,le jus et sa fermentation.....	3
Introduction.....	4
1. Nomenclature :.....	5
2. Description macroscopique :	5
3. Le jus de grenade et sa composition :	6
4. Les effets thérapeutiques du jus de la grenade :	8
4.1 Radicaux libres :	8
4.2 La grenade est un anticoagulant naturel :	8
4.3 Prévention de l'arthrite :	8
4.4 Aide en dysfonction érectile :.....	8
4.5 Cancer de la prostate et maladies cardiaques :	8
4.6 Prévention de l'athérosclérose :	9
5.La fermentation de jus de grenade :	9
5.1Composition nutritionnelle de L'Élixir de grenade :	10
6.Intérêt de la fermentation du jus de grenade :.....	11
7.Quelques effets thérapeutiques prouvés du jus de grenade fermenté :.....	11
CHAPITRE II :Les probiotiques et les bactéries lactiques.....	13
1. Définition des probiotiques :	14
2. Les espèces des micro-organismes considérées comme des probiotiques	15
3. Les critères de sélection des probiotiques.....	16
4. Effets thérapeutiques des probiotiques et leurs métabolites sur la santé humaine.....	17
5. Le microbiote intestinal et les probiotiques :.....	19
6. Les bactéries lactiques comme probiotiques :	20
6.1 Définition des bactéries lactiques :	20
6.2 Le processus de fermentation :.....	20
6.3 La fermentation lactique :	21
6.4 Quelques propriétés technologiques et nutritionnelles des bactéries lactiques	22
7.Les facteurs influents sur les probiotiques (du processus jusqu'à la consommation).....	23
8. Les prébiotiques :	24
8.1 Les bienfaits rapportés des prébiotiques :	24
9.Les symbiotiques :	25
10.L'intérêt de la combinaison entre un probiotiques et un prébiotiques (symbiotique)	25

CHAPITRE III : l'encapsulation	26
Introduction :	27
1. Définition de l'encapsulation :	27
2. Les techniques d'encapsulation les plus courantes, leurs avantages et leurs désavantages	28
3. Les biopolymères utilisés dans la technique d'encapsulation, leur nature, leurs avantages et leur désavantages	31
4. Rôle de l'encapsulation :	38
5. Les facteurs influents sur la technique d'encapsulation	38
6. Encapsulation des probiotiques :	40
7. Intérêt de la microencapsulation des probiotiques :	40
8. Les critères de sélection de biomatériaux pour encapsulation des probiotiques :	41
9. Méthodologies pour tester le comportement gastro-intestinal des bactéries encapsulées et leur libération :	41
10. Encapsulation des symbiotiques	44
11. La fermentation des jus de fruits par utilisation des probiotiques encapsulés :	42
12. Les challenges d'utilisation de la technique d'encapsulation dans le domaine agroalimentaire :	43
PARTIE EXPERIMENTALE	45
1 Objectif du travail :	46
2. Présentation du lieu et durée de travail :	46
3. Matériel expérimental :	46
3.1 Les souches bactériennes utilisées :	46
3.1.1 Les souches lactiques :	46
3.1.2 Les souches pathogènes :	46
3.1.3 Les milieux de culture :	47
3.1.4 Produits :	47
3.1.5 Appareillage :	47
3.1.6 Verrerie et autres :	48
Les méthodes:	50
1. Revivification des souches :	50
2. Confirmation de la pureté des souches :	50
2.1 Examen microscopique :	50
2.2 Test catalase :	50
2.3 Coloration de GRAM :	50
3. Préparation de la suspension bactérienne :	51

4. Extrusion :	51
4.1 Protocole :	52
4.2 Étude de l'influence de quelques paramètres physicochimiques sur le procédé d'extrusion :	52
4.2.1 La concentration d'alginate :	52
4.2.2 La taille de la seringue :	52
4.2.4 Le temps de repos dans la solution CaCl :	52
4.2.5 La température de conservation :	53
5. Emulsion :	53
5.1 protocole :	53
5.2 Étude de l'influence de quelques paramètres physicochimiques sur la technique d'émulsion :	54
5.2.1 Le type de l'huile :	54
5.2.2 Le type et la concentration de l'émulsifiant :	54
5.2.3 La concentration d'alginate :	54
5.2.4 Le volume et le temps d'ajout de CaCl :	54
5.2.5 La vitesse d'agitation :	54
5.2.6 La taille de la seringue :	54
6. L'étude de l'effet d'administration de capsules de probiotiques chez le poulet (test in Vivo) :...	54
7. Test de conservation des capsules :	56
8. Test de résistance des capsules au pH acide :	56
9. Test d'acidification :	57
10. Fermentation du jus de grenade :	57
10.1 Préparation de la suspension bactérienne :	58
10.2 Encapsulation des souches par extrusion :	58
11. Fermentation du jus de grenade par les bactéries libres :	58
12. Fermentation de jus de grenade par les bactéries encapsulées :	58
13. Analyses physico-chimiques de jus de grenade avant et après fermentation :	59
14. Viabilité des souches après 21 jours de fermentation (3 semaines) :	59
15. Mesure de l'activité antimicrobienne :	60
RESULTATS ET DISCUSSION	61
1. Concentration d'alginate:	62
2. Vitesse d'agitation:	64
3. Temps d'agitation dans la solution CaCl :	66
4. Température de la conservation :	66

5. Type de l'huile :	67
6. Type et concentration de stabilisant :	67
7. Le volume et le temps d'ajout de CaCl :	68
8. Etude in vivo : administration des capsules de probiotiques chez le poulet :	69
8.1 Évolution de l'indice de consommation et du poids vif :	69
8.1.1 Pour l'évolution de l'indice de consommation :	69
8.1.2 Pour l'évolution du poids vif :	70
9. Conservation des capsules après 35 jrs :	71
10. Test jus gastrique pH = 2 :	73
11. Pouvoir acidifiant :	74
12. Degré BRIX ,pH et taux de sucre réducteurs avant et après fermentation	75
13. Dénombrement des bactéries après 21 jours de fermentation :	76
14. Activité antimicrobienne	79
Conclusion générale :	82
Perspectives:	84

Annexes

Introduction générale

Introduction générale

L'intérêt croissant pour les probiotiques et les aliments fonctionnels a suscité un engouement notable dans les domaines de la nutrition, d'industrie agro-alimentaire et de la santé publique. Les probiotiques, définis comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte, jouent un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre de la flore intestinale et l'amélioration de la santé digestive. Parmi les divers moyens d'intégrer les probiotiques dans l'alimentation, l'encapsulation s'avère être une technique prometteuse.

Cette méthode permet de protéger les probiotiques contre les conditions environnementales défavorables, telles que les facteurs physicochimiques, l'acidité gastrique et les enzymes digestives, tout en améliorant leur viabilité et leur libération ciblée dans l'intestin.

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous intéressons particulièrement à l'encapsulation des probiotiques en vue de leur conservation et à leur utilisation dans la fermentation du jus de grenade. Le jus de grenade, riche en antioxydants et en composés bioactifs, offre non seulement des avantages nutritionnels, mais sert également de milieu favorable pour la croissance et l'activité des probiotiques. Cependant, les défis posés par la stabilisation des probiotiques dans un environnement acide comme le jus de grenade nécessitent une approche méthodique et innovante. Notre étude se divise en plusieurs volets principaux.

Tout d'abord, nous avons procédé à l'encapsulation des probiotiques en utilisant la technique d'extrusion et émulsion après étude des différents paramètres physico-chimiques pour optimiser leur protection et leur viabilité. Ensuite, une co-encapsulation a été réalisée pour évaluer les interactions potentielles entre les probiotiques et d'autres composants bioactifs du jus de grenade. Par la suite, une analyse physicochimique du jus de grenade a été menée afin de comprendre les modifications induites par la fermentation. Par la suite, la fermentation du jus de grenade a été étudiée en utilisant à la fois des bactéries libres et encapsulées.

Enfin, une analyse physicochimique du jus de grenade a été menée afin de comprendre les modifications induites par la fermentation. Cette démarche vise à comparer les effets de l'encapsulation sur la viabilité des probiotiques, la qualité du jus, et les transformations biochimiques qui en résultent. Les résultats obtenus fourniront des informations précieuses sur l'efficacité de l'encapsulation et sur les avantages potentiels de l'intégration des probiotiques encapsulés dans les produits alimentaires.

Introduction générale

Ce mémoire a aussi comme objectif l'exploration approfondie de l'encapsulation des probiotiques et de leur application la fermentation du jus de grenade, mettant en lumière les aspects physicochimiques et biologiques de ces processus.

CHAPITRE I : Généralités sur la grenade, le jus et sa fermentation

Introduction

La grenade (*Punica Granatum L.*) est l'un des plus anciens fruits comestibles connus. De Perse, région native de la grenade, sa culture s'est répandue en Asie, en Afrique du Nord et en Europe. En effet, les espèces de grenades comprennent un très grand nombre d'espèces domestiques, Les biotypes sauvages et ornementaux présentent une grande variabilité dans les traits phénotypiques tels que la taille et le rendement des fruits, la saison de floraison, la dureté des graines, l'écorce et la couleur de l'arille. L'intérêt croissant des consommateurs pour les aliments favorables à la santé pousse les industries à réaffecter des ressources au développement de nouveaux aliments fonctionnels. Cela favorise la recherche sur l'optimisation de nouveaux produits à haute valeur nutritionnelle destinés à être utilisés comme supports de composés fonctionnels.

Selon les preuves scientifiques relatives à ses propriétés fonctionnelles et favorables à la santé, une demande croissante de grenade (comme fruit frais ou jus) a été observée dans le monde entier. Grâce à ses composés et à l'activité antioxydante corrélée. En effet, il a été rapporté que l'activité antioxydante de la grenade est supérieure à celle du vin rouge, du thé vert, du raisin/canneberge, du pamplemousse et du jus d'orange. Outre l'activité antioxydante, des propriétés antivirales, anti-inflammatoires et antiathérosclérotiques ont été attribuées aux composés de la grenade, le rôle des graines dans la prévention des maladies cardiovasculaires, du cancer, de l'asthme et dans la réduction du taux de cholestérol ont été récemment mises en évidence.

Dans l'ensemble, les jus de fruits conviennent au développement d'aliments fonctionnels car ils sont riches en composés bioactifs et répondent aux revendications des consommateurs pour des aliments sains, savoureux et pratiques .La fermentation de matières végétales via des bactéries lactiques a incité les industries à envisager de produire des aliments fermentés comme source alternative de probiotiques .Plusieurs études ont démontré que la fermentation du jus de grenade (par des bactéries lactiques, des levures ou des champignons filamenteux) est un outil prometteur pour améliorer d'avantage son profil nutritionnel et fonctionnel.(Pontonio et al., 2019)

1. Nomenclature :

- Nom scientifique : Punicagranatum
- Nom français : grenadier
- Nom anglais : pomegranate

- Nom espagnol : Granada
- Nom italien : Melograno
- Nom arabe : Romane

2. Description macroscopique :

La grenade (en allemand 'pomme avec des grains') provient d'un arbre adulte à feuilles caduques ou d'un arbuste à feuilles lancéolées. Ce dernier peut atteindre entre 5 et 10 mètres de hauteur et vivre jusqu'à 200 ans. Il est touffu, très ramifié depuis la base du tronc et plus ou moins épineux. Le tronc est tortueux, à écorce grisâtre qui se ramifie en branches irrégulières, légèrement épineuses au sommet. Il fleurit au printemps et en été en rouge corail. Les fruits savoureux bruns rouges ont la forme d'une pomme qui serait dotée d'une couronne formée de sépales. Les grenades font partie des baies dans la mesure où leur chair n'est ni charnue, ni ligneuse. Leur peau durcie, renferme des compartiments remplis de graines anguleuses. Les fruits ont leur place en cuisine. On peut les manger frais ou les boire sous forme de cidre. (Kumari, Dora, Kumar, & Kumar, 2012)

Arbre:

La grenade est un arbuste soigné et arrondi ou un petit arbre qui peut atteindre 20 ou 30 pieds, mais plus généralement jusqu'à 12 à 16 pieds de hauteur. Il est généralement à feuilles caduques, mais dans certaines zones, les feuilles persisteront sur l'arbre. Le tronc se découvre par une écorce rouge-brun qui devient ensuite grise. Les branches sont raides, angulaires et souvent épineuses. Il existe une forte tendance à drageonner à partir de la base. Les grenades vivent également longtemps. La vigueur d'une grenade diminue après environ 15 ans.



Figure 1 : l'arbre de grenade

- Feuille:

La grenade a des feuilles brillantes et coriaces, étroites et en forme de lance.

Fleurs:

Les jolies fleurs écarlates, blanches ou panachées mesurent plus d'un pouce de diamètre et ont 5 à 8 pétales froissés et un calice rouge, charnu tubulaire qui persiste sur le fruit. Les fleurs peuvent être solitaires ou regroupées par deux ou trois aux extrémités des branches. La grenade est autogame ainsi que pollinisation croisée par les insectes. La pollinisation croisée augmente la nouaison. La pollinisation par le vent est insignifiante.

Fruit:

Le fruit presque rond, de 2 1/2 à 5 pouces de large, est couronné à la base par le calice proéminent. La peau ou la croûte dure et coriace est typiquement jaune recouverte de rose clair ou foncé ou de rouge riche. L'intérieur est séparé par des parois membraneuses et des tissus blancs, spongieux et amers en compartiments remplis de sacs remplis de pulpe ou d'arille légèrement acide, juteux, rouge, rose ou blanchâtre. Dans chaque sac se trouve une graine angulaire, molle ou dure. Des températures élevées sont essentielles pendant la période de fructification pour obtenir la meilleure saveur. La grenade 15 peut commencer à produire 1 an après la plantation, mais 2 ans et demi à 3 ans sont plus courants. Dans des conditions appropriées, le fruit devrait mûrir environ 5 à 7 mois après la floraison.

3. Le jus de grenade et sa composition :

Le jus de grenade est un liquide obtenu à partir de l'extraction du fruit de la grenade, une baie rouge originaire du Moyen-Orient. Ce jus est apprécié pour son goût légèrement acidulé et sucré, ainsi que pour ses nombreux bienfaits pour la santé, notamment en raison de sa teneur élevée en antioxydants, en vitamines C et K, ainsi qu'en potassium. Il est souvent consommé pur ou mélangé à d'autres jus pour améliorer la saveur et bénéficier de ses propriétés nutritives.

3.1 Composition du jus de grenade

Le jus de grenade, comme de nombreux autres jus de fruits, se compose de sucres tels que le glucose, le fructose et le saccharose et d'acides organiques tels que l'acide citrique, l'acide ascorbique, l'acide gallique et l'acide helladique. Ainsi que d'acides aminés comme la valine, proline et méthionine. Il contient aussi des flânonns et des indoles amines comme la tryptamine, la sérotonine, neuromédiateur et les anthocyanidines, responsables de la couleur rouge des grenades. Ce tableau montre les valeurs minimales et maximales obtenues pour les acides parmi les acides

CHAPITRE I : Généralité sur la grenade, le jus et sa fermentation

aminés trouvés dans la grenade, il y a la valine, proline et méthionine. D'autres études ont montré que le jus a une composition élevée en vitamines hydrosolubles dont le plus important est la vitamine C avec une concentration qui varie entre 4 et 6 mg/100g de proportion comestible selon le codex alimentarius en 2009.

Tableau 1 : composition du jus de grenade naturel(Hmid, 2013)

	Composé	Quantité
Acides organiques	Acides citrique	0.09-0.32
	Acides malique	0.10-0.21
	Acides oxalique	0.01-0.07
	Acides tartrique	0.01-0.05
Sucres	Fructose	5.54-8.24
	Glucose	5.53-7.80
	Saccharose	0.01-0.07
Minéraux et métaux lourds	Phosphate	0.30
	Fer	259.00
	Potassium	3.00
	Calcium	3.00
	Sodium	3.00
	Manganèse	0.12
	Magnésium	0.15
	Cuivre	0.07
	Sélénium	0.60
Vitamines	Vitamine B1	0.03

	Vitamine B2	0.03
	Vitamine C	9.90-17.60

4. Les effets thérapeutiques du jus de la grenade :

4.1 Radicaux libres :

Les grenades sont une riche source d'antioxydants qui aide à protéger les cellules de notre corps des radicaux libres, qui causent le vieillissement prématuré. Des radicaux libres se forment en raison de l'exposition au soleil et les toxines nocives de l'environnement.(**Bhowmik, Gopinath, Kumar, & Kumar, 2013**)

4.2 La grenade est un anticoagulant naturel :

Prévient les caillots sanguins dans le cœur et les artères, également la rétention urinaire. les graines empêchent votre plaquettes sanguines de coagulation et de la formation de caillots.(**Bhowmik et al., 2013**)

4.3 Prévention de l'arthrite :

La grenade peut réduire les dommages sur le cartilage pour les personnes atteintes d'arthrite. Ce fruit a la capacité de réduire l'inflammation et les combats même les enzymes qui détruisent le cartilage.(**Bhowmik et al., 2013**)

1.4 Aide en dysfonction érectile :

Le jus de grenade peut améliorer l'érection mais ne fonctionne que modérément.(**Bhowmik et al., 2013**)

1.5 Cancer de la prostate et maladies cardiaques :

Deux études distinctes affirment que la grenade notamment le jus aide à combattre le cancer de la prostate. Dans un laboratoire où une expérience est effectuée , les jus "ont ralenti la croissance de culture des cellules cancéreuses et ont favorisé la mort cellulaire , dans une autre expérience, le jus de grenade a amélioré l'état du sang, d'où améliorer la santé des personnes atteintes de maladies cardiovasculaires.(**Bhowmik et al., 2013**)

1.6 Prévention de l'athérosclérose :

Les grenades empêchent le durcissement de l'artère(les murs) avec un excès de graisse, laissant vos artères grasses libre et pomper avec des antioxydants.(**Bhowmik et al., 2013**)

5. La fermentation de jus de grenade :

Les aliments fermentés sont définis comme « des aliments ou des boissons produits par une croissance microbienne contrôlée et la conversion de composants alimentaires par action enzymatique. De nombreux aliments ont historiquement subi une fermentation, notamment la viande et le poisson, les produits laitiers, les légumes, le soja, d'autres légumineuses, les céréales et les fruits. Il existe plusieurs variables dans le processus de fermentation, notamment les micro-organismes, les ingrédients nutritionnels et les conditions environnementales, donnant lieu à des milliers de variations différentes d'aliments fermentés. Historiquement, la fermentation des aliments était utilisée comme méthode de conservation, car la génération de métabolites antimicrobiens (par exemple, acides organiques, éthanol et bactériocines) réduit le risque de contamination par des micro-organismes pathogènes. La fermentation est également utilisée pour améliorer les propriétés organoleptiques (par exemple le goût et la texture), Il existe plusieurs types de fermentation dont la plus fameuse est la fermentation lactique en raison de son rôle dans l'amélioration des qualités organoleptiques et nutritionnelles d'une denrée alimentaire. En outre, la fermentation lactique offre une large diversification des produits alimentaires à base du même substrat et permet de fermenter plusieurs classes d'aliments d'origine animale ou végétale. (Marco et al., 2017)

5.1 Le Dr Ludwig Manfred Jacob a développé et breveté un procédé de fabrication unique:

La fermentation par procédé bioactif. Ce procédé, résultant de 8 années de recherche scientifique, améliore nettement la biodisponibilité de ces polyphénols Cette fermentation originale et unique est utilisée pour produire 'Élixir de Grenade fermenté dont la forte teneur en polyphénols hautement biodisponibles est contrôlée à chaque fabrication.

La fermentation se déroule pendant 3 à 4 semaines, en anaérobie, sous température de 35° à 38° grâce à action d'enzymes spécifiques reproduisant plus fidèlement possible, la digestion normalement vécue en l'intestin. Durant ce processus de fermentation, seul du jus de grenade est ajouté Ce procédé original permet, non seulement, de conserver intégrité des principes actifs, mas aussi de les condenser, et d'augmenter la teneur en polyphénols Durant le processus de fermentation, des microorganismes probiotiques spécialement choisis agissent sur les polyphénols de grenade en reproduisant le processus de dégradation naturelle qui a lieu dans l'intestin au cours de la digestion. Ainsi, des molécules longues de polyphénols sont découpées en petites molécules (faible poids moléculaire) plus facilement assimilables par notre intestin de la sorte, les polyphénols deviennent hautement biodisponibles et assimilables, ce qui augmente nettement leur

action bénéfique sur l'organisme (prostate, cerveau, artères,...). Ce processus de prédigestion transforme les polyphénols de grenade, difficilement absorbables, en substances biodisponibles (molécules basses) et donc extrêmement bioactives.(curtay, 2015)

5.2 Composition nutritionnelle de L'Élixir de grenade :

- Minimum 36000 mg/L de polyphénols à chaque production (méthode Folon);
- 11.900 mg/L de punicalagine A et B. Aucun autre aliment connu ne possède autant de punicalagine, substance réputée pour ses propriétés antioxydants et, conjuguée à l'acide ellagique, pour son action anti-inflammatoire;
- 1992 mg/L d'acide ellagique à faible poids moléculaire

En conclusion, il existe un spectre varié de polyphénols typiques de la grenade (plus de 50 000 mg/L). Seul le spectre complet rend le produit actif. De l'acide lactique issu de la fermentation par les microorganismes.(Curtay ., 2015).

