

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. Mira - Bejaia

Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée



Réf :

Mémoire de fin de cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème :

Essai d'encapsulation de la bactérie probiotique, *Pediococcus acidilactici*, dans une matrice de Carraghénane

Présenté par :

ALLOUACHE Farah
KHELIL Fatma

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Mme YAHIAOUI Houa
Mme BOUKTIT Nadia
Mr AKSAS Ali

Présidente
Examinatrice
Encadreur

Année Universitaire : 2020/2021

Remerciements

Nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé, la patience et la volonté d'entamer et de réaliser ce modeste travail.

Ce mémoire ne serait pas aussi riche et n'aurait jamais vu le jour sans le soutien et les encouragements de notre encadreur qui a su être présent aux moments opportuns et ainsi apporter son aide à chaque fois que le besoin se faisait sentir, **Monsieur AKSAS Ali** que nous tenons à remercier et à exprimer toute notre reconnaissance ici.

Nous voudrions également exprimer nos vifs remerciements à **Madame BENDALI Farida** pour son aide, ses conseils et sa patience.

Nous sommes conscientes de l'honneur que nous fait la présidente du jury **Madame YAHIAOUI Houa** d'avoir bien voulu juger ce travail, et d'accepter la présidence du jury de ce mémoire. Nos remerciements s'adressent aussi à **Madame BOUKTIT Nadia** pour avoir accepté d'évaluer et d'examiner notre travail et faire partie de notre jury.

Merci à tous le personnel de la Faculté des sciences de la Nature et de la Vie en général, et aux membres du département de Microbiologie et les ingénieurs de laboratoire en particulier, ainsi qu'à tous les enseignants pour les peines et les efforts qu'ils se sont donnés durant notre formation.

Nos profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidées et soutenues de près ou de loin, en particulier notre ami Rayane.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

*La lumière de ma vie, Mes chers parents qui m'ont
toujours soutenue avec leur disponibilité et
encouragements tout au long de mon parcours.*

Ma sœur et mes frères.

*Mon fiancé pour ses conseils et son soutien.
Mes très chères amies à qui je souhaite plus de
succès.*

*A la mémoire de ma grand-mère et ma chère amie,
qu'Allah les accueille dans son vaste paradis.*

Mon binôme Farah.

*A toutes les personnes qui m'ont encouragée ou
aidée tout au long de mes études.*

A tous ceux qui me sont chers.

Melle Khelil Fatma

Dédicaces

MAMAN, Une grande dame, une reine, ma mère, une maman formidable que j'aime énormément. Une mère géniale, mon plus précieux repère. Mon amour pour toi peut être difficilement exprimé avec des mots. Je suis heureuse que tu m'aies mis au monde. J'ai un énorme respect pour toi et tout ce que tu fais pour la famille. Je sais que tu fais ton possible pour nous et je t'en suis reconnaissante. Tu me supporte dans mes projets, tu me pousses à progresser et tu m'apprécies telle que je suis. Ma vie ne serait pas pareille sans toi et j'espère que tu continueras à guider mes pas pour longtemps.

PAPA, Merci pour ta gentillesse, ton soutien, ton humour et ton originalité qui ont bercé mon enfance. Merci de m'avoir tant aimée quand j'étais petite, puis supportée à l'adolescence ! Merci d'avoir été toujours là, Je te dois la vie, je te dois mon goût du bonheur

Tu es pour moi le meilleur des pères, le meilleur des papas.

Ma grande sœur **SONIA**, Merci de me suivre et de m'encourager dans mes projets et dans mes rêves les plus fous ; tu me fais toujours sentir que tu es derrière moi et que tu crois en moi et ton support fait une grande différence dans ma vie. Merci de m'aimer telle que je suis, avec mes défauts et mes qualités et de me prouver à quel point tu tiens à moi de mille et une façons; tes façons à toi, rien qu'à toi. Merci d'être là pour moi et d'être la grande sœur que tu es; sache que je te promets de toujours être là pour toi en retour.

Mon frère **ANIS**, merci pour les délires et les sourires, j'adore quand tu essaies de me faire rigoler ! Même si ça ne marche pas toujours, après toutes ces années, je réalise vraiment ce que signifie avoir un frère et je me sens moins seul de te savoir là!

Mes petites sœurs **YASMINE** et **INES**, merci pour les rires, les petits plaisirs, merci d'être si merveilleuses, et d'enseigner tous les jours de vos sourires.

Mon neveu **ELIAN**, Tu es une telle joie d'avoir un neveu, et je ne peux pas croire la quantité d'amour que j'ai pour toi. Je promets d'être toujours une bonne tante te dorloter et te chouchouter infiniment.

Mes **AMIS**, mes complices, c'est un vrai bonheur de vous avoir dans ma vie. On peut rire de tout, sans jamais se moquer. On peut se confier, sans jamais se juger. On peut passer du temps ensemble, sans jamais s'ennuyer. Les paroles sont inutiles entre nous, notre complicité étant évidente.

Je remercie tout particulièrement **Fatma**, ma partenaire de mémoire, ma binôme, mon amie... sans qui rien n'aurait été pareil. Cette année fut riche en émotions et je tiens à te remercier pour ton soutien et ce lien tout particulier qui s'est créé entre nous.

Melle Allouache Farah

Liste des abréviations

GRAS Generally Reconized As Safe

GA Gomme Arabique

Iota-carra *iota-carraghénane*

Liste des figures

Figure 1: Applications des probiotiques et leur mode d'action	4
Figure 2: Types de capsules	7
Figure 3: Schéma représentant la méthode de séchage par pulvérisation	8
Figure 4: Schéma représentant la méthode du pan coating	9
Figure 5: Schéma représentant la méthode de revêtement sur lit fluidisé	10
Figure 6: Schéma représentant la méthode d'extrusion	11
Figure 7: Schéma représentant la méthode d'émulsion.	11
Figure 8 : Schéma de l'encapsulation par la technique d'évaporation de solvant.....	13
Figure 9 : Structure chimique de l'alginate.	15
Figure 10 : Structure chimique du chitosane	17
Figure 11 : Structure chimique de l'amylopectine et de l'amylose	18
Figure 12 : Aspect des billes de la souche <i>Pediococcus acidilactici</i> dans l'iota-carraghénane	26
Figure 13 : Aspect des billes formées par la technique d'émulsion.	27

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des probiotiques	3
Tableau II : Techniques d'encapsulation.....	14
Tableau III : Solutions du carraghénane préparées.	22
Tableau IV : Etat du polymère à différentes concentrations à 40°C.	22
Tableau V : Etat des capsules formées avec les deux solutions de coagulation.....	23
Tableau VI : Etat du polymère avec l'eau distillée et avec l'eau physiologique.	24
Tableau VII: Taux d'encapsulation (%) obtenu par la technique d'extrusion.....	27

Table de matières

Introduction.....	1
I. Probiotiques.....	2
1. Historique et définition.....	2
2. Classification.....	2
3. Domaines d'application.....	3
3.1.Applications en aquaculture.....	3
3.2.Applications en aviculture.....	4
3.3. Applications en clinique.....	4
ii. Bactéries lactiques.....	5
1. Définition.....	5
2. Classification.....	5
3. Encapsulation.....	6
3.1. Définition.....	6
3.2. Objectifs de l'encapsulation.....	6
3.3. Types de capsules.....	7
3.4. Techniques d'encapsulation.....	8
3.4.1. Techniques physiques.....	8
3.4.2. Techniques chimiques.....	11
3.4.3. Techniques physico-chimiques.....	12
3.5. Polymères utilisés dans l'encapsulation.....	14
3.6. Critères de sélection d'une technologie d'encapsulation.....	19
iii. Matériel.....	20
1. La souche utilisée.....	20

2. Milieu de culture et polymère.....	20
iv. Méthodes.....	20
1. Revivification et isolement de la souche bactérienne:	20
2. Repiquage.....	20
3. Dénombrement	21
4. Préparation des solutions CaCl ₂ ,KCl et carraghénane :.....	21
5. Préparation de la souche probiotique pour l'encapsulation.....	23
6. Test d'encapsulation dans le carraghénane (1,3%) par emulsion	24
7. Encapsulation de la souche dans le carraghénane par extrusion.....	24
8. Dénombrement après encapsulation.....	25
v. Résultats et discussion.....	26
1. Extrusion	26
2. Emulsion	26
3. Rendement de l'encapsulation	27
4. Effet des cations sur la gélification du carraghénane.....	28
conclusion	29