Tableau 2: composition de l'Elixir du jus de grenade fermenté

	Valeur moyenne par 100 ml	1 portion*
Calories	1746 KJ/179 Kcal	176 KJ/41 Kcal
Lipides dont	<0.5 g	<0.5 g
acides gras saturés	<0.1 g	<0.1 g
Glucides dont	47 g	9 g
Sucres du fruit	47 g	9 g
Protéines	0.8 g	0.2 g
Sel	0.04 g	0.01 g
Potassium	2000 mg (100%**)	400 mg (20%**)
Polyphénols	3600 mg	720 mg

6. Intérêt de la fermentation du jus de grenade :

500 ml d'Élixir de Grenade = 10L de jus de grenade classique = 21x plus concentré que le jus de grenade frais. Ce concentré fermenté est 21 à 25 fois (selon les fabrications) plus antioxydant que le jus de grenade traditionnel et 36 fois plus que l'infusion de thé vert. Autrement dit, 1 cuillère à soupe d'Élixir de Grenade (10 ml) a la même capacité antioxydante qu'un verre de jus de grenade ou qu'un tasse de thé vert.

Sa fermentation augmente la biodisponibilité et la bioactivité des polyphénols:

Nous assimilons mieux le produit qui agit plus fort. En plus d'améliorer la bioactivité et l'assimilation des polyphénols, la fermentation décompose le sucre du fruit, permettant, dans le cadre du Grenade 100% fermenté, sa consommation aux diabétiques. (Curtay, 2015)

7. Quelques effets thérapeutiques prouvés du jus de grenade fermenté :

Le jus de grenade est surtout connu pour la prévention, voire le renforcement des traitements du cancer de la prostate. En effet, le chercheur serein Dr Ephraïm Lansky a démontré que le jus de grenade était capable d'inhiber la prolifération des cellules tumorales de la prostate de 50 à 90%. Dans un essai clinique réalisé sur 48 patients atteints de tumeur prostatique, le jus de grenade (570mg de polyphénols = 2 c. à soupe = 20ml d'Élixir de Grenade fermenté) a prolongé le temps de doublement du taux de PSA (antigène spécifique prostatique), de 15,4 à 60 mois, ce qui représente une réduction spectaculaire de 44,6 mois de progression tumorale. Une équipe du Wisconsin a même pu démontrer une action positive de l'extrait de grenade lyophilisé, préservant tous ses polyphénols, lorsque les traitements classiques ne sont pas efficaces.

Outre des études démontrant son action sur le cancer du sein (Kim et al., 2002), le cancer de la prostate ou la leucémie, il a aussi accumulé ces dernières années un ensemble d'observations très positives sur le plan cardiovasculaire: pour l'amélioration du profil lipidique, grâce à ses effets antioxydants (particulièrement pour le LDL cholestérol), anti-inflammatoires, antihypertenseurs, antiagrégants plaquettaires.

Une autre étude randomisée, menée par Aviram, au cours de laquelle 19 volontaires victimes de rétrécissement carotidien ont régulièrement consommé 50 ml de concentré de grenade (20 ml d'Élixir de Grenade) pendant 3 mois, a permis de constater, dès la première année, chez les sujets prenant l'Élixir de Grenade fermenté, un effet anti agrégation plaquettaire et une réduction de 35% de l'épaisseur des dépôts de leur paroi carotidienne. Le groupe témoin recevant un placebo,

CHAPITRE I : Généralité sur la grenade, le jus et sa fermentation

par contre, a connu une augmentation de l'agrégation plaquettaire et un épaissement de la paroi carotidienne de 10 %. La protection cardiovasculaire par le jus de grenade a aussi été confirmée chez les diabétiques.

In vitro, l'Élixir de Grenade injecté dans une forte concentration de queues cancéreuses réduirait leur prolifération de plus de 50% et permettrait même de redonner aux cellules cancéreuses leur capacité à finir leur vie normalement, c'est-à-dire à retrouver leur apoptose (mort naturelle).

La consommation de l'Élixir de Grenade fermenté de Dr. Jacobs est efficace en cas d'arthrite Il permet un gain de mobilité et de qualité de vie pour les patients atteints d'arthrite

En effet, des études récentes montrent que es polyphénols de grenade combattent la dégénérescence inflammatoire du cartilage articulaire en cas d'arthrite rhumatoïde car la grande à des concentration de polyphénols biodisponibles protège le tissu cartilagineux de deux manières: en inhibant les protéines pro-inflammatoires telles que COX-2, MAP kinases, TNF-alpha et es substances pro-inflammatoires (IL6, prostaglandines E2); en freinant la formation de métalloprotéines responsables de la destruction du cartilage.

Dans les fermentations enzymatiques par procédé bioactif développées par le docteur en médecine L. M. Jacob (Allemagne), des microorganismes probiotiques spécialement choisis agissent sur les polyphénols de grenade avec leur spectre d'enzymes naturels, les libèrent de leurs associations gluco-conjuguées, ce qui les rend plus petites et plus faciles à absorber et les activent.

Des autres études sont menés sur l'effet symbiotique de la combinaison entre les prébiotiques, les composants bioactifs du grenade et les probiotiques. Beaucoup de recherche ont prouvé l'effet bénéfique de cette combinaison en titre de l'amélioration de la bioassimilation, la bioactivité et l'enrichissement du microbiote intestinal(**curtay, 2015**)

CHAPITRE II : Les probiotiques et les bactéries lactiques

Introduction

L'innovation dans l'industrie alimentaire s'est concentrée sur les nouvelles fonctions de l'alimentation, qui sont la prévention de diverses maladies liées au mode de vie, principalement grâce au développement de compléments alimentaires, qui peuvent affecter la composition microbienne intestinale. En outre, la préférence de nombreux consommateurs pour les aliments sans additifs a également stimulé la facilitation et la promotion de divers nouveaux produits par l'industrie alimentaire appelés aliments fonctionnels. Les aliments fonctionnels sont des aliments qui peuvent affecter positivement des fonctions spécifiques du corps humain. Au-delà des effets nutritionnels adéquats, conduisant à l'apport de divers avantages pour la santé des humains.

Les aliments fonctionnels comprennent principalement des probiotiques, des prébiotiques et, plus récemment, des symbiotiques. (Plessas, 2021)

1. Définition des probiotiques :

Le mot « probiotiques » est dérivé du mot grec « pro bios » signifiant « pour la vie ». En 1965, on a bien défini les probiotiques comme « des substances produites par un micro-organisme spécifique qui stimulent la croissance d'un autre micro-organisme ». En 1974, Parker a proposé que « les probiotiques sont des micro-organismes et leurs substances, qui contribuent à l'équilibre des microflores intestinales ». À la fin des années 1980, la définition suivante a été acceptée : « des compléments alimentaires microbiens vivants, qui ont un effet bénéfique sur l'organisme hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal ». Cependant, cette définition concerne davantage les animaux que les humains. Une décennie plus tard, « les probiotiques sont des préparations de cellules microbiennes ou des composants de cellules microbiennes qui ont un effet bénéfique sur la santé et le bien-être de l'hôte ». Aujourd'hui, la définition la plus acceptée est proposée par la FAO/OMS comme « les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte » (Rajam & Subramanian, 2022)

2. Les espèces des micro-organismes considérées de probiotiques :(Otlés, 2013)

Tableau 3: les espèces des micro-organismes considérées de probiotiques

Microorganismes	Genre	Espèces
Bactéries lactique	<i>Lactobacilles spp.</i>	<i>L. acidophilus</i>
		<i>L. amylovorus</i>
		<i>L. court</i>
		<i>L. bulgaricus</i>
		<i>L. casei</i>
<i>L. crispatus</i>		
<i>L. delbrueckii spp. Bulgaricus</i>		
<i>L. levure</i>		
<i>L. poulets</i>		
<i>L. gesseri</i>		
<i>L. helveticus</i>		
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. lactis</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		
<i>L. salivaire</i>		
	<i>Streptocoque spp.</i>	<i>S. salivarius subsp. Thermophilus</i>
	<i>Lactococcus spp.</i>	<i>L. lactis</i>
	<i>Leuconostoc spp.</i>	<i>LC. Mésentéroïdes</i>
	<i>Pesiococcus spp.</i>	<i>P. pontosaceus</i>
		<i>P. acidilactici</i>
Bifidobactéries	<i>Bifidobactérie spp.</i>	<i>B. adolescent</i>
		<i>B. animal</i>
		<i>B. bifidum</i>
		<i>B. court</i>
		<i>B. essensis</i>
		<i>B. de l'enfant</i>
	<i>B. laterosporus</i>	

		<i>B. longum</i>
Propionibactéries	<i>Propionibactérie spp.</i>	<i>P. acidipropionici</i> <i>P. freudenreichii</i> <i>P. jensenii</i> <i>P. thoenii</i>
Entérobactéries	<i>Entérocooccus spp.</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
Bactéries sporulées	<i>Bacillus spp.</i>	<i>B. alcalophile</i> <i>B. cereus</i> <i>B. coagulans</i> <i>B. subtilis</i>
Autres bactéries	<i>Escherichia spp.</i> <i>Sporolactobacillus spp.</i>	<i>E. coli</i> <i>S. inulinus</i>
Levures	<i>Saccharomyces spp.</i>	<i>S. cerevisiae (boulardii) d</i>

3. Les critères de sélection des probiotiques : (Ganguly et al., 2011)

Tableau 4: les critères de sélection des probiotiques

<p>Critères de sécurité</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Historique de non pathogénicité (GRAS) • Souche d'origine humaine ou alimentaire • Souche caractérisée par des méthodes phénotypiques et génotypiques • Souche déposée dans une collection de culture internationale • Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques • Pas de deshydroxylation des sels biliaires
------------------------------------	--

<p>Critères fonctionnels</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tolérance à l'acidité • Tolérances à la bile • Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production de substances antimicrobiennes • Adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et/ou au mucus • Stimulation du système immunitaire
<p>Critères technologiques</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini • Conservation des propriétés probiotiques après production

4. Effets thérapeutiques des probiotiques et leurs métabolites sur la santé humaine
:(Otlés, 2013)

Tableau 5: les effets thérapeutiques des probiotiques et leurs métabolites sur la santé humaine

Activité probiotique	Mécanismes	Effet sur la santé
Antibactérien	Libration d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène, de bactériocines qui modulent la croissance et/ou l'adhésion muqueuse d'agents pathogènes ou d'autres populations bactériennes de la muqueuse intestinale	Prévention et/ou gestion des infections gastro-intestinales et de la diarrhée
Fourniture d'enzymes	Activité B-galactosidase Activité A-galactosidase Activité estérase	Amélioration de la digestion et de la tolérance au lactose chez les individus hypolactasiques

		Amélioration de la digestion et de la tolérance aux galactosides (raffinose, stachyose, mélioïdose du soja) Déglycosilation des polyphénols
Composants cellulaires immuno- modulateurs et / ou activité anti-inflammatoire	Les exopolysaccharides, les acides lipotéiques ...etc sont capables d'augmenter la libération d'IgA sécrétoires ou de défensines, de stimuler les récepteurs Toll- Like ou l'activité tueuse naturelle des lymphocytes T cytotoxiques, de stimuler la sécrétion phagocytaire des neutrophiles ou de macrophages, de stimuler ou d'inhiber la sécrétion des cytokines anti ou pro-inflammatoire respectivement par les cellules - compétentes de l'hôte	Prévention et/ ou prise en charge des infections bactériennes et virales locales et systémique. Diminution de la symptomologie chez les personnes allergiques. Diminution de l'inflammation chez les sujets Présentant des pathologies inflammatoires (MICI,NEC, pathologies auto-immunes....etc
Activité anti- tumorales	Inhibition des activités enzymatiques pro-cancérogènes (B-glucuronidase, nitroréductase,	Diminution du risque de cancer colorectal

	azoréductase) par les populations bactériennes de l'IM stimulation de l'apoptose antioxydant/anti-inflammatoire activités liaison mutagène	
Activité trophique	Augmentation des polyamines (<i>saccharomyces boulardi</i>)	Stimule la croissance de la muqueuse intestinale

5. Le microbiote intestinal et les probiotiques :

Le microbiote humain est un écosystème complexe pouvant contenir jusqu'à 1000 à 1150 espèces bactériennes et entre 10^{13} et 10^{14} micro-organismes, la plus grande densité et diversité de bactéries se trouvant dans l'intestin grêle distal et du côlon. À la naissance, tout le tractus intestinal est stérile ; les bactéries pénètrent dans l'intestin à la naissance et lors du premier repas. Après la petite enfance, la composition de la microflore intestinale reste relativement constante jusqu'à plus tard dans la vie. Lorsqu'elle est perturbée, la flore a en général, une capacité considérable à se restaurer. En raison de la motilité normale de l'intestin et des effets antimicrobiens de l'acide gastrique, l'estomac et l'intestin grêle proximal contiennent relativement un petit nombre de bactéries chez des sujets sains. La microbiologie de l'iléon terminal représente une zone de transition entre le jéjunum contenant majoritairement des espèces aérobies et la population dense d'anaérobies présente dans le côlon. Le nombre de colonies bactériennes peut atteindre environ 10^9 unités formant colonie (UFC)/ml immédiatement à proximité de la valve iléo-caecale, avec une prédominance d'organismes à Gram négatif et d'anaérobies. Lors du passage dans le côlon, la concentration bactérienne et la variété de la flore entérique changent radicalement. Des concentrations aussi élevées que 10^{12} UFC/ml peuvent être trouvées ; composé principalement d'anaérobies tels que *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Clostridium*, les bactéries anaérobies dépassant en nombre les bactéries aérobies. À tout niveau donné de l'intestin, la composition de la flore présente également des variations le long de son diamètre, certaines bactéries ayant tendance à adhérer à la surface de la muqueuse tandis que d'autres prédominent dans la lumière. La flore bactérienne entérique normale influe sur diverses fonctions intestinales et joue un rôle clé dans la nutrition, en maintenant l'intégrité de la barrière épithéliale, le développement de

l'immunité muqueuse, la motilité et la sensation intestinales, le métabolisme de l'hôte et même en influençant des phénomènes apparemment lointains comme l'humeur et le comportement. Des perturbations du microbiote ont été décrites en relation avec un large éventail d'organismes humains et animaux. Maladies et troubles ; dans certains cas, cette relation est clairement causale, dans d'autres, la primauté des changements observés (dysbiose) reste à définir. (Ottles, 2013)

6. Les bactéries lactiques comme probiotiques :

6.1 Définition des bactéries lactiques :

Les LAB sont des bactéries à Gram positif, caractérisées par des formes de bacilles cocciennes. Elles sont non sporulées, tolérantes aux acides et produisent de l'acide lactique. Ceux-ci comprennent *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* LA1, *Lactobacillus gasseri*, entre autres. (Varela-Pérez et al., 2022)

6.2 Le processus de fermentation :

La fermentation implique l'action d'enzymes et de catalyseurs dérivés de micro-organismes tels que les bactéries, les levures et les moisissures pour la transformation chimique des composés organiques complexes du substrat en composés plus simples, bioactifs, fonctionnels et nutritifs. La fermentation peut être classée, selon la voie biochimique principale, en quatre catégories de base : fermentation alcoolique, lactique, acétique et alcaline. (Varela-Pérez et al., 2022)

Tableau 6: les voies de fermentation lactique (Mannaa, Han, Seo, & Park, 2021)

Le type de fermentation	Le mécanisme	L'espèce
Fermentation acétique	Convertit les sucres en acide acétique	Acétobacter
Fermentation lactique	Convertit les sucres en acide lactique (voie homofermentaire) et parfois avec d'autres en faible concentration CO ₂ , acides organiques, éthanol. (voie hétérofermentaire)	Lactobacilles et streptocoques

Fermentation alcoolique	Convertit les sucres en éthanol et en CO ₂	Levures et moisissures
Fermentation alcaline	Convertit les protéines en acides aminés et en ammoniacale.	Bacillus et staphylocoques

6.3 La fermentation lactique :

Les bactéries lactiques (LAB) sont des micro-organismes à Gram positif connus comme les principaux producteurs industriels sûrs d'acide lactique (LA). LA est produite par voie de glycolyse dans des conditions anaérobies, et ce composé peut être produit à partir des voies métaboliques des hexoses et des pentoses LAB, comme indiqué sur la figure 1. Le rendement et la productivité de la production de LA dépendent du pH (3,5 à 9,6), de la température (5 à 45 °C), la présence de nutriments (tels que les acides aminés, les peptides, les nucléotides et les vitamines) et les producteurs de souches LAB utilisées (jusqu'à présent, on a utilisé des souches appartenant aux genres *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Oenococcus* et *Weissella*)

LAB peut être divisé en 2 groupes basés sur la fermentation du glucose en LAB homo et hétérofermentaire. Les LAB homofermentaires convertissent les sucres presque quantitativement en acide lactique. Le deuxième groupe de LAB hétérofermentaires produit non seulement de l'acide lactique, mais aussi de l'éthanol/acide Acétique et du dioxyde de carbone. (Varela-Pérez et al., 2022)

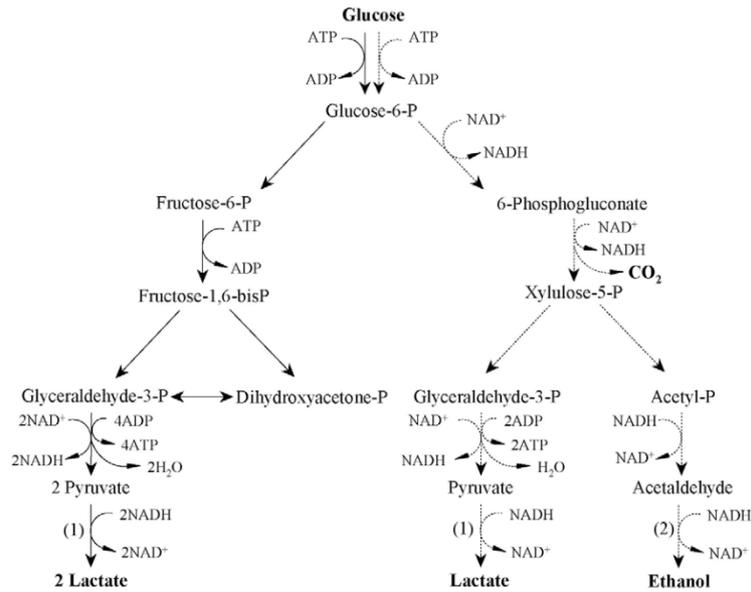


Figure 2 : voie métabolique des bactéries lactique homofermentaires (ligne continue) et hétérofermentaires (ligne pointillée)(Wee, Kim, & Ryu, 2006)

6.4 Quelques propriétés technologiques et nutritionnelles des bactéries lactiques : (Otlés, 2013)

Tableau 7: quelques propriétés technologiques et nritionnelles des bactéries lactiques

Avantages	Fonctionnalités
Conservation des aliments	Production des bactériocines, modification du pH , production du peroxyde d’oxygène ...
Organoleptique	Formation des exopolysaccharides, des acides organiques, des molécules aromatiques, production d’enzymes bénéfiques.
Technologique	Résistance aux bactériophages, viabilité aux cours de transformation, prévention du phénomène over acidification...
Nutritionnel	Production de macro et micronutriments, digestion des sucres, réduction des toxiques et des anti-nutriments, sécrétion de galactase et lactase, réduction de la production des aminés biogènes