Références bibliographiques

Annexe
Résumé

Introduction

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte lorsqu'ils sont ingérés en nombre suffisant (FAO/WHO 2002 ; Shori 2017). En principe, leurs mécanismes d'action sont essentiellement basés sur le maintien de l'intégrité intestinale, la stabilisation de l'écosystème du microbiote, l'antagonisme aux bactéries pathogènes, la modulation immunitaire et la promotion de la santé en général y compris la réduction des signes de diarrhée et l'amélioration des performances de croissance de l'organisme (Musa 2009 ; Bermudez-Brito et al. 2012).

La survie des bactéries probiotiques dans un produit au moment de la consommation est un facteur important pour leur rentabilité et efficacité car elles doivent subsister au cours de la transformation et de la durée de stockage des aliments et des compléments, transiter par les fortes conditions d'acidité dans l'estomac et les enzymes et les sels biliaires dans l'intestin grêle, tout en étant capable de coloniser et de maintenir l'activité métabolique dans le tractus intestinal humain (Collins, et al. 1998 ; Saarela et al. 2000 ; Gbassi et Vandamme. 2012).

L'encapsulation est parmi les voies qui peuvent améliorer la résistance des microorganismes probiotiques aux conditions défavorables (Kim et al. 2017 ; Rodrigues et al. 2017), réduisant ainsi les pertes de cellules des micro-organismes encapsulés dans les matrices d'accueil.

Actuellement, différentes techniques d'encapsulation des probiotiques permettent d'obtenir des particules de différentes propriétés (Cavalheiro et al. 2015) et parmi les principales techniques employées, on cite l'extrusion (Krasaekoopt et Watcharapoka, 2014 ; Rodrigues et al. 2017 ; Kim et al. 2017 ; Silva et al. 2018; Dimitrellou et al. 2019), l'émulsion (Zhang et al. 2016 ; van der Ark et al. 2017 ; Raddatz et al. 2020), et bien d'autre encore dont : le spray drying, coacervation, revêtement sur lit fluidisé, etc. (Rodrigues, 2020).

Diverses matrices alimentaires composées de polysaccharides, de protéines et des lipides ont été utilisées pour immobiliser les probiotiques (Rajam et Anandharamakrishnan, 2015 ; Rodrigues et al. 2017 ; Arslan-Tontul et Erbas 2017). Des polysaccharides naturels comme l'alginate, la gomme, le carraghénane et l'amidon sont les matériaux les plus exploités et les plus utilisés pour l'encapsulation des cellules probiotiques (Nami et al. 2017 ; Rodrigues et al. 2017; Rodrigues et al. 2018).

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail est d'encapsuler *Pediococcus acidilactici*, une bactérie lactique probiotique dans une matrice d'*iota*- carraghénane.

Synthèse bibliographique

I. Probiotiques

1. Historique et définition

Depuis l'antiquité, les produits laitiers étaient très consommés et servaient à des fins thérapeutiques (Shortt 1999). En 76 avant J.-C., les produits laitiers fermentés étaient préconisés par l'historien romain Pline comme remède contre la gastro-entérite (FAO/WHO 2002). En 1907, Eli Metchnikoff a rapporté la première approche scientifique reconnaissant le rôle positif de quelques bactéries (FAO/WHO 2001). Il a stipulé que "les microorganismes apportés par les aliments peuvent modifier la flore intestinale et remplacer les microorganismes nuisibles" (Angahar 2016).

En 1965, le terme « probiotique » qui dérive du grec et qui signifie littéralement "pour la vie" a été utilisé pour la première fois par Lilley et Stillwell pour décrire les substances sécrétées par un micro-organisme et qui stimulent la croissance d'un autre microorganisme (Khalighi et al. 2016). En 1974, Parker changea cette définition par "microorganismes et substances qui contribuent à l'équilibre microbien intestinal" (Khalighi et al. 2016).