7. Les facteurs influencent sur les probiotiques (du processus jusqu'à la consommation) : (Pejcz, 2024)

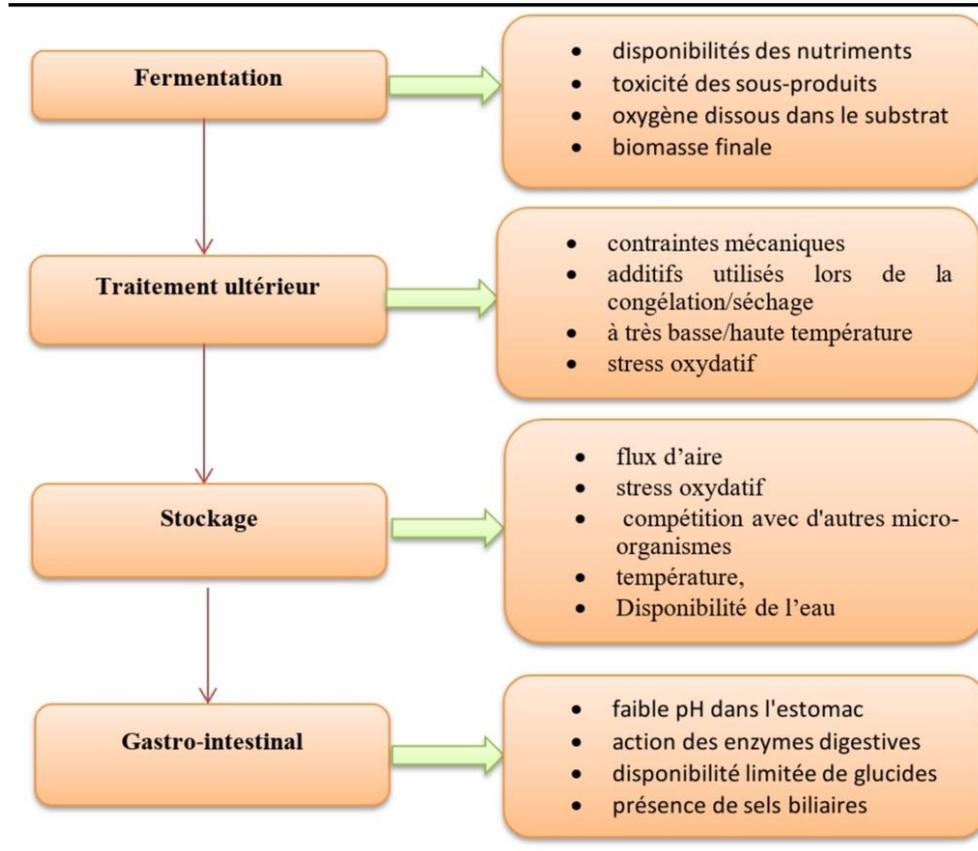


Figure 3 : les facteurs influencent sur les probiotiques

8. Les prébiotiques :

Les prébiotiques sont principalement des fibres qui sont des ingrédients alimentaires non digestibles et qui ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité de certains genres de micro-organismes dans le côlon, généralement des lactobacilles et des Bifidobactéries. Un prébiotique idéal devrait être 1) Résistant aux actions des acides de l'estomac, des sels biliaires et d'autres enzymes hydrolysant dans l'intestin. 2) Ne doit pas être absorbé dans le tractus gastro-intestinal supérieur. 3) Être facilement (Pandey, Naik, & Vakil, 2015)

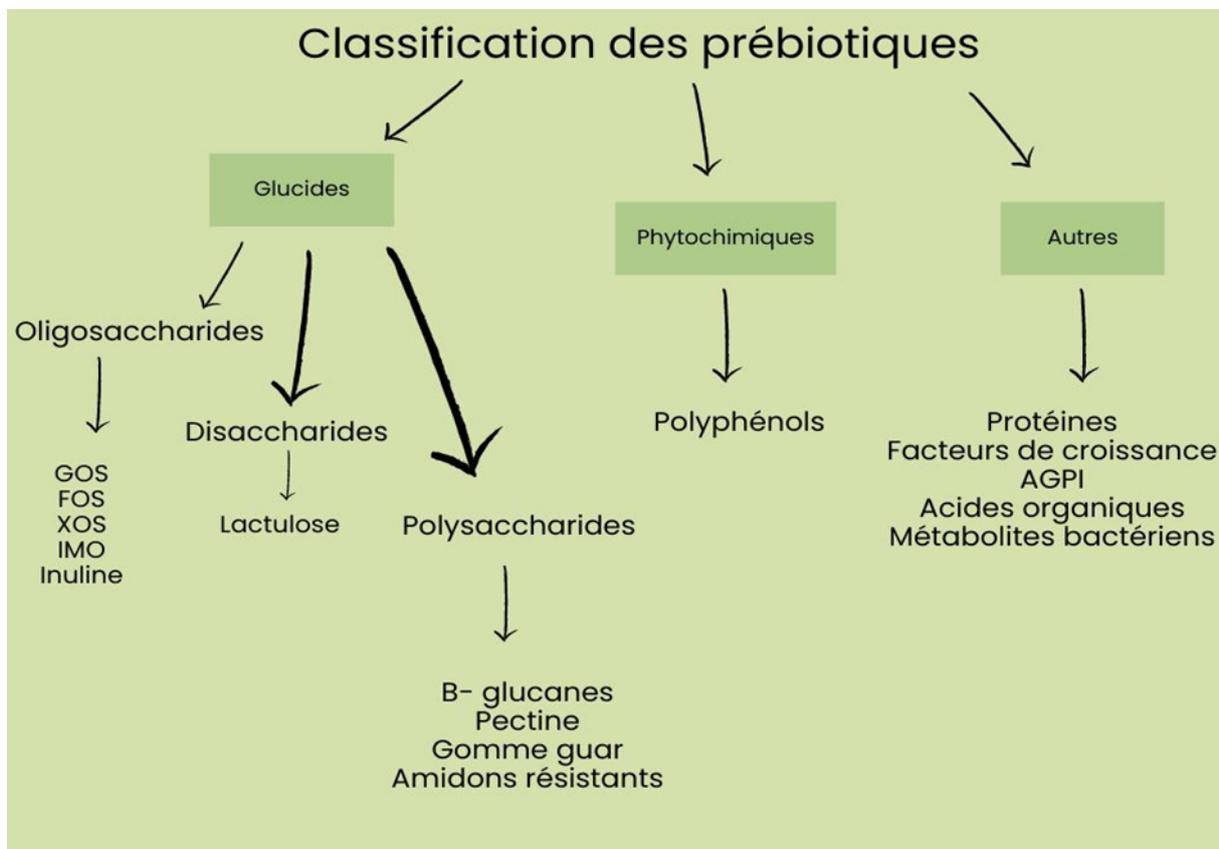


Figure 4 : types de probiotiques(Pandey et al., 2015)

8.1 Les bienfaits rapportés des prébiotiques :

Les prébiotiques comme l'inuline et la pectine présentent plusieurs avantages pour la santé, comme la réduction de la prévalence et de la durée de la diarrhée, le soulagement de l'inflammation et d'autres symptômes associés aux troubles intestinaux et des effets protecteurs pour prévenir le cancer du côlon. Ils sont également impliqués dans l'amélioration de la biodisponibilité et de l'absorption des minéraux, dans la réduction de certains facteurs de risque

de maladies cardiovasculaires et dans la promotion de la satiété et de la perte de poids, prévenant ainsi l'obésité (Pandey et al., 2015)

9. Les symbiotiques :

Lorsque Gibson a introduit le concept de prébiotiques, il a spéculé sur les avantages supplémentaires si les prébiotiques étaient combinés avec des probiotiques pour former ce qu'il a appelé des symbiotiques. Un produit symbiotique affecte de manière bénéfique l'hôte en améliorant la survie et l'implantation de compléments alimentaires microbiens vivants dans le tractus gastro-intestinal en stimulant sélectivement la croissance et/ou en activant le métabolisme d'une ou d'un nombre limité de bactéries bénéfiques pour la santé. Étant donné que le mot « symbiotiques » fait allusion à une synergie, ce terme devrait être réservé aux produits dans lesquels le ou les composés prébiotiques favorisent sélectivement le ou les organismes probiotiques. (Pandey et al., 2015)

10. L'intérêt de la combinaison entre un probiotiques et un prébiotiques (symbiotique) :

Les symbiotiques ont été développés pour surmonter d'éventuelles difficultés de survie des probiotiques. Il semble que la justification de l'utilisation de symbiotiques repose sur des observations montrant l'amélioration de la survie des bactéries probiotiques lors de leur passage dans le tractus intestinal supérieur. Une implantation plus efficace dans le côlon ainsi qu'un effet stimulant de la croissance des probiotiques et des bactéries omniprésentes contribuent au maintien de l'homéostasie intestinale et d'un organisme sain. (Pandey et al., 2015)

CHAPITRE III : l'encapsulation

Introduction :

L'encapsulation implique le piégeage d'une Substance active dans une autre substance agissant comme matériau de revêtement. La technologie d'encapsulation est couramment utilisée par l'industrie alimentaire pour la conservation et la fourniture d'arômes, de colorants, de Stabilisants, d'antioxydants, d'enzymes, de probiotiques, de lipides, de Sels minéraux et de vitamines. Pour les probiotiques, l'encapsulation protège les micro-organismes contre les stress environnementaux. Plus précisément, les microcapsules Créent un environnement anaérobie propice à la croissance de Probiotiques et offrent une protection contre les Environnements difficiles, notamment les jus de fruits acides, La congélation et les conditions gastriques, atténuant ainsi Les lésions cellulaires .La survie des probiotiques Dans les produits alimentaires est particulièrement intéressante étant donné que des proportions importantes De cellules se détériorent pendant la transformation et le stockage. Selon la Fédération internationale du lait, les Concentrations minimales de probiotiques devraient être de 10^6 107CFU/ml à la fin de la durée de conservation du produit. Les avantages de l'incorporation de probiotiques dans les aliments pour la santé sont nombreuses et comprennent par exemple la biodisponibilité des macro et micronutriments, l'activité antioxydante et la production de composés antimicrobiens.(Tanganurat, 2020)

1. Définition de l'encapsulation :

La micro encapsulation est définie comme la « technologie consistant à emballer des substances solides, liquides ou gazeuses dans des capsules miniatures scellées qui peuvent les libérer à des taux contrôlés sous l'influence de conditions spécifiques » Dans le processus d'encapsulation, de petites quantités de matériaux de base contenant des nutriments/composés thérapeutiques sont encapsulées dans le matériau de la paroi pour former des capsules. La micro encapsulation est un moyen efficace de protéger les composés bioactifs comme les probiotiques des conditions de transformation, de température, de transport et pendant le transit intestinal. (Kavitake, Kandasamy, Devi, & Shetty, 2018)

2. Les techniques d'encapsulation les plus courantes, leurs avantages et leurs désavantages_: (Koh, Lim, Tan, Kobun, & Rasti, 2022)

Tableau 8: les techniques d'encapsulation les plus courantes, leurs avantages et leurs désavantages

Méthodes	Propriétés de l'encapsulation	Avantages	Désavantages
Extrusion (gélification ionique externe)	Produit des capsules d'une taille de 100 µm à 3 mm. Peut encapsuler des composés hydrophiles et hydrophobes/lipophiles	Monodispersité. Processus simple et doux. Peut être effectué dans des conditions aérobies et anaérobies Faible coût d'exploitation. Taux de survie élevé des probiotiques.	Produit des perles relativement grosses. Processus de solidification lent. Ne convient pas à la production de masse. Un processus de séchage supplémentaire est nécessaire
Émulsion (gélification ionique interne)	Produit des capsules d'une taille de 200 nm à 1 mm Peut encapsuler des composés hydrophiles et hydrophobes.	Processus simple. Produit des perles relativement petites. Convient à la production de masse. Taux de survie élevé des bactéries	Polydispersité. Coût d'exploitation élevé. Les émulsions conventionnelles sont thermodynamiquement instables. Ne convient pas aux matrices alimentaires faibles en gras. Un processus de séchage supplémentaire est nécessaire

Coacervation (complète la coacervation)	produit des capsules d'une taille de 1 µm à 1 mm.	Processus simple et doux. Convient à l'industrie alimentaire.	Coût opérationnel élevé. Ne convient pas à la masse
---	---	---	--

CHAPITRE III : l'encapsulation

	Encapsule les composés hydrophobes	Haute efficacité d'encapsulation. Potentiel de libération contrôlée	production Les protéines d'origine animale sont couramment utilisés. Stable uniquement à un pH, une force ionique et une plage de température étroite
Séchage par pulvérisation	Produit des capsules d'une taille de 5 à 150 µm. Encapsule des composés hydrophiles et hydrophobes.	Manodispersité. Processus rapide et continu Faible coût d'exploitation. Convient à la production de masse. Produit des perles sèches avec une faible densité apparente, une activité de l'eau et une stabilité élevée	Faible viabilité cellulaire. Produit des perles avec un faible uniformité Les biomatériaux utilisés doivent
Lyophilisation	Produit des capsules de 1 à 1,5 mm. Encapsule les composés hydrophiles et hydrophobes/lipophiles	Convient aux probiotiques sensibles à la température. Le produit final séché convient à la plupart des applications alimentaires	Coût d'exploitation élevé. Ne convient pas à la production de masse. Des cryoprotecteurs sont nécessaires.
Refroidissement par pulvérisation	Produit des capsules avec des tailles de composés hydrophobes. 20-200 µm. Encapsule	Monodispersité. Processus rapide, continu et doux. Faible coût d'exploitation Convient pour la masse production prometteuse en	Faible efficacité d'encapsulation. Libération rapide du probiotiques encapsulés Des conditions de stockage particulières peuvent être requis.

CHAPITRE III : l'encapsulation

		libération contrôlée de probiotiques	
Revêtement à lit fluidisé	Produit des capsules de tailles 5-5000 μm . Encapsule hydrophile et composés hydrophobes	Processus léger Faible cout d'opération Convient à la production de masse Peut fournir couches multicouches. Convient à la température probiotiques sensibles	Processus lent Les probiotiques doivent être pré-encapsulé et séché

3. Les biopolymères utilisés dans la technique d'encapsulation, leur nature, leurs avantages et leur désavantages :(Koh et *al.*, 2022)

Tableau 9: Les biopolymères utilisés en encapsulation

Catégorie	Biomatériau	Caractéristiques et avantages	Limites	Remarques
	Alginates	Caractère anionique, non toxique biocompatibilité, biocompostabilité, affinité plafond, caractéristiques d'absorption, caractéristiques antioxydantes, Faible coût. Stable (rétrécit) dans la solution gastrique de l'estomac faiblement acide et se dissout progressivement (bien et bien les probiotiques encapsulés) dans des conditions alcalines dans l'intestin grêle	Sensible au traitement thermique, très poreux, mauvaise stabilité et propriétés barrières.	Technique : extrusion, émulsion. Pourrait former un réseau de gel solide en interagissant avec un matériau cationique (par exemple, le chitosane). Combinaison : pectine, amidon, chitosane.
	Chitosane	Caractère cationique, biodégradabilité non toxique,	Se dégrade facilement dans des conditions de pH faible,	Technique : extrusion, couche par couche (LbL), émulsion Normalement utilisée

CHAPITRE III : l'encapsulation

		<p>bioadhésivité antimicrobienne, antifongique, faible coût, propriétés filmogènes élevées, grande biocompatibilité des probiotiques, résistance aux effets néfastes du chélateur du calcium et de l'agent anti-gélifiant, génèrent des billes solides.</p>	<p>insoluble dans l'eau à pH 5,4. Possède un effet inhibiteur contre les bactéries lactiques.</p>	<p>comme enrobage plutôt que comme capsule. Combinaison : alginate, pectine</p>
	<p>Amidon et dérivés d'amidon</p>	<p>GRAS, abondant, peu coûteux, et biodégradable. fort mais flexible peut produire un gel transparent, incolore, insipide et inodore qui est semi-perméable à l'eau, au dioxyde de carbone et à l'oxygène. Résistant aux enzymes pancréatiques. Possède des</p>	<p>Présente une viscosité élevée en solution</p>	<p>Technique : extrusion, émulsion. Combinaison : alginate</p>

CHAPITRE III : l'encapsulation

		propriétés prébiotiques		
	Cellulose et dérivés de cellulose	Abondant, peu coûteux, biodégradable, biocompatibilité, propriétés de surface réglables à PH=5 mais soluble à pH=6, efficace pour délivrer des probiotiques au côlon.	Impossible de former des billes de gel par technique d'extrusion.	Technique : émulsion, séchage par pulvérisation. Combinaison: alginate, protéine.
	Maltodextrine	Non toxique, fade, au goût fade, abondant, peu coûteux, bonne solubilité, faible viscosité et teneur élevée en solides. Excellente stabilité thermique Propriétés prébiotiques modérées	Faible pouvoir émulsifiant	Technique : séchage par pulvérisation. Combinaison : gomme arabique, caséinate de sodium
	Carraghénane (- carraghénane)	Possède des caractéristiques thermosensibles et thermoréversibles, la libération des probiotiques peut être contrôlée	Les billes de gel produites sont de forme irrégulière, cassante et faible, et leur taux de	Techniques extrusion, émulsion. Se dissout à 80-90 °C Ajout de probiotiques à 40-50 °C. Gélification à température ambiante.

CHAPITRE III : l'encapsulation

		avec la température	libération de probiotiques est beaucoup plus lent que celui des billes d'alginate	Association : protéines de lait, alginate, gomme de caroube (LBG), carboxyméthylcellulose
	Pectine	Caractère anionique, abondant, non toxique, hydrosoluble, biocompatibilité, biodégradabilité, bioadhésivité antimicrobienne, antivirale, bonne gélification. propriétés émulsifiantes, épaississantes et fixatrices d'eau, effet prébiotique	Faible stabilité thermique, mauvaises propriétés mécaniques. Haute solubilité dans l'eau : concentration élevée en saccharose	Technique : séchage par pulvérisation Combinaison : une variété de biomatériaux à base de glucides.
	Gomme xanthane	Caractère anionique, non toxique, biodégradable, biocompatible, excellentes propriétés gélifiantes, hautement soluble dans les deux cols. Excellente	Haute sensibilité à la contamination microbienne, viscosité instable et taux d'hydratation incontrôlable. Les gels produits uniquement à	Technique : pulvérisation et lyophilisation Combinaison : alginate, chitosane, gellane et B-cyclodextrine.

CHAPITRE III : l'encapsulation

		<p>stabilité thermique et acide. Résistant à la digestion gastro-intestinale et à la décomposition enzymatique. Pourrait également agir comme un prébiotique sonore</p>	<p>partir de gomme xanthane sont relativement faibles</p>	
	Gomme de gellane	<p>Caractère anionique, non toxique, biocompatible, biodégradable, soluble dans l'eau et à faible coût. Haute résistance à la chaleur, aux environnements acides et aux dégradations enzymatiques. Gonfle à un pH élevé</p>	<p>Les températures élevées de prise du gel (80-90 °C) provoquent des dommages thermiques aux probiotiques</p>	<p>Techniques Combinaison de gélatine, caséinate de sodium et alginate.</p>
	l'arabe	<p>Caractère anionique, stabilité acide, hautement soluble dans l'eau, amour en viscosité. Présente une</p>	<p>Disponibilité limitée et coût élevé. Ne montre qu'une protection partielle contre l'oxygène</p>	<p>Technique : séchage par pulvérisation Combinaison : maltodextrine, gélatine, isolats de protéines de lactosérum</p>

CHAPITRE III : l'encapsulation

		<p>activité de surface, des capacités moussantes et émulsifiantes.</p> <p>Pourrait empêcher la déshydratation complète des probiotiques pendant le processus de séchage et de stockage</p>		
Protéines d'origine animale	Gélatine	<p>Caractère amphotère, pourrait former des complexes avec des polymères anioniques et produire des têtes de billes à structure solide et imperméables à l'oxygène</p>	Haute solubilité	<p>Technique : extrusion, coacervation complexe, refroidissement par pulvérisation.</p> <p>lyophilisation par séchage par pulvérisation</p> <p>Combinaison : alginate, pectine.</p>
	Protéine de lactosérum	<p>Caractère amphotère, hautement nutritif, haute résistance et stabilité contre la digestion, grandes propriétés, propriétés de gélification</p>		<p>Technique : extrusion.</p> <p>Association : gomme arabique, pectine, maltodextrine</p>

CHAPITRE III : l'encapsulation

		thermique, stabilité, hydratation et propriétés d'émulsification		
	Protéine de lait (caséine)	Caractère amphiphile, euh, abondant, à faible coût, possède d'excellentes propriétés gélifiantes et émulsifiantes, propriétés d'auto-assemblage, incompatibilité, biodégradabilité, produit des billes de gel de différentes tailles (plage de 1 à 1000 um), densité plus élevée et meilleure protection, haute résistance à dénaturation thermique (caséinate de sodium)	Immunogénicité et allergénicité.	Technique : extrusion, émulsification, séchage par pulvérisation, gélification induite par des enzymes. Combinaison : une variété de biomatériaux à base de glucides
Protéines végétales	Protéines issues de végétaux	Caractère amphiphile, biocompatible,	Très instable, agrégat dans les	Technique: électro-filage. électro-pulvérisation.