La définition des probiotiques la plus acceptée et proposée par la FAO/OMS est la suivante : "microorganismes vivants qui, lorsqu'administrer en quantités adéquates, confèrent un avantage pour la santé de l'hôte"(FAO/WHO 2002).

Les micro-organismes probiotiques doivent présenter certaines propriétés pour exercer des effets thérapeutiques maximaux. Parmi ces caractéristiques, certaines sont considérées comme presque essentielles pour qu'un probiotique ait des effets thérapeutiques, notamment la stabilité aux acides gastriques et aux sels biliaires, la capacité d'adhérer à la muqueuse intestinale et la capacité de coloniser le tractus intestinal (Khalighi et al. 2016).

2. Classification

Actuellement, Il existe de nombreux microorganismes différents utilisés en tant que probiotiques, (tableau I) (Khalighi et al. 2016). Les probiotiques doivent être identifiés par leur genre, espèce et leur souche. La plupart des probiotiques utilisés en clinique sont des espèces appartenant à trois genres: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Saccharomyces* (Mizock 2015).

Tableau I: Classification des probiotiques(Khalighi et al. 2016)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Acidophilu ssp</i> <i>plantarum</i> <i>rhamnosus</i> <i>paracasei</i> <i>fermentum</i> <i>reuteri</i> <i>johnsonii</i> <i>brevis</i> <i>casei</i> <i>lactis</i> <i>delbrueckii gasseri</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i> <i>infantis</i> <i>longum</i> <i>bifidum</i> <i>thermophilum</i> <i>adolescentis</i> <i>animalis</i> <i>lactis</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Coagulants</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Thermophilus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Faecium</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>Cerevisiae</i>

3. Domaines d'application

Les probiotiques sont utilisés dans de nombreux domaines, parmi leurs applications on trouve :

3.1. Applications en aquaculture

Les applications des probiotiques en aquaculture sont très nombreuses. Ils peuvent servir de bioprophylaxie, biothérapeutique, améliorateur de la qualité de l'eau, promoteur de croissance des espèces aquatiques et améliorateur de leurs performances, améliorateur de la qualité des graines de poisson (la semence), améliorateur immunitaire, accélérateur de la digestion, améliorateur de l'utilisation des nutriments comme anti-stress en aquaculture (Angahar 2016).

3.2. Applications en aviculture

En élevage de volaille, les probiotiques peuvent servir à :

- L'amélioration du poids et de l'indice de consommation (Choudhary et al.2008);
- L'augmentation de la production d'œufs, l'amélioration de leur qualité et la réduction de leur contamination par les microorganismes (Haddadin et al.1996;Kurtoglu et al. 2004; Van Immerseel et al.2006) ;
- La stimulation de l'immunité (Khan et al. 2013) ;
- L'amélioration de la solidité des os (Khan et al. 2013) ;

3.3 Applications en clinique

L'utilisation des probiotiques dans le domaine clinique présente un grand intérêt pour leurs bienfaits sur la santé. Parmi les propriétés d'élite des probiotiques, on trouve l'anti-pathogénicité, l'activité anti-diabétique, anti-obésité, anti-inflammatoire, anti-cancéreuse, anti-allergique et angiogénique, ainsi que leur effet sur le cerveau et le système nerveux central (Kerry et al. 2018).

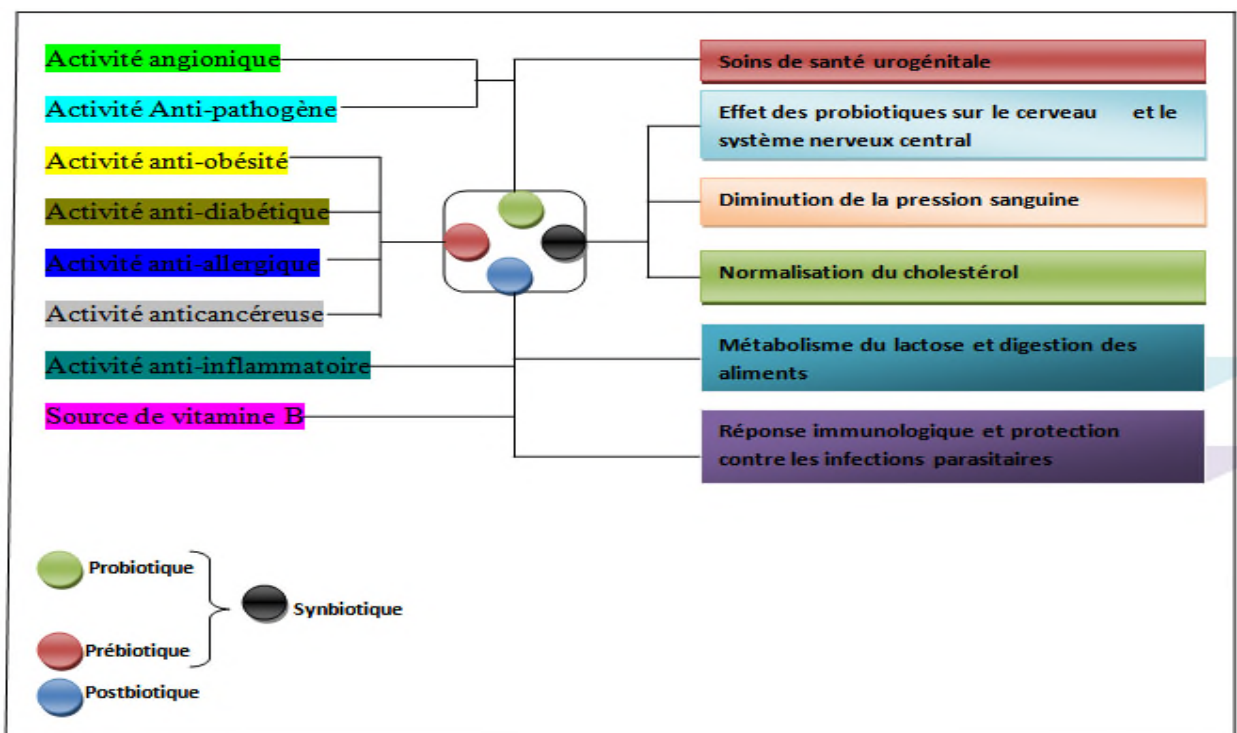


Figure 1: Applications des probiotiques et leur mode d'action (Kerry et al.2018).

II. Bactéries lactiques

1. Définition

Les bactéries lactiques comprennent un groupe diversifié de bactéries ubiquitaires distribuées dans différentes niches écologiques et milieux naturels. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples, comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales (les voies génitales, intestinales et respiratoires), dans le sol, les engrais et les eaux usées (Savadogo *et al.* 2006 ; König et Fröhlich 2017).

Les bactéries lactiques constituent un groupe diversifié d'organismes Gram positifs, non sporulés, non mobiles, en forme de bâtonnets ou de coccus, dépourvus de catalase.

Elles sont chimio-organotrophes et ne se développent que dans des milieux complexes. Les hydrates de carbone fermentescible et les alcools supérieurs sont utilisés comme source d'énergie pour former principalement de l'acide lactique (Savadogo *et al.* 2006).

2. Classification

La classification des bactéries lactiques a été initiée en 1919 par Orla Jensen et était jusqu'à récemment principalement basée sur des critères morphologiques, métaboliques et physiologiques (Savadogo *et al.* 2006).

Les méthodes actuelles utilisées pour la classification des bactéries lactiques reposent principalement sur l'analyse et le séquençage de l'acide ribonucléique ribosomal 16S (ARNr 16S). Sur la base de cette technique, les bactéries à Gram positif sont divisées en deux branches en fonction de leur teneur en (G + C)% (Savadogo *et al.* 2006) :

- La branche des actinomycètes avec une teneur en (G + C)% supérieure à 50%.
- Labranche de Clostridium avec une teneur en (G + C)% inférieure à 50%.

Les bactéries lactiques sont regroupées en **11** genres, dont les plus étudiés sont : *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (Givry 2006; Saad 2010).