CHAPITRE III : l'encapsulation

		biodégradable, insoluble dans l'eau, haute résistance au suc gastrique.	solutions aqueuses	Combinaison de séchage par atomisation : sodium caséinate, alginate, pectine
--	--	---	-----------------------	--

4. Rôle de l'encapsulation :

Le processus de microencapsulation est appliqué pour diverses raisons, notamment :

- La protection du noyau contre la dégradation en réduisant la réactivité à son environnement extérieur (par exemple, température, teneur en humidité, oxygène et lumière) ;
- Réduire l'évaporation du matériau de base ;
- Améliorer la manipulation du matériau en modifiant les caractéristiques physiques ;
- Possibilité de modifier Les caractéristiques de libération ;
- Masquer la faveur, la couleur, Goût indésirable du matériau de noyau ;
- Pour obtenir une dispersion uniforme lors de la dilution ;(Rajam & Subramanian, 2022)

5. Les facteurs influencent sur la technique d'encapsulation :(Kavitake et al., 2018)

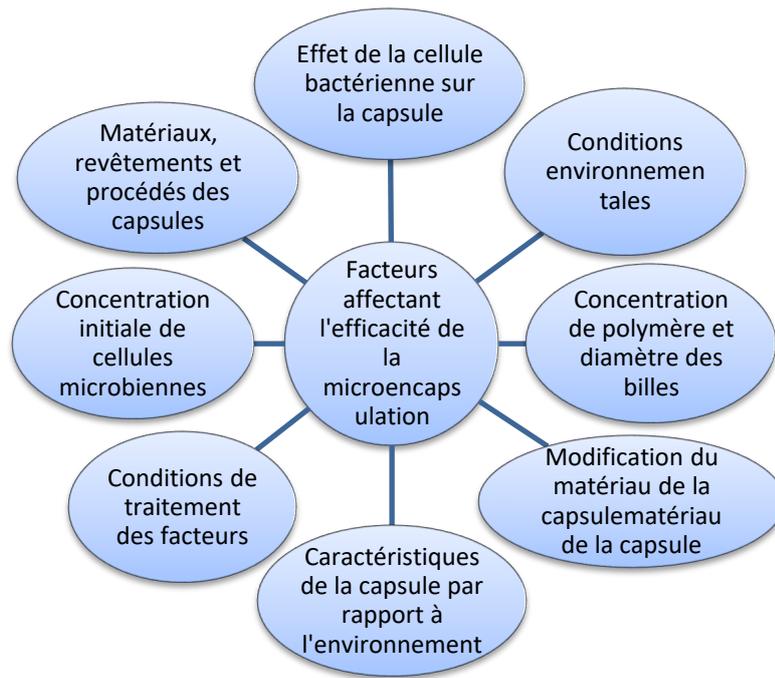


Figure 5: facteurs influents sur la technique d'encapsulation

6. Encapsulation des probiotiques :

La survie des probiotiques dans les produits est affectée par une série de facteurs, notamment le pH, la post-acidification Pendant la fermentation des produits, la production de peroxyde d'hydrogène et les températures de stockage. Fournir aux cellules vivantes Probiotiques une barrière physique contre les conditions défavorables est une approche qui suscite actuellement un intérêt considérable. La technologie d'encapsulation des probiotiques (PET) est un domaine passionnant de la biopharmacie qui a émergé et S'est développé rapidement au cours de la dernière décennie. Grâce à cette technologie, un large éventail de micro-organismes a été immobilisé dans des matériaux semi-perméables et biocompatibles qui modulent la délivrance des cellules. Les termes immobilisation, piégeage et encapsulation ont été utilisés de manière interchangeable dans la plupart des publications. Alors que l'encapsulation est le processus de formation d'un revêtement continu autour d'une matrice interne entièrement contenue dans la paroi de la capsule en tant que noyau de matériau encapsulé, l'immobilisation fait référence au piégeage d'un matériau à l'intérieur ou à travers une matrice. L'encapsulation tend à stabiliser les cellules, améliorant potentiellement leur viabilité et leur stabilité pendant la production, le stockage et la manipulation. Un environnement immobilisé confère également une protection supplémentaire aux cellules probiotiques lors de la Réhydratation. À mesure que la technique d'immobilisation ou de piégeage s'est perfectionnée, la technologie d'immobilisation cellulaire a évolué vers la technologie d'encapsulation cellulaire , que nous appelons ici PET. La meilleure application de la TEP en biopharmacie est la délivrance contrôlée et continue de cellules dans l'intestin. L'avantage potentiel de cette stratégie thérapeutique est de maintenir une plus grande viabilité cellulaire malgré l'acidité de l'estomac. Dans leur état viable, les probiotiques peuvent exercer un effet bénéfique sur la santé de l'hôte.(Gildas K Gbassi & Vandamme, 2012)

7. Intérêt de la micro encapsulation des probiotiques :

Le nombre adéquat de cellules viables, à savoir le niveau « minimum thérapeutique » de probiotiques pour des effets bénéfiques est de 10^6 ufc/ml à 10^8 UFC/ml par jour. Cependant, de nombreux problèmes sont associés à la haute viabilité des probiotiques dans les produits alimentaires. Cela peut être dû à plusieurs facteurs responsables de la diminution de Les critères de sélection de biomatériaux pour encapsulation des probiotiques la viabilité des probiotiques, notamment le pH, la concentration d'acides acétique et lactique, la teneur en oxygène dissous,

le peroxyde d'hydrogène, l'acidité titrable, les espèces et les souches d'organismes associatifs de produits alimentaires fermentés.

La Microencapsulation a été considérée comme une technique efficace et nouvelle pour améliorer la viabilité des probiotiques à la fois dans les produits alimentaires et dans le tractus intestinal, car la survie est essentielle pour les micro-organismes probiotiques ciblés pour peupler l'intestin de l'hôte afin d'apporter des bienfaits pour la santé . (Vivek *et al.*, 2023)

8. Les critères de sélection de biomatériaux pour encapsulation des probiotiques :

Les problèmes impliqués lors de la sélection des biomatériaux pour l'encapsulation des probiotiques sont les suivants :

- Les propriétés physicochimiques (composition chimique, morphologie, résistance mécanique, stabilité dans les liquides gastriques et intestinaux ;
- Les tests toxicologiques ;
- Les processus de fabrication et de stérilisation ;
- La biocompatibilité , la bioassimilation et la biodégradabilité polymère ;(Gildas K Gbassi & Vandamme, 2012)

9. Méthodologies pour tester le comportement gastro-intestinal des bactéries encapsulées et leur libération :

Le processus de digestion peut être étudié à l'aide de méthodes *in vivo* (humaines ou animales) et *in Vitro* (passage par le jus salivaire, gastrique et intestinal dans des conditions simulés du celle du vivant), chacune présentant ses propres avantages et inconvénients. Même si les études *in vivo* peuvent offrir des résultats directs et personnalisés, elles peuvent être coûteuses et nécessiter des considérations éthiques. En revanche, les modèles *in vitro* sont généralement préférés pour leur rapport coût efficacité, leur reproductibilité et leurs conditions standardisées. Cependant, ils peuvent ne pas représenter pleinement la complexité du système digestif humain et ne pas tenir compte de diverses différences et facteurs individuels. Par conséquent, les deux approches peuvent être utiles dans la recherche sur l'alimentation, la nutrition et la médecine. Le processus de digestion peut être mieux étudié en utilisant à la fois des méthodes *in vivo* (humaines ou animales) et *in vitro*, chacune avec ses propres avantages

et inconvénients. Préféré pour leur coût Efficacité Cependant, elles ne représentent peut-être pas entièrement la complexité du système digestif humain et ne peuvent pas tenir compte de diverses différences et facteurs individuels. Par conséquent, les deux approches peuvent être utiles dans L'alimentation, la nutrition et la recherche médicale. (Sun, Yin, He, Cao, & Jiang, 2023)

10. Encapsulation des symbiotiques :

La viabilité des probiotiques peut également être améliorée en les coencapsulant avec d'autres Substances (comme des prébiotiques ou des nutraceutiques). Par exemple, la co-encapsulation de probiotiques avec des prébiotiques (tels que les fructo-oligosaccharides, les galacto-oligosaccharides ou l'inuline) peut améliorer considérablement leur viabilité dans les aliments et dans le tractus gastro-intestinal. Ces « symbiotiques » exercent souvent des effets plus puissants sur la santé que les probiotiques ou les prébiotiques utilisés seuls, présentant ainsi des effets synergiques .Plusieurs systèmes ont été utilisés pour co-encapsuler des probiotiques et/ou des nutraceutiques afin d'améliorer leur activité lorsqu'ils atteignent le côlon.(Gu et al., 2022)

11.La fermentation des jus de fruits par utilisation des probiotiques encapsulées :

Sur le plan sensoriel, les jus de fruits et de légumes sont Rafraîchissants et n'ont généralement pas de goûts ni de saveurs indésirables. Milieu (par exemple, pH, activité de l'eau, stress en oxygène, présence de composés antimicrobiens, colorants, arômes et conservateurs, Ainsi que le processus de production de jus (par exemple, le processus de pasteurisation, la température de stockage, Le type de matériau d'emballage utilisé et les pratiques de manipulation des aliments. Parmi les facteurs, l'état du pH du milieu utilisé a le plus d'effet sur la viabilité des probiotiques. Les jus de fruits ont naturellement une faible valeur de pH, tandis que les jus de légumes sont généralement moins acides. Ont rapporté que les lactobacilles résistent et survivent dans des conditions de pH allant de 3,7 à 4,3 ; cependant, les bifidobactéries sont moins tolérantes à l'acide. .Récemment, des probiotiques encapsulés(*B.animalis*, *B.bifidum*, *E.faecium*, *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.fermentum*, *L.lactis*, *L.plantarum*, *L.sphaericus*et*S.boulevardii*) ont été incorporés dans des jus de fruits et de légumes , tels que Carotte, cerise, raisin, mandarine, mangue, orange, fruit de la passion, ananas, framboise, Sohiong, canne à sucre et jus de tomates (Koh et al., 2022)

Le jus de griotte a une valeur de pH approximative de 3,5, ce qui le rend impropre à l'administration de probiotiques. Une étude a montré que L'encapsulation (technique : extrusion, matériau : alginate de sodium) a augmenté la viabilité d'environ 2 UFC/ml, 25°C pour 21 jours)

En utilisant la technique d'émulsion, des études ont montré que la capacité de survie du jus de raisin probiotiques peut être améliorée. Les deux chercheurs ont encapsulé leurs probiotiques dans des billes d'alginate, tandis que a également encapsulé *B.bifidum* avec κ-κarraghénane. Des résultats similaires ont été observés dans les deux études.

Le jus de canne à sucre est une matrice relativement nouvelle utilisée pour délivrer des probiotiques. Dans l'étude réalisée par Holkemetal, la bactérie probiotiques est encapsulée avec un extrait concentré de protéines de lactosérum, de gomme arabique et de cannelle riche en proanthocyanidines grâce à une technique de coacervation complexe . Les résultats ont montré une augmentation de La capacité de survie des et la rétentions des composés phénoliques et proanthocyaniques dans le jus de canne à sucre.

A également utilisé la technique d'émulsion pour encapsuler des probiotiques (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. sphaericus* et *S. boulardii*) dans des jus (jus de tomates et de carottes), mais avec un enrobage supplémentaire de chitosane sur la couche externe de la capsule d'alginate. Bien que les probiotiques encapsulés aient une viabilité supérieure à celle des probiotiques libres pendant le Stockage réfrigéré (4°C pour 5 à 6 semaines).

Les études dans ce domaine sont en croissance continue dont la majorité des résultats ont montré des résultats positifs qui confirment l'effet protective de l'encapsulation des probiotiques et l'aptitude de leur incorporation dans les jus de fruits pour des buts technologiques (fermentation, conservation ...) ou nutritionnels.

12. Les challenges d'utilisation de la technique d'encapsulation dans le domaine agroalimentaire :

- Développement d'équipements de micro encapsulation ;
- Clarification des procédures de microencapsulation ;
- Choix de matériaux non toxiques pour l'Encapsulation des probiotiques ;

CHAPITRE III : l'encapsulation

- Développement de capsules ou billes à partir de polymères adaptés au pH du tube digestif ;
- Détermination des mécanismes de libération des probiotiques à partir de capsules ou de billes ;
- Réalisation d'études in vitro et in vivo ;
- Évaluation des coûts de microencapsulation. ;
- Tailles de billes ou de capsules ;
- Incorporation de capsules de probiotiques dans la matrice alimentaire sans affecter les caractéristiques organoleptiques des denrées alimentaires ;(**Gildas K Gbassi & Vandamme, 2012**)

Partie expérimentale

1 Objectif du travail :

- Encapsuler les bactéries lactiques pour maintenir leur viabilité et les conserver
- Amélioration des propriétés du jus de grenade
- Maintenir la viabilité des souches inoculées dans le jus de grenade par leur encapsulation

2. Présentation du lieu et durée de travail :

Le travail est réalisé dans le laboratoire de biologie moléculaire université Abdel Hamid Ibn Badis (site ITA) entre février et juin 2024

3. Matériel expérimental :

3.1 Les souches bactériennes utilisées :

3.1.1 Les souches lactiques :

Les souches lactiques utilisées sont isolées , identifiées et expérimentées par **M. BENTAHER Mohammed Cherif** , ces souches sont référentielles et déposées dans le GEN Bank .

Tableau 10: les souches lactiques

Abréviation	Nom de la souche	Code de la souche
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	/
DC01	<i>Levilactobacillus brevis</i>	PP709510
DC04	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	OP003879
TF03	<i>Levilactobacillus brevis</i>	OR856558
TF13	<i>Levilactobacillus brevis</i>	OR857375

3.1.2 Les souches pathogènes :

Tableau 11: les souches pathogènes

Abréviation	Nom de la souche
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

3.1.3 Les milieux de culture :

Milieux liquides : bouillon MRS (De Man, Rogosa et Sharpe), bouillon nutritif

Milieux solides : gélose MRS (De Man, Rogosa et Sharpe), Gélose nutritive GN, gélose MH (Muller Hington)

3.1.4 Produits :

Tampons :

- PBS (Tampon Phosphate Saline)
- Eau physiologique 0,9 % NaCl

Produits chimiques :

- CaCl
- Alginate de sodium
- Citrates de sodium
- Tween 20
- Tween 80

Les huiles et autres :

Huile d'olive (huile traditionnelle fait maison)

Huile de tournesol (huile de table Elio)

Lait écrémé (Candia silhouette)

3.1.5 Appareillage :

- Anse de platine
- Autoclave
- Bain marie
- Balance de précision
- Bec Bunsen
- Centrifugeuse

- Etuve
- Hotte
- Micropipettes
- pH mètre
- Plaque chauffante
- Réfrigérateur
- Spectrophotomètre
- Vortex

3.1.6 Verrerie et autres :

- Bêchers de 20, 80, 250, 500 et 1000 ml
- Boîtes de Pétri en plastique
- Erlenmeyers
- Flacons en verre (180 ml)
- Les embouts
- Pipettes graduées (1 ml, 5 ml, 10 ml...)
- Pipettes Pasteur
- Tubes à essai
- Tubes eppendorfs
- Les flacons Schott (250 ml)
- Eprouvette (10 ml, 50 ml, 100 ml)
- Entonnoir
- Les seringues (5 ml, 10 ml)

3.1.7 Les colorants :

- Violet de gentiane
- Lugol
- safranine

Les méthodes:

1. Revivification des souches :

- Les souches (TF13 , TF3 , DC1 , DC4 , LGG) conservées dans la gélose inclinée à 4°C sontensemencées dans un bouillon MRS et incubées à 37 ° C pendant 24 h .
- Après apparition de trouble un inoculum de chaque souche estensemencé dans une boîte gélose MRS.
- les boîtes sont incubées à 37 ° C pendant 24 h.
- Après apparition des colonies les boites sont récupérées et conservées à 4°C jusqu'à utilisation et analyses.

2. Confirmation de la pureté des souches :

2.1 Examen microscopique :

Les colonies formées sont observées sous- microscope optique pour détecter leur forme

2.2 Test catalase :

-Les bactéries lactiques sont catalase négatif, pour détecter cette propriété :

- Une colonie de chaque souche est mise dans une lame.
- Une goutte de peroxyde d'oxygène H₂O₂ est ajoutée à la colonie.
- L'absence de la formation des bulles d'air (réaction négatif) indique l'absence de l'enzyme catalase.

2.3 Coloration de GRAM :

- Une goutte d'eau est déposée au centre de la lame.
- Une colonie de chaque souche est prélevée, homogénéisé avec la goutte d'eau et étalée sur toute la lame.
- Le frottis est fixé par un passage rapide devant le bec bunsen.
- La lame est ensuite placée dans un support de coloration.
- La lame est recouverte par le violet de gentiane et laissé agir pendant 1 min.
- La lame est lavée à l'eau jusqu'à élimination totale du colorant.
- La lame est recouverte par le Liquide de lugol et laissée pendant 1 minute.
- La lame est rincée à l'eau, égouttée puis décolorée par la solution (alcool / acétone) et laissée agir pendant 10 secondes.
- La lame est lavée encore une fois à l'eau puis recouverte par le colorant safranine et laissée agir pendant 1 min.

- La lame est lavée pour éliminer le colorant puis séchée.
- La lecture se fait au microscope, objectif x100 à immersion.

3. Préparation de la suspension bactérienne :

- Pour chaque utilisation les colonies conservées des souches TF13, TF3, DC1, DC4 et LGG sont ensemencées dans un bouillon MRS et incubées à 37 °C pendant 18 h pour avoir une culture jeune.



Figure 6 : centrifugeuse à 10000 RPM/min à 4°C

- Les cellules bactériennes sont lavées 2 fois au PBS par centrifugation à 10000 RPM / min à 4°C pendant 10 min.
- Le culot est resuspendu dans l'eau physiologique (0.9% Na Cl).
- La DO est ajustée à 0.5 /ml par dilution (ajout d'eau physiologique).

NB : les souches utilisées pour la fermentation du jus de grenade sont adaptées par incubation plusieurs fois dans le même jus et les mêmes conditions physico-chimiques choisies pour la fermentation.

4. Extrusion :

L'extrusion est une technique d'encapsulation qui consiste à ajouter des micro-organismes probiotiques dans un hydrocolloïde d'alginate de sodium, puis à les laisser tomber dans une solution durcissante (CaCl₂) jusqu'à ce que des billes contenant des cellules bactériennes (microcapsules) se forment. Les systèmes de microcapsules ou de billes utilisant divers biopolymères sont très faciles à préparer à l'échelle du laboratoire avec n'importe quel ingrédient encapsulé. L'alginate est en tête parmi d'autres ingrédients en raison de son faible coût, son biodégradabilité, son biocompatibilité, son simplicité et son résistance aux pH acides. (Indrasti & Hidayat, 2019)

4.1 Protocole :

- La suspension bactérienne (DO préalablement ajusté à 0.5 équivalent 10^6 CFU/ ml) en raison d'un ratio de (1 :4) est mélangé avec la solution d'alginate.
- Après homogénéisation totale le mix est extrudé dans des conditions stériles à l'aide d'une seringue dans un bain CaCl 0.1 M froide sous- agitation pour former les capsules.
- Après solidification pendant un moment donné les capsules sont filtrées et lavées 2 fois à l'eau bidistillée par centrifugation 4000 RPM / min à 4°C et stockées dans des flacons stériles contenant l'eau bidistillée.

NB :(Tous les matériaux utilisés dans le protocole sont préalablement autoclavés à 115°C pendant 15 min).

- Les paramètres concentration d'alginate , la vitesse d'agitation , la taille de la seringue , le temps de repos dans le bain CaCl et la température de stockage sont variables selon les conditions expérimentales en vue de déterminer leur influence et d'optimiser le protocole ils sont testés.(Pupa et al., 2021)

4.2 Étude de l'influence de quelques paramètres physicochimiques sur le procédé d'extrusion :

4.2.1 La concentration d'alginate :

Différentes concentrations massiques d'alginate sont testées : 0.2, 1%,1.5% ,2%,2.5%.

4.2.2 La taille de la seringue :

Les seringues de 5 ml et de 10 ml sont utilisées pour extruder le mix à encapsuler

4.2.3 La vitesse d'agitation :

Les vitesses testées sont respectivement : $V= 1.5$, $V= 2$, $V= 2.5$, $V= 3$, $V= 4$.

4.2.4 L`e temps de repos dans la solution CaCl :

les capsules réalisées dans les mêmes conditions expérimentales sont laisser sous- agitation dans le bain CaCl pour des périodes différentes respectivement : 15 min, 25 min, 30 min et 45 min.

4.2.5. La température de conservation :

Les capsules sont lavées puis stockées dans des flacons stériles contenant l'eau bidistillée à deux températures différentes 4°C et -6 °C.