Les pédiocoques sont à Gram positif, catalase négative et oxydase négative, et se développent dans des conditions allant de l'aérobie facultatif à la micro-aérophilie. Les souches de certaines espèces présentent toutefois une activité pseudo catalasique, surtout lorsqu'elles sont cultivées sur des milieux à faible teneur en glucides. Ils produisent de l'acide lactique comme un produit final majeur de la fermentation du glucose par la voie

d'Emden-Meyerhof. Les cellules sont uniformément sphériques et elles diffèrent de toutes les autres bactéries lactiques par une division alternée dans deux directions perpendiculaires, résultant en la formation de tétrades (Franz et al. 2014).

3. Encapsulation

3.1. Définition

L'encapsulation est un processus physico-chimique ou mécanique qui consiste à enrober une substance dans un matériau approprié afin de produire des particules sphériques avec une membrane semi-perméable mince mais solide ayant des diamètres de quelques nanomètres à quelques millimètres (Anal et Singh 2007 ; Chen et Chen 2007 ; Nedovic et al. 2011;Đorđević et al. 2015). La substance encapsulée peut être aussi appelée phase de noyau, de remplissage, active, interne ou de charge utile et elle peut être sous forme solide ou liquide. Le matériau d'encapsulation est également appelé revêtement, membrane, enveloppe, capsule, matériau de support, phase externe ou matrice (Frakolaki et al. 2021).

3.2. Objectifs de l'encapsulation

L'encapsulation permet d'immobiliser le principe actif, le protéger du milieu extérieur, contrôler et cibler sa libération et de le structurer (Boukhouya, 2019).

- **Immobiliser ou isoler**

L'immobilisation est souvent utilisée pour des cellules microbiennes (Yang 2007). Le confinement de ces cellules dans une membrane semi-perméable s'effectue par une isolation physique du milieu extérieur tout en maintenant un environnement interne adapté pour leur croissance (Poe et al. 2006).

- **Protéger**

Multiples composés actifs sont fragiles et doivent être protégés du milieu extérieur. Pour cela la technique d'encapsulation permet leur protection vis-à-vis des contraintes appliquées (Boukhouya 2019).

- **Contrôler la libération**

Dans la plupart des cas, l'encapsulation a pour but d'établir un profil de libération spécifique. Par exemple, l'industrie agroalimentaire utilise l'encapsulation afin de limiter l'évaporation des molécules volatiles et d'assurer une action prolongée (Specos et al. 2010).

- **Structurer**

L'encapsulation d'un composé liquide dans des particules solides permet d'obtenir une modification de l'état physique du composé actif qui passe de la forme liquide à la forme solide. Ce qui permet une homogénéisation simplifiée du mélange du composé actif initialement liquide au sein d'une poudre (Boukhouya 2019).

3.3. Types de capsules

En général, les capsules sont classées en trois types de base ; réservoir, matrice et matrice enrobée (Serna-Cock et Vallejo-castillo, 2013). La figure 2 schématise chacun des types.

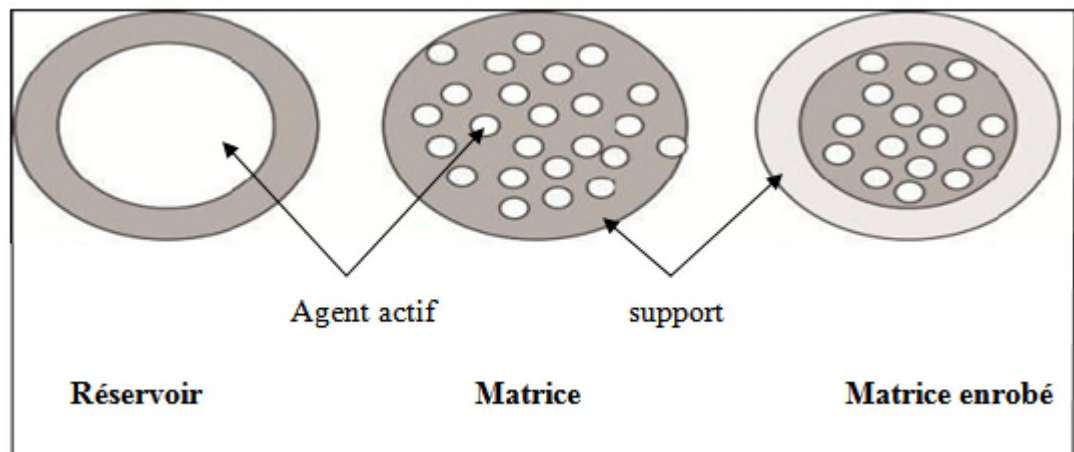


Figure 2: Types de capsules (Serna-Cock et Vallejo-castillo, 2013).