5. Emulsion :

L'émulsion est une pratique chimique largement utilisée pour encapsuler des cellules vivantes à l'aide d'hydrocolloïdes (alginate, carraghénane et pectine) comme matériaux de paroi cellulaire, qui sont généralement récupérés par la technique de filtration membranaire. Contrairement à l'extrusion, une mise à l'échelle plus facile, un taux de survie bactérienne élevé et des capsules de plus petit diamètre (25 µm-2 mm) sont des avantages supplémentaires, tandis que le principal inconvénient est une plage de taille et une forme plus grande et un coût de performance plus élevé dû à l'utilisation de l'émulsion d'huile végétale

Pour la formation des capsules et de débarrasser du résidu huileux à la fin du procédé.(Kavitake *et al.*, 2018)

5.1 Protocole :

- Dans un bécher stérile de la solution autoclavée d'alginate de sodium et le volume de la suspension cellulaire sont transférés.
- Le contenu est mélangé pour une répartition uniforme des cellules dans la matrice d'alginate.
- Cent millilitres d'huile stérilisée contenant l'émulsifiant sont pris dans un bécher stérilisé.
- Le mélange cellulaire d'alginate est ensuite ajouté goutte à goutte à la phase huileuse continue qui est agitée magnétiquement après 5 min et une émulsion uniformément trouble est formée.
- L'émulsion est brisée par addition rapide de chlorure de calcium 2% refroidi et les capsules sont formées par durcissement de gouttelettes d'alginate par des ions calcium
- Les capsules sont récoltées par centrifugation à 4000rpm/min, 10 min à 4 °C
- Les capsules sont lavées deux fois avec une solution de chlorure de calcium 0,1 M et enfin avec de l'eau distillée.
- Les billes ont été séparées par filtration (papier filtre Whatman), transférées dans des flacons stériles et conservées au réfrigérateur jusqu'à utilisation.
- Les paramètres concentration d'alginate , le type de l'huile , le type et la concentration de l'émulsifiant , la vitesse d'agitation , la taille de la seringue , le volume et le temps d'ajout de CaCl et la température de stockage sont variables selon les conditions

expérimentales en vue de déterminer leur influence et d'optimiser le protocole ils sont testés. (Surajit Mandal & Hati, 2017)

5.2 Étude de l'influence de quelques paramètres physicochimiques sur la technique d'émulsion :

5.2.1 Le type de l'huile :

Deux huiles sont utilisées : l'huile de tournesol (huile de table Elio) et l'huile d'olive (huile traditionnelle fait maison).

5.2.2 Le type et la concentration de l'émulsifiant :

Deux types d'émulsifiant sont utilisées : Tween 20 et le Tween 80, les deux sont testés à des concentrations différentes : 0.2%, 2%, 3%.

5.2.3 La concentration d'alginate :

Les concentrations d'alginate testées sont respectivement : 2%, 2.5% ,3% et 4%.

5.2.4 Le volume et le temps d'ajout de CaCl :

Deux volumes différents de CaCl sont testés en raison d'un ratio de (1 :5) et (1 :1) du volume huileux, les deux volumes sont ajoutés aussi en deux temps différents :

Temps 1 : une quantité progressivement au moment de l'émulsion et la quantité restante juste avant la fin de la technique.

Temps 2 : les même deux volumes sont ajoutés seulement à la fin de l'émulsion.

5.2.5 La vitesse d'agitation :

Des vitesses de :V= 1.2, V= 1.5, V= 2, V= 3 respectivement sont testées.

5.2.6 La taille de la seringue :

les seringues de 5 ml et de 10 ml sont utilisées pour l'émulsion.

6. L'étude de l'effet d'administration de capsules de probiotiques chez le poulet (test in Vivo) :

En raison de la difficulté de se débarrasser totalement de l'huile dans la technique d'émulsion la technique d'extrusion est choisie pour le reste de la recherche et les paramètres physico-chimiques sont choisis et fixés selon les meilleurs résultats donnés par les tests précédents.

trois souches TF3, DC4 et LGG sont choisis pour l'encapsulation + le contrôle (NaCl 0.9%).

Les capsules sont préparées selon la méthode suivante :

- La densité optique de la suspension bactérienne des trois souches est ajustée à 0.5/ ml (équivalent de 10^6 CFU / ml).
 - Dans des béchers stériles Le volume de chaque souche (l'eau physiologique 0.9% pour le contrôle) est mélangé dans des conditions stériles avec la solution autoclavée d'alginate 2.5% en raison d'un ratio (1 :4) .
 - Après homogénéisation le mix est extrudé dans un bain CaCl 2% avec une seringue de 5 ml et laissé sous-agitation $V=2$ pendant 25 min.
 - les capsules sont récupérées par filtration sur papier Whatman et lavées deux fois par l'eau distillée par centrifugation 4000 RPM / min à 4° C pendant 10 min.
 - les capsules lavées sont récupérées et stockées dans des flacons stériles contenant l'eau bidistillée à 4 ° C jusqu'à utilisation et analyses.
- Lot 1: 4 flacons TF3.
 - Lot 2: 4 flacons DC4.
 - Lot 3 : 4 flacons LGG.
 - Lot 4 : 4 flacons contrôle (capsules vides).

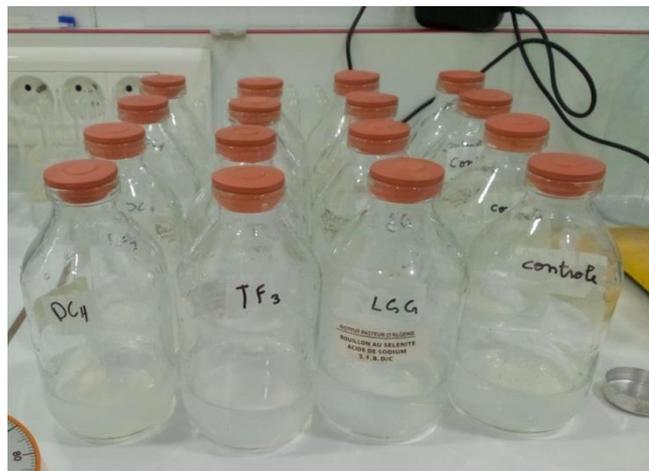


Figure 7 : les flacons des capsules

- Au cours de la durée d'administration de capsules de probiotiques chez le poulet l'indice de consommation et l'évolution du poids sont choisis comme paramètre de suivie de l'effet des probiotiques en comparaison avec le régime standard (le contrôle : des Capsules vides) .

7. Encapsulation du jus de grenade + bactéries :

- Les mêmes étapes décrites avant sont suivies dont le ratio de la souche encapsulée (TF13, TF3, DC4, DC1, LGG) et le jus de grenade était (1 :1).
- Les capsules après lavage sont conservées directement au réfrigérateur à 4°C jusqu'à analyse.



Figure 8 : encapsulation du jus de grenade et des bactéries

8. Test de conservation des capsules :

Les capsules des trois souches (TF3,DC4,LGG)et les capsules jus de grenade + souches lactiques conservées à 4 °C sont récupérées au jour de l'encapsulation et après 35 jours pour déterminer respectivement le nombre initiale N_0 et le nombre de bactéries après la durée de conservation afin d'évaluer leur taux de viabilité. Pour faire le dénombrement les capsules sont décapsulées.

- Dans des tubes stériles 1 g de capsules est ajouté à 9 ml de la solution stérile de citrate de sodium 2%.le contenu est homogénéisé et laissé pendant 10 min.
- Après décapsulation totale des dilutions décimales jusqu'à 10^{-4} sont réalisées ,0.1 ml de chaque dilution est étalée par râteau sur boîte gélose MRS. les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 48 h.
- Après apparition de colonies, les boîtes qui ont un nombre entre 30 et 300 sont utilisées pour le dénombrement.
- Le taux de viabilité est calculé selon l'équation suivante : % de viabilité = $N/N_0 \times 100$.(Jeznienė, Bružaitė, & Šipailienė, 2024)

9. Test de résistance des capsules au pH acide :

Le taux de survie des bactéries probiotiques après passage au jus gastrique (pH très acide) est un facteur clé offrant au microorganisme l'opportunité d'atteindre le côlon pour se multiplier et d'exercer et de révéler son effet bénéfique. Selon la littérature, l'encapsulation permet d'augmenter le taux de survie des bactéries dans l'estomac en agissant comme une barrière mécanique protectrice d'acidité.

Afin de déterminer le rôle du procédé d'encapsulation sur la protection des bactéries probiotiques, les capsules sont testées sur un jus gastrique simulé.

- Dans des tubes stériles 1 g de capsules de chaque souche encapsulée (TF3, TF13, DC4, DC1, LGG) est ajouté un tube contenant 5 ml du jus gastrique (0.13% pepsine,)
- Les capsules sont décapsulées selon la méthode décrite avant. À To avant incubation pour déterminer le nombre initiale N_0 de chaque souche encapsulée, des dilutions décimales sont réalisées jusqu'à 10^{-4}
- Après vortexage les tubes contenant 1g de capsules sont incubés à 37°C pendant 3 h.
- Après 3 h les tubes sont récupérées, les capsules sont décapsulées selon la même méthode et des dilutions décimales sont réalisées jusqu'à 10^{-4} .
- Chaque dilution est étalée dans une boîte gélose MRS, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48 h.
- Après apparition des colonies les boîtes sont récupérées, les boîtes qui ont un nombre entre 30 et 300 sont utilisées pour le dénombrement.
- le taux de survie est calculée selon l'équation suivante : $N/N_0 \times 100$.(Afzaal, Saeed, Hussain, et al., 2020)

10. Test d'acidification :

Les bactéries lactiques ne peuvent pas résister à des intervalles de pH très acides qui sont inférieurs à 3.5. Puisque le jus de grenade est de nature acide le choix d'agent fermentaire est limité par le pouvoir acidifiant, la souche qui ne possède pas un fort pouvoir acidifiant est appropriée pour sa fermentation pour limiter la diminution du pH et augmenter le taux de viabilité lors de la conservation.

- Dans des flacons stériles contenant 100 ml de lait écrémé, 2% des souches (TF13, TF3, DC4, DC1, LGG) est ajoutée.
- Le mix est homogénéisé puis incubé à 37°C pendant 48 h.
- Le pH est mesuré à 0h, 2 h, 4 h, 6 h et 48 h.(Bouchibane et al., 2023)

11. Fermentation du jus de grenade :

11.1 Préparation de la suspension bactérienne :

- Les colonies conservées des souches TF13, TF3, DC1, DC4 et LGG sont ensemencées dans un bouillon MRS et incubées à 37 °C pendant 18 h pour avoir une culture jeune.
- Les cellules bactériennes sont lavées 2 fois au PBS par centrifugation à 10000 RPM / min à 4°C pendant 10 min.
- Le culot est resuspendu dans l'eau physiologique (0.9% NaCl).
- La DO est ajustée à 0.5 /ml par dilution (ajout d'eau physiologique).

11.2 Encapsulation des souches par extrusion :

Les mêmes étapes décrites avant sont suivies.

12. Fermentation du jus de grenade par les bactéries libres :

- Dans des flacons stériles contenant 100 ml du jus , un volume de 10 ml des suspension bactérienne : TF13 , TF3, DC4 , DC1 , LGG (DO= 0.5 équivalent de $\sim 10^6$ CFU/ ml) est ajouté .
- Après homogénéisation, les flacons sont incubés à 37°C pendant 24 h.
- Après 24 h les flacons sont récupérés et conservés à 4°C jusqu'à utilisation et analyses.(Z. E. Mousavi et *al.*, 2013)



Figure 8 : des tubes du jus de grenade fermenté par les bactéries libres.

13. Fermentation de jus de grenade par les bactéries encapsulées :

- Dans des flacons stériles contenant 100 ml du jus, un volume de 10 ml de souches déjà encapsulées (TF13, TF3, DC4, DC1, LGG) est ajouté.
- Après homogénéisation, les flacons sont incubés à 37°C pendant 24 h.
- Après 24 h les flacons sont récupérés et conservés à 4°C jusqu'à utilisation et analyses.
(Tanganurat, 2020)



Figure 9 : jus de grenade fermenté par les bactéries encapsulées

14. Analyses physico-chimiques de jus de grenade avant et après fermentation :

Mesure du pH : le pH est mesuré par pH mètre avant la fermentation, après 24 h et après 3 semaines de fermentation.

Mesure du degré Brix : le degré Brix est mesuré à l'aide d'un réfractomètre.

Dosage des sucres par la méthode de Bertrand :

Dans un erlenmeyer, 10 ml de fehling A, 10 ml de fehling B et 30 ml d'eau distillée sont mélangées et portés à l'ébullition.

Le mix est titré par solution standard de glucose 5% puis par le jus de grenade jusqu'à disparition totale de la couleur bleu et observation du précipité rouge cuivreux.

Le taux de sucres réducteurs est calculé selon l'équation suivante : $R = \frac{V_o}{V} \times F$ (N_o : volume versé de la solution du glucose , V : volume de jus de grenade versé, F : facteur de dilution)
(Navarre, 1974)

15. Viabilité des souches après 21 jours (3 semaines) :

À partir du jus de grenade fermenté par les bactéries libres, des dilutions décimales jusqu'à 10^{-4} sont réalisées et un volume de 0.1 ml est étalé dans une gélose MRS pour le dénombrement, les boîtes sont incubées à 37 ° C pendant 48 h.

À partir du jus de grenade fermenté par les souches encapsulées, les capsules sont récupérées et décapsulées, des dilutions décimales jusqu'à 10^{-4} sont réalisées et un volume de 0.1 ml est étalé dans une gélose MRS pour le dénombrement, les boîtes sont incubées à 37 ° C pendant 48 h.

16. Mesure de l'activité antimicrobienne :

- À fin de confirmer le rôle de la fermentation sur l'amélioration des propriétés antimicrobiennes du jus de grenade : le jus de grenade naturel (contrôle) , le jus fermenté par les bactéries libres, le jus fermenté par les capsules de bactéries et le surnageant de la souche bactérienne d' une culture over night sont utilisées dans le test.
- L'activité antimicrobienne du jus avant et après fermentation est mesurée selon la méthode de diffusion en puits.
- Une colonie de la souche indicatrice (*E. coli*, *S.aureus*) est mise dans des tubes stériles contenant 9 ml d'eau physiologique et la densité optique est ajustée par dilution à 0.1.
- Dans des boîtes gélose Müller-hington la souche indicatrice estensemencée.
- Après 10 min des puits selon le nombre des échantillons sont réalisés dans les boîtes à l'aide du bout de la pipette pasteur.
- Chaque puits est rempli par 0.1 ml d'échantillon, le jus de grenade sans fermentation est utilisé comme contrôle.
- Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h.
- Après 24 h les boîtes sont récupérées pour mesurer le diamètre de la zone d'inhibition..
.(Bouchibane et al., 2023)

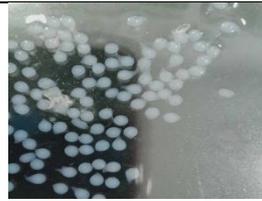
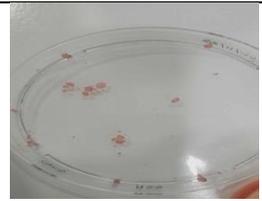
RESULTATS ET DISCUSSION

1. Concentration d'alginate:

Tableau 12: observations selon les concentrations d'alginate

Concentration d'alginate / observation	0.2%	1%	1.5%	2%	2.5%
M	Réaction échouée (Dissolution des gouttelettes)	Capsules très fragiles	Capsules moins résistantes	Capsules résistantes et régulières	Capsules de taille uniforme et résistantes
Concentration d'alginate / observation	2%	2.5%	3%	4%	
Émulsion	Réaction Echouée (Dissolution et éclatement des capsules)	Réaction échouée (Dissolution et éclatement des capsules)	Capsules résistantes et uniformes	Capsules résistantes et uniformes	

Tableau 13: des résultats d'encapsulation à plusieurs pourcentages

Alginate encapsulation émulsion	2% par	Alginate encapsulation émulsion	3% par	Alginate encapsulation extrusion	4% par	Alginate encapsulation émulsion colorant (rouge de Congo)	2.5% par
							

À des concentrations d'alginate (0.2 , 1 et 1.5%) la réaction de gélification n'a pas réussi suite à la formation de capsules fragiles , très poreuses et irrégulières, par contre à des concentrations d'alginate (2% et 2.5%) la réaction de gélification a réussi , les capsules formées étaient résistantes , uniformes et moins poreuses .

L'alginate est constitué par deux polymères D- acide mannuronique et L-acide guluronique liés par des liaisons glycosidiques .Selon la littérature c'est l'acide guluronique qui forme le gel résistant en raison de sa forte affinité pour les actions divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} ,...), une alginate riche en bloc G favorise la formation de capsules moins poreuses et plus résistantes.

Des concentrations d'alginate <2% peut résulter la formation de capsules non- sphériques et fragiles, cela est due probablement au nombre insuffisant de groupes carboxylique pour le processus de gélification.

Dans une étude scientifique (**Łętocha, Miastkowska, & Sikora, 2022**) suite à l'utilisation d'alginate à une concentration de 1% une formation de capsules tes fragiles et non sphériques a été remarquée .

Pour la technique d'émulsion à des concentrations d'alginate : 2%, 2.5% la réaction de gélification n'a pas réussi, par contre à des concentrations d'alginate : 3% et 4% la réaction a réussi.

Dans une étude menée par(**S Mandal, Puniya, & Singh, 2006**)des concentrations d'alginate de 2% à 4% sont testées dont une augmentation de la concentration montre en parallèle une augmentation de la résistance des capsules aux conditions défavorables offrant une grande protection des probiotiques encapsulés.

Une viscosité élevée de la solution d'alginate est recommandée dans la technique d'émulsion pour assurer la bonne dispersion des gouttelettes extrudées dans l'huile , la taille uniforme des capsules et leur résistance, cette viscosité peut être obtenue par des concentrations d'alginate > 3%.(**Tønnesen & Karlsen, 2002**),(**Wyreńska, Szuster, & Stawska, 2014**)

1. Vitesse d'agitation:

Tableau 14: la vitesse d'agitation (extrusion, émulsion)

Vitesse/observation	1,5	2	2,5	3	4
Extrusion	Capsules irrégulières	Capsules régulières et uniformes	Capsules régulières et uniformes	Réaction non réussite	Réaction non réussite

Vitesse/observation	1,2	1,5	2	3
Emulsion	Réaction réussite	Réaction échouée	Réaction échouée	Réaction échouée

À des vitesses de : 1.5, 2, 3, 4 la technique d'extrusion n'a pas réussi car les capsules formées sont irrégulières et ne possèdent pas une taille uniforme tandis que à des vitesses de : 2 et 2.5 la réaction a réussi, les capsules formées sont régulières et uniformes.

Pour la technique d'émulsion la réaction n'a pas réussi à des vitesses de : 1.5, 2 et 3 tandis que elle a réussi pour une vitesse s'égale à 1.2.

La variation de la vitesse d'agitation joue un rôle déterminant dans la taille et la morphologie des capsules produites : une vitesse d'agitation faible (insuffisante) entraîne une distribution large en raison de la coalescence irrégulière des gouttelettes.

Une vitesse d'agitation élevée augmente l'énergie cinétique de la réaction créant des forces de cisaillement plus importantes qui fragmentent les gouttelettes extrudées en plus petites unités, résultant avec le taux de refroidissement rapide une réduction de la taille, une rugosité de la surface, une distribution non homogène de la matière encapsulée et sa libération dans la solution CaCl lors de l'agitation.

Une vitesse d'agitation modérée et adéquate offre aux gouttelettes extrudées le temps pour fusionner et d'atteindre leur forme sphérique avec une surface lisse grâce a la fragmentation

homogène, la réduction de perturbation et la configuration d'énergie minimale. (Tønnesen & Karlsen, 2002)

La vitesse d'agitation optimale ne varie pas selon l'équipement et les matériaux utilisés mais aussi avec le changement de la technique d'encapsulation. Dans le cas de la technique d'émulsion la vitesse d'agitation recommandée est faible pour permettre le bon contact avec l'huile, la réduction de la turbidité et donne le temps aux gouttelettes de se solidifier car les liaisons dans un milieu visqueux s'établit lentement offrant aussi aux gouttelettes une configuration homogène et un revêtement complet avant solidification. (Perumal, 2001), (Ahmed, Abd El-Rasoul, Auda, & Ibrahim, 2013)

2. Taille de la seringue:

Tableau 15: taille de capsules observée

Taille de la seringue/ observation	5 ml	10 ml
Extrusion	Taille de capsules <1500 um	Taille de capsules >2000 um
Émulsion	Capsules de taille <500 um	Capsules de taille >800um

Les capsules obtenues par la technique d'extrusion sont à l'ordre de 1500 um en moyenne lors d'utilisation de la seringue de 5 ml et de 2000 um en moyenne lors d'utilisation de la seringue de 10 ml.