Le type réservoir à une couche autour du matériau du noyau. Le type matrice à l'agent actif dispersé sur le matériau support et peut également être trouvé sur la surface. Le troisième type est une combinaison entre les deux premiers types, appelée matrice enrobée ; dans laquelle l'agent actif est une capsule recouverte d'une couche supplémentaire (Serna-Cock et Vallejo-castillo 2013).

3.4. Techniques d'encapsulation

Les techniques d'encapsulation ont évolué, passant de la première séparation de phase par coacervation qui était relativement simple et ne permettait de fabriquer que des microcapsules, en comparaison avec les techniques actuelles, plutôt complexes, qui permettent de fabriquer à la fois des microcapsules et des nanocapsules en ajustant soigneusement les paramètres du processus. Le choix d'une technique détermine non seulement la taille mais aussi la morphologie et probablement la stabilité attendue des capsules visées (Ngwuluka *et al.* 2020).

3.4.1. Techniques physiques

- **Séchage par pulvérisation (Spray drying) :**

Le séchage par pulvérisation est une technique adaptée aux applications industrielles à grande échelle. Il est flexible, économique et facilement réalisable. Il consiste à uniformiser une suspension bactérienne par émulsion ou par dispersion avec le matériau d'encapsulation. Le mélange est ensuite introduit dans un atomiseur et pulvérisé à travers une buse (la chambre de séchage). Le solvant est évaporé après contact avec de l'air chaud ou du gaz. Des microcapsules séchées de type matriciel seront formées et recueillies dans le fond du séchoir (Figure 3) (Gibbs *et al.* 1999; Kailasapathy 2002 ; De Vos *et al.* 2010; Gharsallaoui *et al.* 2007; Rajam *et al.* 2012; Serna-Cock *et Vallejo-Castillo*, 2013).

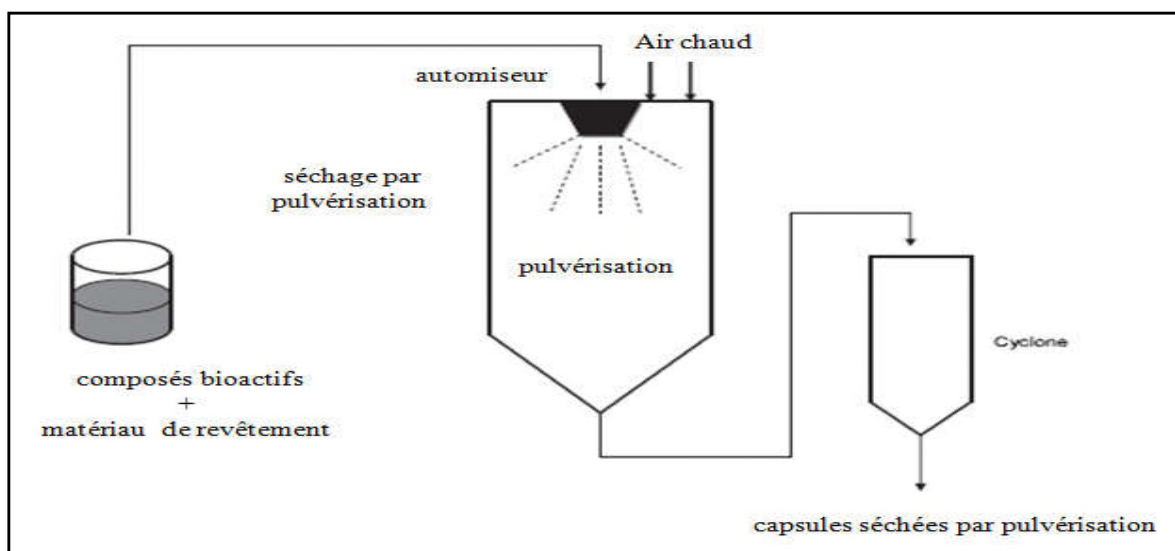


Figure 3: Schéma représentant la méthode de séchage par pulvérisation [De Vos *et al.*, 2010]