Les capsules obtenues par la technique d'émulsion sont plus petites que celle obtenues par extrusion, leurs tailles en moyenne est de 500 um lors d'utilisation de la seringue de 5 ml et de 800 um lors d'utilisation de la seringue de 10 ml.

La taille de l'extrémité change avec la taille de la seringue, une extrémité plus petite produit des gouttelettes plus petites (par conséquence la taille des capsules formées se diminue).

La taille des capsules peut changer suivant les mêmes conditions expérimentales en changeant la technique d'encapsulation, par exemple une augmentation de la viscosité de solution dont les gouttelettes sont extrudées résulte une réduction de la taille des capsules en raison d'un changement de la tension de la surface de la capsule. (Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2003),

3. Temps d’agitation dans la solution CaCl :

Tableau 16: observation des capsules

Temps de repos	10 min	25 min	30 min	50 min
Observation	Capsules fragiles	Capsules résistantes	Capsules résistantes	Capsules plus résistantes

Une Fragilité des capsules est observée pour un temps de 10 min d’agitation dans la solution CaCl, les capsules obtenues était très fragiles , s’éclatent facilement et même irrégulières . Un temps d’agitation de 25 min et de 30 min résulte la formation des capsules résistantes aux pressions mécaniques et régulières, tandis qu’un temps de 50 min a résulté un durcissement des capsules posant problème de la forte résistance et de faible libération.

Le phénomène de solidification des gouttelettes extrudées dans la solution CaCl est appelé le cross – linking : un temps très court <15 min sous agitation dans la solution CaCl cause un cross- linking incomplet des blocks G et Ca²⁺ et résulte la formation des capsules très poreuses et fragiles.(Choukaife, Doolaanea, & Alfatama, 2020)

Un temps trop long>40 min cause une forte solidarité et un durcissement des capsules, cela peut être dû à la formation continue des liaisons ioniques. Nos résultats sont en contradiction avec les résultats de(Lin et al., 2016)qui a trouvé qu’un prolongement de temps plus de 20 min n’a aucun effet sur les capsules .(Rahman et al., 2006),(Gedam, Jadhav, Talele, & Jadhav, 2018)

4. Température de la conservation :

Tableau 17: température de conservation

Température de la conservation	4°C	-6
Observation	Capsules intactes	Capsules endommagées

Les capsules conservées à la température de réfrigération 4°C sont restés intactes sans aucune modification remarquable après une durée de conservation de 35 jours , tandis que les capsules conservées à une température de congélation -6°C étaient endommagées , éclatées et le liquide encapsulé est libéré dans la solution de conservation .

À 6°C, la phase de la matière encapsulée change de l'état liquide vers le solide ce qui induit la formation des cristaux de glaces, ces derniers occupent plus d'espace et traverse la structure des parois de la capsule provoquant la rupture de réseau formé par gélification et l'éclatement de la capsule (endommagement).

À 4 ° C, la matrice à l'intérieur des capsules conserve son état physique (liquide) en même temps les réactions métaboliques sont presque totalement interrompues assurant leur conservation adéquate pendant une bonne durée.(**Pramanik, Venkatraman, & Vaidyanathan, 2023**),(**Yang et al., 2024**)

5. Type de l'huile :

Tableau 18: type de l'huile

Type de l'huile	L'huile d'olive	L'huile de tournesol
Observation	Réaction échouée (dissolution et éclatement des gouttelettes avant solidification)	Réaction réussite

Des capsules fragiles, irrégulières et collantes sont obtenues lors d'utilisation de l'huile d'olive pour l'émulsion, cette huile n'a pas donné un bon résultat à la fin de la réaction.

Des capsules régulières et résistantes sont obtenues lors d'utilisation de l'huile de tournesol ,Cette huile était performante par rapport à l'huile d'olive et peut être choisie comme phase huileuse pour la technique d'émulsion .

La composition de l'huile , son pH , sa viscosité et sa densité affecte directement la réussite de la technique d'émulsion .dans une étude menée par (**Wang, Ma, & Su, 2005**) sur plusieurs types d'huiles l'effet de la viscosité variable selon le type de L'huile et sa influence sur la morphologie et Al taille des capsules était montrée.

L'huile de tournesol est généralement utilisée pour ses propriétés physico-chimiques appropriées en comparaison avec l'huile d'olive qui présente plusieurs désavantages comme la haute viscosité, la composition complexe et variable et son pH.(**Hlaváč, Božiková, Regrut, & Ardonová, 2017**),(**Rochdi et al., 2016**),(**Valdés & Garcia, 2006**)

6. Type et concentration de stabilisant :

Tableau 19: type de stabilisant et sa concentration

Type et concentration de stabilisant/ observation	0.2%	2%	3%
Tween 80	Réaction échouée	Réaction échouée	Capsules fragiles et irrégulières
Tween 20	Réaction échouée	Réaction échouée	Capsules résistantes et régulières

Lors d'utilisation de tween 80 à des concentrations de 0.2%, 2% et 3% la réaction d'émulsion n'a pas réussi en raison de la formation des capsules irrégulières et fragiles qui s'éclatent facilement.

Lors d'utilisation de tween 20 à des concentrations de 0.2% et 2% une fragilité de capsules est observée tandis que lorsque une concentration de 3% est utilisée pour effectuer la technique d'émulsion la réaction a réussi dont les capsules formées était régulières, uniformes et résistantes.

La composition du stabilisant et sa concentration affecte la stabilité de l'émulsion. Un stabilisant de composition inapproprié ou à des concentrations élevées résulte une réduction des tensions interfaciales entre l'alginate et la phase huileuse ce qui induit une prolongation du temps de gélification et la réduction de la taille des capsules < 75 um(taille considéré comme non protectrice pour les probiotiques), provoquant aussi une diminution de la résistance avec un taux d'éclatement élevée.(Alnaief, Alzaitoun, García-González, & Smirnova, 2011),(Liu et al., 2003)

Une concentration de stabilisant > 2% permet sa adsorption dans la surface des gouttelettes extrudées pour former un film qui prévient la coalescence et augmente la stabilité, par contre

des concentrations faibles < 2% ne permet pas le revêtement totale de la surface de la gouttelette ce qui réduit leur stabilité.

7. Le volume et le temps d'ajout de CaCl :

Tableau 20: le volume de CaCl

Volume	1/5	1/1
Ajout à la fin	Réaction échouée	Réaction échouée
Ajout Progressive	Réaction échouée	Réaction réussite

- Une formation de capsules irrégulières et fragiles est observée lors de l'ajout de la solution CaCl en raison d'un volume de 1/5 à la fin de la réaction et même avec lors de l'ajout progressive en cours de l'expérience, les mêmes résultats sont obtenus lors de l'ajout de la solution CaCl en raison d'un volume 1/1 à la fin de la réaction.

Une formation de capsules régulières et résistantes est observée lors de l'ajout progressif de la solution CaCl en raison d'un volume 1/1 équivalent du volume de l'huile utilisé pour l'émulsion.

La concentration de CaCl dans l'émulsion est un paramètre crucial, une concentration très faible en Ca²⁺ ne permet pas la solidification complète des capsules, un volume de CaCl = volume de L »huile permet d'assurer la dispersion uniforme et suffisante des cations Ca²⁺ pour la solidification complète des capsules et leur revêtement par le réseau acide guluronique Ca²⁺.(Lętocha et al., 2022)

Les gouttelettes formées par l'émulsion ne sont pas totalement stables malgré l'ajout de stabilisant, l'addition progressive de CaCl au moment de l'émulsion permet de solidifier les gouttelettes rapidement dès leur formation et en même temps permet de prévenir leur dissolution dans l'huile avant solidification.

8. Etude in vivo :administration des capsules de probiotiques chez le poulet :

8.1 Évolution de l'indice de consommation et du poids vif :

8.1.1 Pour l'évolution de l'indice de consommation :

Les données montrent une diminution progressive de l'indice de consommation pour tous les régimes alimentaires au cours des semaines d'élevage. Pour le régime témoin, l'indice passe de 1,5 à 0,42 entre la quatrième et la septième semaine, indiquant une adaptation graduelle. Les poulets nourris avec la souche LGG ont vu leur indice chuter de 1,2 à 0,34, ce qui pourrait refléter une meilleure efficacité à long terme. Avec les bactéries issues de thé fermenté, l'indice a diminué de 1,47 à 0,39, suggérant une adaptation rapide. Enfin, le régime avec des bactéries de Dhen de chèvre a montré une baisse de 1,35 à 0,4, similaire aux autres régimes.

En résumé, tous les régimes ont montré une réduction régulière de l'indice de consommation, avec le régime LGG se distinguant par la baisse la plus marquée à la septième semaine, indiquant une possible efficacité supérieure.

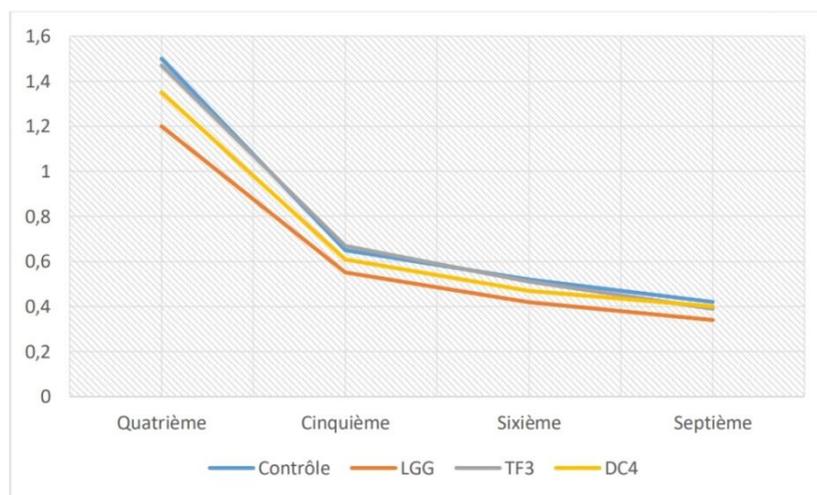


Figure 10 : évolution de l'indice de consommation durant les semaines d'élevage

8.1.2 Pour l'évolution du poids vif :

L'analyse des résultats révèle des tendances distinctes selon chaque régime alimentaire, avec une augmentation régulière du poids vif pour tous les poulets. Sous le régime contrôle, le poids vif passe de 45,4 g à la première semaine à 2302,1 g à la septième semaine, indiquant une croissance constante. Les poulets nourris avec la souche LGG voient leur poids augmenter de 654,1 g à la quatrième semaine à 2386 g à la septième semaine, montrant une croissance légèrement plus rapide que le régime contrôle. Pour ceux nourris avec des bactéries de thé fermenté, le poids passe de 686,5 g à 2578,5 g sur la même période, suggérant une meilleure efficacité de ce régime.

Les poulets nourris avec des bactéries issues de Den de chèvre voient leur poids passer de 690,4 g à 2334 g, avec une croissance comparable aux autres régimes, mais moins rapide que le régime TF3. Globalement, tous les régimes ont montré une augmentation régulière du poids, avec le régime TF3 présentant la plus forte augmentation, ce qui pourrait indiquer une efficacité supérieure à long terme.

Les probiotiques améliorent la croissance et la digestion des poulets, renforcent leur système immunitaire, réduisent les pathogènes intestinaux et le stress, tout en améliorant la qualité de la viande et réduisant l'utilisation d'antibiotiques. (Lutful Kabir, 2009)

Dans une étude similaire (Rehman et al., 2020) a évalué l'effet de l'addition des probiotiques au régime alimentaire sur la croissance, le carcasse et le bien être du poulet, une autre étude menée par (De Souza et al., 2018) a évalué les mêmes paramètres dans des conditions environnementales différentes dont l'effet positive d'administration des probiotiques été montré et comparé au régime standard.

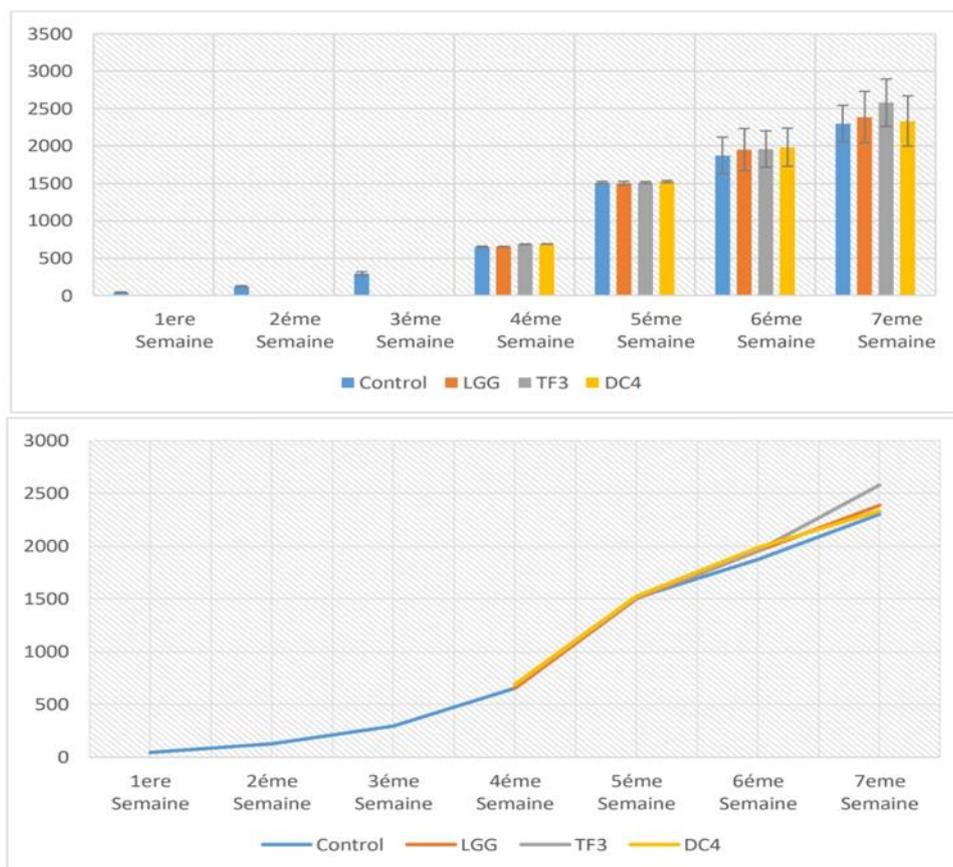


Figure 11 : évolution des poids vifs durant les différentes semaines d'élevage

9. Conservation des capsules 35 jrs :

Une diminution faible à modérée de la viabilité est observée chez les différentes souches après 35 jrs . La souche LGG a maintenu un pourcentage de viabilité le plus élevé 92.2% de cellules viables après 35 jours , la souche TF3 a révélé aussi une bonne résistance et un pourcentage de viabilité élevé égal à 90% tandis que pour la souche DC4 presque la moitié de la population bactérienne a perdu sa viabilité seulement 64.4% de cellules bactériennes sont restées viables .Les deux souches LGG et TF3 ont montrées des de résistance intéressantes pour leur utilisation en encapsulation et en longue conservation par rapport à la souche DC4 qui a montré une faible résistance au cours du temps de conservation.

Tableau 21: viabilité des souches après 35 jours

Échantillon	No	N35 jrs	Taux de viabilité %
C : PJ +TF13	1.08×10^6	9.6×10^5	89%
C : PJ+ TF3	9×10^5	7.3×10^5	81%
C : PJ+ LGG	1.02×10^6	2.9×10^5	28%
C : PJ+ DC1	9.8×10^5	3.2×10^5	33%
C : PJ+ DC4	8.7×10^5	3.8×10^5	44%
C : LGG	1.02×10^6	9.4×10^5	92%
C : TF3	9×10^5	8.1×10^5	90%
C : DC4	8.7×10^5	5.6×10^5	64%

Le taux de viabilité élevé peut être expliqué par l’effet protecteur aux différents facteurs environnementaux (pH , température , pression ...) de la capsule d’alginate , par les propriétés résistantes des souches lactiques et par le rôle de la température de stockage 4°C dans la diminution et l’interruption de différentes réactions métaboliques . (**Afzaal, Saeed, Saeed, et al., 2020**).Des études menées par (**F. J. Rodrigues et al., 2017**),(**de Araújo Etchepare et al., 2020**),(**D. Rodrigues et al., 2011**),(**Yasmin, Saeed, Pasha, & Zia, 2019**)ont montré les mêmes résultats après stockage pendant des périodes différentes.

Une faible diminution à modérée de viabilité est observée lorsque les probiotiques sont encapsulés avec le jus de grenade par rapport à ceux encapsulés seuls , cette diminution peut être expliquée par différents facteurs physicochimiques :

La présence des substances phénoliques en excès par rapport à la densité au sein de la capsule , ces substances ont des propriétés antimicrobiennes ce qui affecte la viabilité des bactéries (Burgain, 2013).

L'interaction entre le jus de grenade et l'alginate joue un rôle crucial dans la maintenance de la viabilité des souches , le jus de grenade peut augmenter la perméabilité de la capsule à l'oxygène ce qui crée un stress oxydant affectant la viabilité des souches , en outre le pH du jus de grenade crée un environnement défavorable aux bactéries lactiques provoquant la mort des cellules bactériennes non résistantes ..(Vera Peña & Rodriguez Rodriguez, 2020), (Gildas Komenan Gbassi, 2010)

10. Test jus gastrique pH = 2 :

Toutes les souches encapsulées testées ont montré un taux de viabilité élevée après incubation dans le jus gastrique simulé (pH=2) pendant 3 h à 37°C allant de 74.2% à 95.1% .

Les souches encapsulées n'ont pas montré le même degré de résistance dans les mêmes conditions expérimentales, la souche DC1 a maintenu le pourcentage le plus élevé de cellules viables après passage par le jus gastrique 95.1%, les souches TF13, TF3 et LGG ont maintenu une viabilité supérieur à 85% tandis que la souche DC4 a montré le pourcentage le plus faible 74.2 % à la fin du test effectué.

Le taux de viabilité élevé est dû au rôle protecteur de la capsule qui agit comme une barrière physique protégeant la bactérie de la forte acidité extérieure du jus gastrique Cette protection aide à transporter le probiotique à la région désiré " intestin " où sont site d'action .(Jumazhanova et al., 2023)

Tableau 22: taux de viabilité des souches à To et après 3h

Souche	To	T 3h	Taux de viabilité %
DC1	1.03×10 ⁶	0.98×10 ⁶	95.1%
TF3	0.93×10 ⁶	0.87×10 ⁶	93.5%
TF13	1.01×10 ⁶	0.93×10 ⁶	92.1%
LGG	1.21×10 ⁶	1.07×10 ⁶	88.4%
DC4	0.89×10 ⁶	0.66×10 ⁶	74.2%

Cette différence peut être dû à l'existence d'une variation de propriétés de résistance au stress entre une souche et l'autre, en plus la répartition des blocs G + cations Ca²⁺ liées par des liaisons électrostatiques n'est pas la même dans toutes les capsules et l'interaction entre la

capsule d'alginate et la souche se diffère entre un probiotique et autre. le mode de désintégration des liaisons électrostatiques (Egg- box) dans le jus gastrique joue un rôle crucial dans la protection de la bactérie, cette désintégration peut se différer suite à différents facteurs biologiques ou physicochimiques malgré le déroulement de l'expérience dans le mêmes conditions expérimentales.(**Felton et al., 1995**),(**Pinto et al., 2020**)

Les capsules obtenues par extrusion grâce à leur diamètre 1.5 mm à 2 mm peuvent offrir une meilleure protection en raison de La distance entre l'acidité gastrique et la cellule probiotique et le temps de diffusion prolongé (**Altamirano-Ríos, Guadarrama-Lezama, Arroyo-Maya, Hernández-Álvarez, & Orozco-Villafuerte, 2022**) La répartition des cellules bactériennes à l'intérieur de la capsule joue un rôle crucial dans sa résistance à l'acidité , les cellules proches de la capsules sont plus exposés à l'acidité gastrique et moins protégés tandis que les cellules probiotiques situées au sein de la capsule sont plus protégées et maintient leur viabilité.(**Ortakci, Broadbent, McManus, & McMahon, 2012**)

Des recherches menées par (**Mokhtari, Jafari, & Khomeiri, 2019**),(**Afzaal et al., 2019**),(**Jumazhanova et al., 2023**),(**Pinto et al., 2020**) sur des différentes souches lactiques employant l'alginate seule ou combiné comme matériau ont montré les mêmes résultats dont l'effet protectrice de la capsule était confirmé.

11. Pouvoir acidifiant :

Toutes les souches testés n'ont pas révélé un pouvoir acidifiant important et sont considérés comme agents d'acidification faible, aucune souche a diminué le pH au cours de premières heures qu'après 48 h dont la diminution était entre 1.08 (la souche TF3) et 3.9 (la souche LGG) .

La diminution du pH reflète la croissance bactérienne en raison de la formation de l'acide lactique (souche homofermentaires) ou d'autres acides organiques (souche hétérofermentaire)au cours de la production d'énergie par fermentation .

Nos souches testées sont isolées à partir des matrices alimentaires de source végétale qui se différencie totalement de la composition des matrices alimentaires de source animale notamment les produits laitiers, la langue durée observée pour la diminution du pH peut être expliqué par la phase d'adaptation métabolique des cellules bactériennes à la nouvelle matrice (lait écrémé) .

Nos souches testées ont montré un pouvoir acidifiant inférieur à ceux des souches lactobacilles testés par dans les mêmes conditions expérimentales (Bouchibane et al., 2023)

Le pouvoir acidifiant des souches bactériennes est primordial pour les technologies de transformation alimentaire donnant une image avancée sur le pH du produit final , sa stabilité et ses qualités organoleptiques.

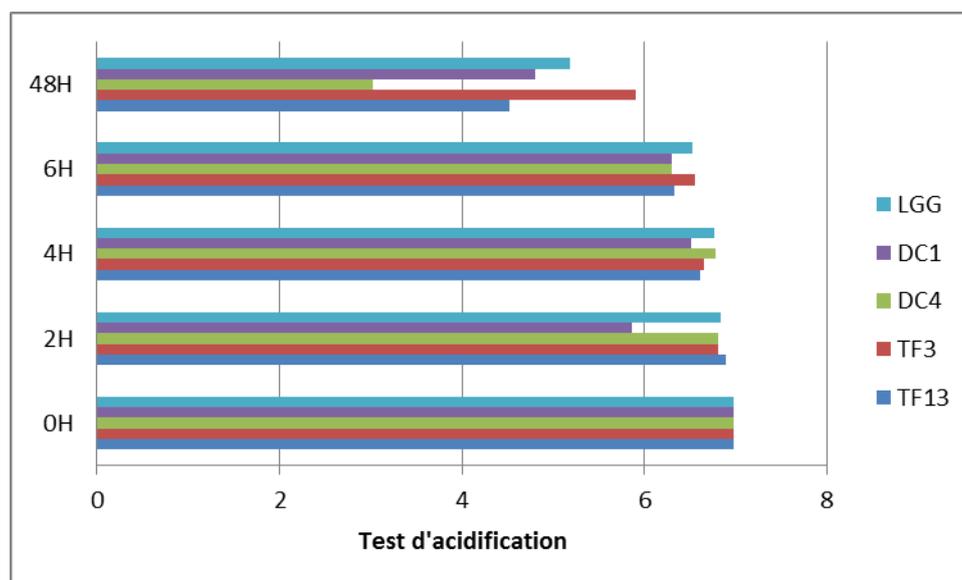


Figure 12 : pH des souche durant le test d'acidification

12. Degré BRIX°, pH et taux de sucres réducteurs avant et après fermentation :

Le degré Brix ° du jus naturel est 14,25 représentant le taux du saccharose et du sucres réducteurs présentes dans le jus .

Une diminution faible de pH est observé de ~0.1 après 24 h et de ~0.2 est observée pour toutes souches après 24 h et 21 jours de stockage respectivement.

Le taux de sucres réducteurs a diminué dans tous les échantillons après 21 jours de 2.45 – 6.1 g/ L.

Tableau 23: taux de sucres réducteurs avant et après fermentation

Echantillon	teneur en sucres réducteurs g/l	teneur en saccharose g/l	Degré Brix°
Jus de grenade	9.7	4.55	14.25
Jus + TF3	7.25	/	

Jus + TF13	6.4	/	
Jus + DC1	8.2	/	
Jus + DC4	4.8	/	
Jus + LGG	3.6	/	

La teneur en sucres et leur types (complexe ou simple) est très importante dans le procédé de fermentation , les bactéries lactiques ne peuvent pas décomposer les sucres complexes et exigent la présence de sucres simples facilement fermentescible notamment les sucres réducteurs : fructose , glucose .. qui sert comme substrat pour leur activité enzymatique et leur multiplication .

La diversité des substrats de fermentation et des souches entraîne des variations dans les types et les quantités de ces substances actives. En général, la fermentation des fruits par les lactobacilles produit principalement de l'acide lactique, tandis qu'elle augmente la teneur en antioxydants (par exemple les polyphénols), en vitamines (par exemple la vitamine C et la vitamine K), en polysaccharides extracellulaires et en minéraux (par exemple potassium, calcium, magnésium et fer). Cette production est accompagné par une consommation des sucres réducteurs généralement fructose et glucose comme source de Carbone .(Yuan et al., 2024) Dans une étude menée par(Z. Mousavi, Mousavi, Razavi, Emam-Djomeh, & Kiani, 2011)une diminution croissante de pH et de sucres réducteurs est observée au cours du moment de stockage et conservation similaire à nos résultats trouvées .

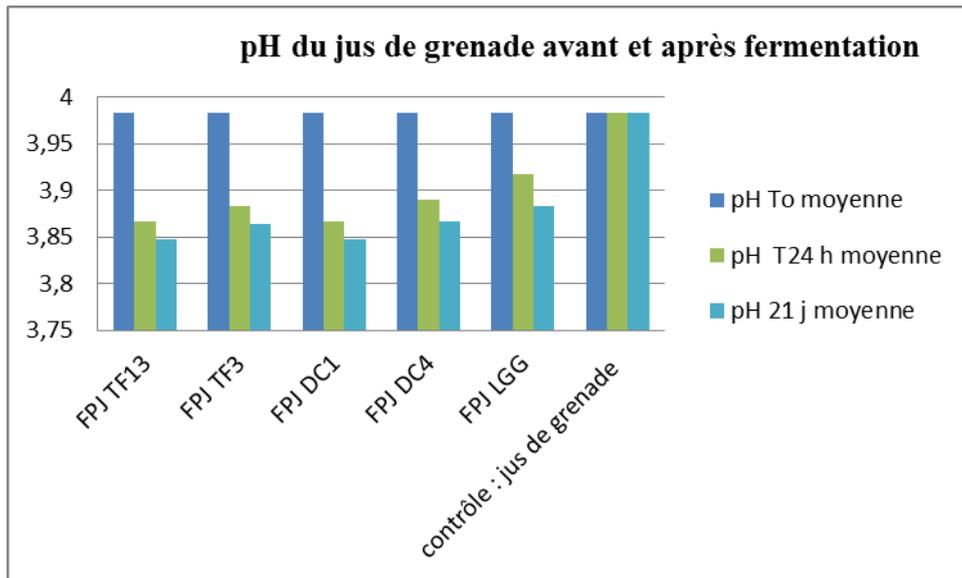


Figure 13 : pH du jus de grenade avant et après fermentation

13. Dénombrement des bactéries après 21 jours de fermentation :

La durée de conservation moyenne des aliments est de 3 semaines , pour les aliments dits fonctionnels ils doivent contenir un nombre de bactéries viables 10^6 - 10^7 au minimum au moment de la consommation.

Tableau 24: dénombrement des souches après 21 jours de fermentation

Échantillon	No	N 21 jrs
FPJ TF13	1.08×10^6	4×10^6
FPJ TF3	9×10^5	6.4×10^6
FPJ DC1	9.8×10^5	4.2×10^6
FPJDC4	8.7×10^5	2.5×10^6
FPJ LGG	1.02×10^6	9.6×10^6
FPJ C : TF13	1.08×10^6	1.02×10^7
FPJ C : TF3	9×10^5	1.14×10^7
FPJ C : DC1	9.8×10^5	1.62×10^7
FPJ C : DC4	8.7×10^5	7.9×10^6
FPJ C : LGG	1.02×10^6	2.06×10^7

Le nombre des bactéries libres ensemencées dans le jus de grenade après 21 jours est resté supérieur au nombre minimum 10^6 , une augmentation faible de la densité bactérienne est observée par rapport au nombre initiale N_0 (nombre des bactéries lactiques avant fermentation). La souche DC4 représente le nombre le plus faible tandis que la souche LGG représente le nombre le plus élevé après 21 jours de stockage.

Dans une étude menée par (Mantzourani et al., 2018) dont les bactéries lactiques libres sont utilisées pour la fermentation du jus de grenade, le nombre de bactéries viables était supérieur à $7 \log$ CFU/ ml après 4 semaines de réfrigération, les mêmes résultats sont trouvés dans une étude effectuée par (Di Cagno, Filannino, & Gobbetti, 2017), ce qui est en accord avec nos résultats. Par contre dans une étude menée par (Z. Mousavi et al., 2011), l'auteur a trouvé que le nombre des bactéries libres devient inférieur au seuil minimum $<10^6$ CFU/ ml après la deuxième semaine de réfrigération. La différence de croissance et de taux de viabilité entre les souches dépend de leur sensibilité aux composés phénoliques du jus de grenade (Kazakos, Mantzourani, & Plessas, 2020) et de leur propres propriétés métaboliques et de résistance.

Le nombre de bactéries encapsulées et ensemencées dans le jus de grenade après 21 jours était supérieur à 10^7 , une augmentation remarquable est observée par rapport à N_0 . La souche LGG représente la densité bactérienne la plus élevée après 21 jours tandis que la souche DC4 représente la plus faible.

L'immobilisation des bactéries peut prévenir la perte de la viabilité des souches au cours de production et de protéger la bactérie des conditions défavorables liées à la composition de différents produits alimentaires (Schoina, Terpou, Bosnea, Kanellaki, & Nigam, 2018) Dans une étude menée par (Mantzourani et al., 2020) dont les bactéries lactiques étaient immobilisées dans le son de blé, un taux de viabilité élevé est observé après la durée de stockage par rapport aux bactéries libres non encapsulées.

Une autre étude effectuée par (Giordano et al., 2022) sur la fermentation de jus de tomate par une souche lactique encapsulée a révélé les mêmes résultats sont l'encapsulation joue un rôle protecteur de la bactérie et contribue à maintenir sa viabilité. D'autres études similaires menées par (Kerdsup, Hattayapichat, Silva, & Tantratian, 2022), (Nami, Lornezhad, Kiani, Abdullah, & Haghshenas, 2020) ont trouvé les mêmes résultats.

14. Activité antimicrobienne :

Le surnageant des souches n'a montré aucune zone d'inhibition pour les deux germes pathogènes indicatrices (*E.coli* et *S.aureus*) et aucun effet inhibiteur est observé dans les boîtes incubées .

Des zones d'inhibition allant de 6 mm jusqu'à 10 mm sont observées pour les échantillons de jus fermenté par les bactéries libres et encapsulées. Pour ceux fermentés par les souches à l'état libre la souche TF13 et LGG ont donnée la plus grande zone d'inhibition(10mm contre *S.aureus* et 8 mm contre *E.coli*) par rapport aux autres souches et au jus naturel sans fermentation(6 mm).Le diamètre des zones d'inhibition est diminué faiblement pour quelques échantillons fermentés par les bactéries encapsulées contre les deux souches pathogènes indicatrices (*S.aureus* et *E.coli*) dont les deux souches TF13 et LGG ont montré le plus grand effet inhibiteur à l'état libre et encapsulé en comparaison avec les autres souches et le jus naturel

Tableau 25: activité antimicrobienne contre *S.aureus*

Echantillon	Diamètre de la zone d'inhibition
Jus de grenade	6 mm
Jus + TF13 libre	10 mm
Jus + TF13 encapsulée	8 mm
Jus + DC1 libre	9 mm
Jus + DC1 encapsulée	8 mm
Jus + LGG libre	10 mm
Jus + LGG encapsulée	9 mm
Jus + TF3 libre	8 mm
Jus + TF3 encapsulé	8 mm
Jus + DC4 libre	9 mm
Jus + DC4 encapsulée	8 mm

Tableau 27: activité antimicrobienne contre *E.coli*

Echantillon	Diamètre de la zone d'inhibition
Jus de grenade	6 mm
Jus + TF13 libre	8 mm
Jus + TF13 encapsulée	8 mm
Jus + DC1 libre	6 mm
Jus + DC1 encapsulée	6 mm
Jus + LGG libre	8 mm
Jus + LGG encapsulée	7 mm
Jus + TF3 libre	7 mm
Jus + TF3 encapsulé	7 mm
Jus + DC4 libre	8 mm
Jus + DC4 encapsulée	6 mm

Le jus fermenté a montré une activité antimicrobienne supérieure au jus naturel. Une faible diminution de spectre d'activité est observée pour les échantillons fermentés par les bactéries encapsulées par rapport à ceux fermentés par les bactéries lactiques libres.

Le jus de grenade possède naturellement une activité antimicrobienne contre plusieurs espèces pathogènes y compris *E.coli* et *S.aureus* . Cette activité est dû à la présence des polyphénols , des flavonoïdes et des tanins (les punicalagines, l'acide ellagique ...) qui sont des antioxydants puissants ont un effet bactériostatique ou bactéricide sur la bactérie pathogène , cette activité est due aussi à la présence des acides organiques (acide citrique, acide malique ...) qui abaissent le pH du milieu créant un environnement défavorables à la croissance microbienne .(Howell & D' Souza, 2013),(Celiksoy & Heard, 2021)

Plusieurs scientifiques ont montré le rôle de la fermentation sur l'amélioration des propriétés antimicrobiennes et la conservation. Cette amélioration est due essentiellement à la sécrétion

des bactériocines (des molécules protéiques ayant un effet bactériostatique ou bactéricide) , à la production du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et à la production des acides organiques qui abaissent le pH. L'activité antimicrobienne peut être influencé par plusieurs facteurs : les propriétés de la souche , les conditions de la fermentation (nutriments , pH , température ...) et la composition du produit même (présence de substances inhibitrices ,....) .(Harms, König, & Schäberle, 2017),(Cirat et al., 2024)



Figure 14 : activité anti microbienne contrs *S.aureus* et *E.coli*

La faible diminution de l'activité antimicrobienne observée pour les bactéries encapsulées par rapport aux bactéries libres chez la même souche peut être expliquée par la présence de la barrière physique (la capsule d'alginate) qui limite l'interaction entre les souches lactiques et les substrats de jus de grenade et les conditions environnementales extérieures (activité métabolique et stimulation de la bactérie) , cette barrière limite aussi la libération et la diffusion de substances antimicrobienne produites de la capsule vers l'extérieur (le jus de grenade) .La taille des pores des la capsules d'alginate ne permet pas aux grandes molécules de passer limitant le passage de certains métabolites vers l'extérieur où leur site d'action .

Conclusion générale

Conclusion générale :

L'étude menée dans le cadre de ce mémoire visait à explorer les effets de l'encapsulation des probiotiques sur leur viabilité et leur efficacité, ainsi que l'impact de cette encapsulation sur la fermentation du jus de grenade. Plusieurs conclusions importantes peuvent être tirées des résultats obtenus.

L'encapsulation des probiotiques s'est avérée efficace pour protéger les bactéries contre divers facteurs environnementaux défavorables. Cette protection accrue est cruciale pour garantir la survie des probiotiques tout au long de leur parcours dans le système digestif, jusqu'à atteindre l'intestin où ils peuvent exercer leurs effets bénéfiques.

notre étude a révélé que l'encapsulation combinée du jus de grenade et des probiotiques n'a pas offert une protection aussi efficace pour les bactéries que l'encapsulation des probiotiques seuls.

Ce résultat suggère que la présence du jus de grenade dans la matrice d'encapsulation pourrait interférer avec la protection conférée par le processus d'encapsulation, probablement en raison de son acidité ou d'autres interactions chimiques. Le jus de grenade a été confirmé comme un substrat favorable pour la fermentation, fournissant les nutriments nécessaires pour soutenir la croissance et l'activité des bactéries probiotiques. Cette observation renforce l'idée que le jus de grenade peut être utilisé comme un milieu de culture pour les fermentations probiotiques, offrant ainsi une alternative nutritive et bénéfique aux substrats de fermentation traditionnels.

L'encapsulation par extrusion des probiotiques a démontré une augmentation significative de la viabilité des bactéries dans le jus de grenade. Cette méthode d'encapsulation s'est montrée efficace pour maintenir des niveaux élevés de bactéries vivantes, même après des périodes prolongées de stockage et sous des conditions environnementales variées.

En conclusion, les résultats de cette recherche mettent en lumière les avantages considérables de l'encapsulation des probiotiques pour améliorer leur survie et leur efficacité. L'utilisation de techniques d'encapsulation telles que l'extrusion peut considérablement augmenter la viabilité des bactéries probiotiques, même dans des milieux acides comme le jus de grenade. Bien que l'encapsulation du jus de grenade et des bactéries ensemble ne soit pas aussi bénéfique, le jus de grenade reste un substrat précieux pour la fermentation.

Cependant ces résultats ne sont pas suffisantes et nécessitent plus de tests et d'analyses pour développer des produits fonctionnels à base de jus de grenade et probiotiques encapsulés qui allient la santé et le plaisir gustatif.

Perspectives:

Notre étude n'offre pas une vue exhaustive sur l'efficacité de l'encapsulation des probiotiques pour leur protection et l'optimisation de la fermentation du jus de grenade. Cependant, elle ouvre un large éventail de pistes de recherches futures pour développer :

- Un système d'encapsulation automatique qui permettrait de réduire les coûts et le temps de production.
- La combinaison de nouveaux matériaux d'encapsulation avec l'alginate afin d'améliorer la protection et la libération contrôlée des probiotiques.
- L'étude de l'effet des hautes températures et des diverses opérations unitaires sur l'intégrité des capsules et la viabilité des probiotiques.
- L'analyse des interactions entre les probiotiques et les composants bioactifs du jus de grenade , pour comprendre leur synergie et leurs effets sur la santé.
- Des études in vivo pour évaluer l'effet protecteur réel des capsules et les avantages pour la santé de la fermentation du jus de grenade, en comparaison avec le jus non fermenté.
- Une comparaison des paramètres physico-chimiques entre le jus de grenade normal et fermenté ,en termes de conservation et de composition.
- Une évaluation de la viabilité des probiotiques encapsulés dans le jus de grenade, avec et sans fermentation, et l'étude des effets variables liés à ces conditions.
- L'évaluation de la possibilité de conservation à long terme (plus de 3 mois) des probiotiques encapsulés, tout en maintenant leur viabilité et leurs propriétés.
- L'incorporation des probiotiques encapsulés dans d'autres jus de fruits ou matrices alimentaires pour comparer les résultats avec ceux obtenus dans le jus de grenade.

Références bibliographiques

Références

- Afzaal, M., Khan, A. U., Saeed, F., Ahmed, A., Ahmad, M. H., Maan, A. A., . . . Hussain, S. (2019). Functional exploration of free and encapsulated probiotic bacteria in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. *Food Science & Nutrition*, 7(12), 3931-3940.
- Afzaal, M., Saeed, F., Hussain, S., Mohamed, A. A., Alamri, M. S., Ahmad, A., . . . Hussain, M. (2020). Survival and storage stability of encapsulated probiotic under simulated digestion conditions and on dried apple snacks. *Food Science & Nutrition*, 8(10), 5392-5401.
- Afzaal, M., Saeed, F., Saeed, M., Ahmed, A., Ateeq, H., Nadeem, M. T., & Tufail, T. (2020). Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in pasteurized grape juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(3), e14346.
- Ahmed, M. M., Abd El-Rasoul, S., Auda, S. H., & Ibrahim, M. A. (2013). Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium–sodium alginate microparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(1), 61-69.
- Alnaief, M., Alzaitoun, M., García-González, C. A., & Smirnova, I. (2011). Preparation of biodegradable nanoporous microspherical aerogel based on alginate. *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 1011-1018.
- Altamirano-Ríos, A. V., Guadarrama-Lezama, A. Y., Arroyo-Maya, I. J., Hernández-Álvarez, A. J., & Orozco-Villafuerte, J. (2022). Effect of encapsulation methods and materials on the survival and viability of *Lactobacillus acidophilus*: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(7), 4027-4040.
- Bhowmik, D., Gopinath, H., Kumar, B. P., & Kumar, K. S. (2013). Medicinal uses of *Punica granatum* and its health benefits. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(5), 28-35.
- Bouchibane, M., Cheriguene, A., Chougrani, F., Bououdina, M., Kaced, A., Dahou, A. E., . . . Saada, D. A. (2023). Technological and genotypic characteristics of lactic acid bacteria isolated from Algerian artisanal dairy products. *International Dairy Journal*, 146, 105747.
- Burgain, J. (2013). Microencapsulation de bactéries probiotiques dans des matrices laitières: Etude des mécanismes de formation par une approche multi-échelle. *Procédés Biotechnologiques et Alimentaires, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy*.
- Celiksoy, V., & Heard, C. M. (2021). Antimicrobial potential of pomegranate extracts *Pomegranate*: IntechOpen.
- Choukaife, H., Doolaanea, A. A., & Alfatama, M. (2020). Alginate nanoformulation: Influence of process and selected variables. *Pharmaceuticals*, 13(11), 335.
- Cirat, R., Capozzi, V., Benmechernene, Z., Spano, G., Grieco, F., & Fragasso, M. (2024). LAB Antagonistic Activities and Their Significance in Food Biotechnology: Molecular Mechanisms, Food Targets, and Other Related Traits of Interest. *Fermentation*, 10(4), 222.
- Curtay, j. p. (2015).
- Jus de Grenade Fermenté - La grenade ALIMENT-PLUS* (4 Ed.).
- de Araújo Etchepare, M., Nunes, G. L., Nicoloso, B. R., Barin, J. S., Flores, E. M. M., de Oliveira Mello, R., & de Menezes, C. R. (2020). Improvement of the viability of encapsulated probiotics using whey proteins. *Lwt*, 117, 108601.
- Di Cagno, R., Filannino, P., & Gobbetti, M. (2017). Lactic acid fermentation drives the optimal volatile flavor-aroma profile of pomegranate juice. *International Journal of Food Microbiology*, 248, 56-62.
- Felton, L., Haase, M., Shah, N., Zhang, G., Infeld, M., Malick, A., & McGinity, J. (1995). Physical and enteric properties of soft gelatin capsules coated with eudragit® L 30 D-55. *International journal of pharmaceuticals*, 113(1), 17-24.

- Ganguly, N., Bhattacharya, S., Sesikeran, B., Nair, G., Ramakrishna, B., Sachdev, H., . . . Kathuria, S. (2011). ICMR-DBT guidelines for evaluation of probiotics in food. *Indian Journal of Medical Research*, 134(1), 22-25.
- Gbassi, G. K. (2010). Aspects physicochimiques de l'encapsulation et de la désencapsulation des probiotiques. *Université de Strasbourg: Thèses de doctorat*.
- Gbassi, G. K., & Vandamme, T. (2012). Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, 4(1), 149-163.
- Gedam, S., Jadhav, P., Talele, S., & Jadhav, A. (2018). Effect of crosslinking agent on development of gastroretentive mucoadhesive microspheres of risedronate sodium. *Int. J. Appl. Pharm*, 10, 133-140.
- Giordano, I., Abuqwider, J., Altamimi, M., Di Monaco, R., Puleo, S., & Mauriello, G. (2022). Application of ultrasound and microencapsulation on *Limosilactobacillus reuteri* DSM 17938 as a metabolic attenuation strategy for tomato juice probiotication. *Heliyon*, 8(10).
- Gu, Q., Yin, Y., Yan, X., Liu, X., Liu, F., & McClements, D. J. (2022). Encapsulation of multiple probiotics, synbiotics, or nutraceuticals for improved health effects: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 309, 102781.
- Harms, H., König, G. M., & Schäberle, T. F. (2017). Production of antimicrobial compounds by fermentation. *Antibiotics: methods and protocols*, 49-61.
- Hlaváč, P., Božiková, M., Regrut, T., & Ardonová, V. (2017). Comparison of selected vegetable oils rheologic properties. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 21(3), 131-135.
- Hmid, I. (2013). *Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (Punica Granatum L.): Caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais*. Université d'Angers.
- Howell, A. B., & D' Souza, D. H. (2013). The pomegranate: effects on bacteria and viruses that influence human health. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 606212.
- Indrasti, D., & Hidayat, H. (2019). Improvement of viability of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* with several encapsulating materials using extrusion method. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 23(4), 189-201.
- Jeznienė, S., Bružaitė, I., & Šipailienė, A. (2024). Application of biomacromolecules encapsulation systems for the long-term storage of *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus reuteri* 182. *Heliyon*, 10(5).
- Jumazhanova, M., Kakimova, Z., Zharykbasov, Y., Kassymov, S., Zhumadilova, G., Muratbayev, A., . . . Suychinov, A. (2023). Effect of the encapsulation process on the viability of probiotics in a simulated gastrointestinal tract model medium. *Processes*, 11(9), 2757.
- Kavitake, D., Kandasamy, S., Devi, P. B., & Shetty, P. H. (2018). Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods—A review. *Food Bioscience*, 21, 34-44.
- Kazakos, S., Mantzourani, I., & Plessas, S. (2020). Assessment of pomegranate juice as an alternative “substrate” for probiotic delivery. Recent advances and prospects. *Fermentation*, 6(1), 24.
- Kerdsup, P., Hattayapichat, P., Silva, J. L., & Tantratian, S. (2022). Survival of potential probiotic isolated from fermented tea leaf and encapsulated in multilayer beads stored in makiang (*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*) juice. *Food Bioscience*, 50, 102015.
- Koh, W. Y., Lim, X. X., Tan, T.-C., Kobun, R., & Rasti, B. (2022). Encapsulated probiotics: Potential techniques and coating materials for non-dairy food applications. *Applied Sciences*, 12(19), 10005.
- Krasakoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3-13.

- Kumari, A., Dora, J., Kumar, A., & Kumar, A. (2012). Pomegranate (*Punica granatum*)—overview. *Int. J. Pharm. Chem. Sci*, 1(4), 1218-1222.
- Łętocha, A., Miastkowska, M., & Sikora, E. (2022). Preparation and characteristics of alginate microparticles for food, pharmaceutical and cosmetic applications. *Polymers*, 14(18), 3834.
- Lin, S.-F., Chen, Y.-C., Chen, R.-N., Chen, L.-C., Ho, H.-O., Tsung, Y.-H., . . . Liu, D.-Z. (2016). Improving the stability of astaxanthin by microencapsulation in calcium alginate beads. *PLoS One*, 11(4), e0153685.
- Liu, X., Bao, D., Xue, W., Xiong, Y., Yu, W., Yu, X., . . . Yuan, Q. (2003). Preparation of uniform calcium alginate gel beads by membrane emulsification coupled with internal gelation. *Journal of Applied Polymer Science*, 87(5), 848-852.
- Lutful Kabir, S. (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *International journal of molecular sciences*, 10(8), 3531-3546.
- Mandal, S., & Hati, S. (2017). Microencapsulation of bacterial cells by emulsion technique for probiotic application. *Cell Microencapsulation: Methods and Protocols*, 273-279.
- Mandal, S., Puniya, A., & Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, 16(10), 1190-1195.
- Mannaa, M., Han, G., Seo, Y.-S., & Park, I. (2021). Evolution of food fermentation processes and the use of multi-omics in deciphering the roles of the microbiota. *Foods*, 10(11), 2861.
- Mantzourani, I., Kazakos, S., Terpou, A., Alexopoulos, A., Bezirtzoglou, E., Bekatorou, A., & Plessas, S. (2018). Potential of the probiotic *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 strain to produce functional fermented pomegranate juice. *Foods*, 8(1), 4.
- Mantzourani, I., Terpou, A., Bekatorou, A., Mallouchos, A., Alexopoulos, A., Kimbaris, A., . . . Plessas, S. (2020). Functional pomegranate beverage production by fermentation with a novel synbiotic *L. paracasei* biocatalyst. *Food Chemistry*, 308, 125658.
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., . . . Pihlanto, A. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current opinion in biotechnology*, 44, 94-102.
- Mokhtari, S., Jafari, S. M., & Khomeiri, M. (2019). Survival of encapsulated probiotics in pasteurized grape juice and evaluation of their properties during storage. *Food Science and Technology International*, 25(2), 120-129.
- Mousavi, Z., Mousavi, S., Razavi, S., Emam-Djomeh, Z., & Kiani, H. (2011). Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 123-128.
- Mousavi, Z. E., Mousavi, S. M., Razavi, S. H., Hadinejad, M., Emam-Djomeh, Z., & Mirzapour, M. (2013). Effect of fermentation of pomegranate juice by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* on the antioxidant activity and metabolism of sugars, organic acids and phenolic compounds. *Food Biotechnology*, 27(1), 1-13.
- Nami, Y., Lornezhad, G., Kiani, A., Abdullah, N., & Haghshenas, B. (2020). Alginate-Persian Gum-Prebiotics microencapsulation impacts on the survival rate of *Lactococcus lactis* ABRIINW-N19 in orange juice. *Lwt*, 124, 109190.
- Navarre, J. (1974). Manuel d'œnologie (2ème édition) baillier. Paris, p218.
- Ortakci, F., Broadbent, J. R., McManus, W., & McMahon, D. (2012). Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. *Journal of dairy science*, 95(11), 6274-6281.
- Otles, S. (2013). *Probiotics and prebiotics in food, nutrition and health*: CRC Press.
- Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics—a review. *Journal of food science and technology*, 52, 7577-7587.

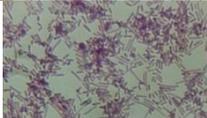
- Pejcz, E. (2024). Biotechnological Approach of Technological Advancements for Sustainable Probiotic Bread Production. *Sustainability*, 16(8), 3275.
- Perumal, D. (2001). Microencapsulation of ibuprofen and Eudragit® RS 100 by the emulsion solvent diffusion technique. *International journal of pharmaceutics*, 218(1-2), 1-11.
- Pinto, J. T., Wutscher, T., Stankovic-Brandl, M., Zellnitz, S., Biserni, S., Mercandelli, A., . . . Daza, V. (2020). Evaluation of the physico-mechanical properties and electrostatic charging behavior of different capsule types for inhalation under distinct environmental conditions. *Aaps Pharmscitech*, 21, 1-10.
- Plessas, S. (2021). Advancements in the use of fermented fruit juices by lactic acid bacteria as functional foods: Prospects and challenges of Lactiplantibacillus (Lpb.) plantarum subsp. plantarum application. *Fermentation*, 8(1), 6.
- Pontonio, E., Montemurro, M., Pinto, D., Trani, A., Mazzeo, A., Gobbetti, M., & Rizzello, C. (2019). Lactic acid fermentation of pomegranate juice as a tool to improve antioxidant activity. *Frontiers in Microbiology*, 10, 460471.
- Pramanik, S., Venkatraman, S., & Vaidyanathan, V. K. (2023). Development of engineered probiotics with tailored functional properties and their application in food science. *Food Science and Biotechnology*, 32(4), 453-470.
- Pupa, P., Apiwatsiri, P., Sirichokchatchawan, W., Pirarat, N., Muangsin, N., Shah, A. A., & Prapasarakul, N. (2021). The efficacy of three double-microencapsulation methods for preservation of probiotic bacteria. *Scientific reports*, 11(1), 13753.
- Rahman, Z., Kohli, K., Khar, R. K., Ali, M., Charoo, N. A., & Shamsher, A. A. (2006). Characterization of 5-fluorouracil microspheres for colonic delivery. *Aaps Pharmscitech*, 7, E113-E121.
- Rajam, R., & Subramanian, P. (2022). Encapsulation of probiotics: Past, present and future. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(1), 46.
- Rehman, A., Arif, M., Sajjad, N., Al-Ghadi, M., Alagawany, M., Abd El-Hack, M., . . . Amran, R. (2020). Dietary effect of probiotics and prebiotics on broiler performance, carcass, and immunity. *Poultry science*, 99(12), 6946-6953.
- Rochdi, R., Rochdi, M., Kafih, A., Rochdi, N., Hassanain, I., & El Belghiti, M. A. (2016). Modeling The Viscosity of the Vegetable Oils of Argan, Avocado, Olive, Rapeseed and Sunflower. *RESEARCH JOURNAL OF PHARMACEUTICAL BIOLOGICAL AND CHEMICAL SCIENCES*, 7(6), 1645-1650.
- Rodrigues, D., Sousa, S., Rocha-Santos, T., Silva, J., Lobo, J. S., Costa, P., . . . Malcata, F. X. (2011). Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. *International Dairy Journal*, 21(11), 869-876.
- Rodrigues, F. J., Omura, M. H., Cedran, M. F., Dekker, R. F., Barbosa-Dekker, A. M., & Garcia, S. (2017). Effect of natural polymers on the survival of Lactobacillus casei encapsulated in alginate microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 34(5), 431-439.
- Schoina, V., Terpou, A., Bosnea, L., Kanellaki, M., & Nigam, P. S. (2018). Entrapment of Lactobacillus casei ATCC393 in the viscous matrix of Pistacia terebinthus resin for functional myzithra cheese manufacture. *Lwt*, 89, 441-448.
- Sun, Q., Yin, S., He, Y., Cao, Y., & Jiang, C. (2023). Biomaterials and Encapsulation Techniques for Probiotics: Current Status and Future Prospects in Biomedical Applications. *Nanomaterials*, 13(15), 2185.
- Tanganurat, P. (2020). Probiotics encapsulated fruit juice bubbles as functional food product. *GEOMATE Journal*, 19(72), 145-150.
- Tønnesen, H. H., & Karlsen, J. (2002). Alginate in drug delivery systems. *Drug development and industrial pharmacy*, 28(6), 621-630.

- Valdés, A. F., & Garcia, A. B. (2006). A study of the evolution of the physicochemical and structural characteristics of olive and sunflower oils after heating at frying temperatures. *Food Chemistry*, 98(2), 214-219.
- Varela-Pérez, A., Romero-Chapol, O. O., Castillo-Olmos, A. G., García, H. S., Suárez-Quiroz, M. L., Singh, J., . . . Cano-Sarmiento, C. (2022). Encapsulation of *Lactobacillus gasseri*: Characterization, probiotic survival, in vitro evaluation and viability in apple juice. *Foods*, 11(5), 740.
- Vera Peña, M. Y., & Rodriguez Rodriguez, W. L. (2020). Effect of pH on the growth of three lactic acid bacteria strains isolated from sour cream.
- Vivek, K., Mishra, S., Pradhan, R. C., Nagarajan, M., Kumar, P. K., Singh, S. S., . . . Gowda, N. N. (2023). A comprehensive review on microencapsulation of probiotics: Technology, carriers and current trends. *Applied Food Research*, 3(1), 100248.
- Wang, L.-Y., Ma, G.-H., & Su, Z.-G. (2005). Preparation of uniform sized chitosan microspheres by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug. *Journal of Controlled Release*, 106(1-2), 62-75.
- Wee, Y.-J., Kim, J.-N., & Ryu, H.-W. (2006). Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 163-172.
- Wyřębska, Ł., Szuster, L., & Stawska, H. (2014). Synteza i aplikacja nowych pochodnych wybranych polisacharydów. Cz. 1, Przegląd literatury. *Technologia i Jakość Wyrobów*, 59.
- Yang, S., Wei, S., Wu, Y., Fang, Y., Deng, Z., Xu, J., & Zhang, H. (2024). Encapsulation techniques, action mechanisms, and evaluation models of probiotics: Recent advances and future prospects. *Food Frontiers*, 5(3), 1212-1239.
- Yasmin, I., Saeed, M., Pasha, I., & Zia, M. A. (2019). Development of whey protein concentrate-pectin-alginate based delivery system to improve survival of *B. longum* BL-05 in simulated gastrointestinal conditions. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11, 413-426.
- Yuan, X., Wang, T., Sun, L., Qiao, Z., Pan, H., Zhong, Y., & Zhuang, Y. (2024). Recent advances of fermented fruits: A review on strains, fermentation strategies, and functional activities. *Food Chemistry*: X, 101482.

Annexes

Annexe	Les composants	Quantité en grammes
1: milieu gélose MRS (Man Rogosa et Sharpe)	Peptone	10 g
	Extrait de viande	10 g
	Extrait de levure	5 g
	Glucose	20 g
	Acétate de sodium	5 g
	Citrate d'amonium	2 g
	K ₂ H PO ₄	2 g
	Mg SO ₄	0,25 g
	Mn SO ₄	0,058 g
	Tween 80	1,0 ml
pH	6,5	
2: bouillon phosphate saline PBS	NaCl	8 g
	Kcl	0,20 g
	NaH ₂ PO ₄	1,44 g
	K ₂ HPO ₄	0,24 g
	Eau distillée	1000 ml
3: jus gastrique	KH ₂ PO ₄	0.60 g/l
	KCl	0.37 g/l
	NaCl	2.05 g/l
	CaCl ₂	0.11 g/l
	Pepsine	13.3 mg/l

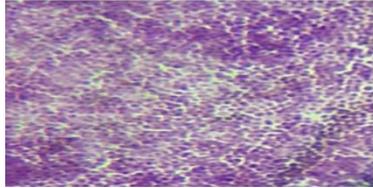
Annexe 4:

La souche	Nome de la souche	Observation microscopique
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	
DC1	<i>Levilactobacillus brevis</i>	
DC4	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	
TF3	<i>Levilactobacillus brevis</i>	
TF13	<i>Levilactobacillus brevis</i>	

Annexe 5 :

	pH To		pH T24 h		pH 21 j	
	moyenne	ecart type	moyenne	ecart type	moyenne	ecart type
FPJ TF13	3,98333333	0,0057735	3,86666667	0,0057735	3,84666667	0,0057735
FPJ TF3	3,98333333	0,0057735	3,88333333	0,01527525	3,86333333	0,0057735
FPJ DC1	3,98333333	0,0057735	3,86666667	0,01154701	3,84666667	0,0057735
FPJ DC4	3,98333333	0,0057735	3,89	0,01732051	3,86666667	0,0057735
FPJ LGG	3,98333333	0,0057735	3,91666667	0,0057735	3,88333333	0,0057735
FPJ C : TF13	3,98333333	0,0057735	3,81666667	0,0057735	3,78666667	0,0057735
FPJ C : TF3	3,98333333	0,0057735	3,87333333	0,0057735	3,85333333	0,0057735
FPJ C : DC1	3,98333333	0,0057735	3,81333333	0,0057735	3,79666667	0,0057735
FPJ C : DC4	3,98333333	0,0057735	3,82	0,01	3,80333333	0,0057735
FPJ C : LGG	3,98333333	0,0057735	3,84	0,02	3,83333333	0,01154701
contrôle : jus	3,98333333	0,0057735	3,98333333	0,0057735	3,98333333	0,0057735

Annexe 6:

Abréviation	Nom de la souche	Observation microscopique
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	

Annexe 7 :Appareillage

<p>Réfractomètre Brix numérique Milwaukee MA871</p>	
<p>Balance de laboratoire Kern EG420-3NM</p>	
<p>inoLab pH 7110 Analog pH Lab Benchtop Meter</p>	
<p>Hettich MIKRO 200/200R centrifuge</p>	

Spectrophotomètre Genova Bio Jenway



Stuart agitateur et plaque chauffante



Microscope OPTIKA



Bain-marie MEMMERT



Autoclave KLEINSTON



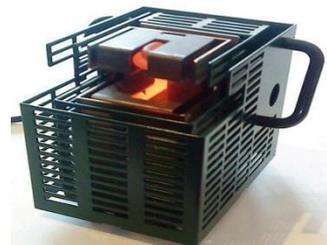
Étuve MEMMERT



Hotte classe A LABTech °



Bec Bunsen électrique



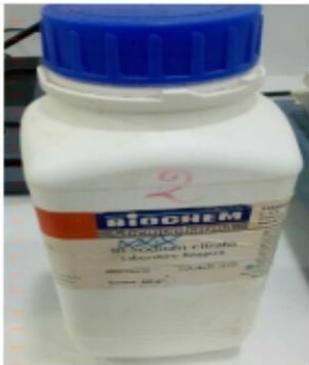
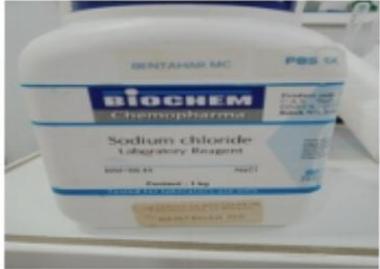
Refrigerator Samsung



**Agitateur auto vortex Stuart SA8, 250-2500 T/MN,
PR 1 TUBE**



Annexe 8 : produits

<p>BIOCHEM Chemopharma Tri-Sodium citrate</p>		<p>HSPECILAB GLUCOSE ANHYDRE AR/ACS 500 g</p>	
<p>Condalab MRS Agar 500 g</p>		<p>Jus de Grenade – Jardin bio – 500 ml</p>	
<p>SaporePuro ALGINATO DI SODIO 100 g</p>		<p>Candia Silhouette 1L</p>	
<p>BIOCHEM Chemopharma Sodium chloride Laboratory Régent 1kg</p>		<p>SIGMA Pepsin From porcine gastric mucosa Powder, slightly beige, 500 U/mg</p>	

Annexe 9 :

	0H	2H	4H	6H	48H
TF13	6,98	6,9	6,61666667	6,32666667	4,51666667
TF3	6,98	6,81666667	6,66333333	6,55333333	5,90333333
DC4	6,98	6,81	6,78333333	6,3	3,03
DC1	6,98	5,86666667	6,51	6,31	4,8
LGG	6,98	6,84333333	6,76666667	6,52333333	5,18666667