- **Pan coating :**

Le pan coating est une ancienne technique d'enrobage qui remonte au 18^{ème} siècle et traditionnellement utilisée pour appliquer des couches de sucre et de film sur des comprimés et des granulés mesurant plusieurs millimètres. Dans le domaine de l'encapsulation, elle est généralement utilisée pour les matériaux de base mesurant plus de 600 μm (Ngwuluka et al. 2020).

Le procédé consiste à appliquer une solution d'enrobage par pulvérisation sur le lit de granulés dans une cuvette d'enrobage rotative inclinée et équipée à l'intérieur de barres antidérapantes ou de lames inclinées qui permettent la circulation du matériau de base permettant la circulation du matériau central. L'air chaud à température ambiante est continuellement introduit et évacué par des tuyaux d'échappement pour faciliter le séchage de la solution d'enrobage. Les bacs d'enrobage peuvent être conventionnels ou ventilés avec des perforations qui permettent à l'air de séchage de s'échapper à travers le lit de poudre (Figure 4) (Frey 2015).

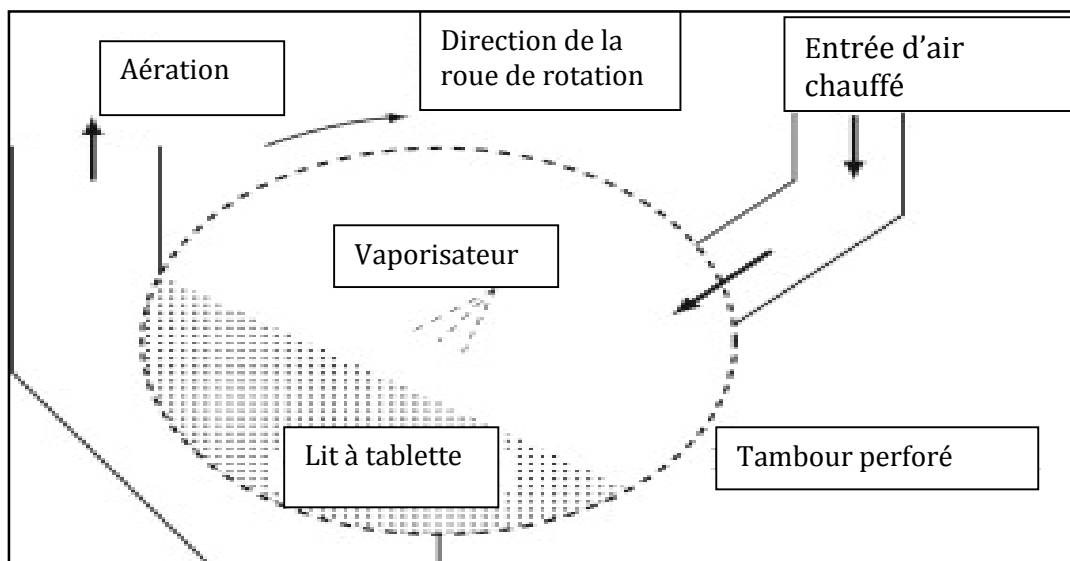


Figure 4:Schéma représentant la méthode du pan coating (Frey 2015).

- **Revêtement sur lit fluidisé :**

La méthode consiste à suspendre la suspension bactérienne dans un courant d'air chaud ou ambiant (en fonction de la solution de revêtement) et les molécules de matrice sont pulvérisées sur les composants bioactifs (des graisses, des protéines, des glucides et des émulsifiants) cela forme une capsule d'une taille qui varie de moins de 100 μm à 150

μm . (Figure 5). En outre, il est utile d'appliquer une couche supplémentaire de molécules pour une libération ciblée dans l'intestin (De Vos et *al.* 2010 ; Nedovic et *al.* 2011).

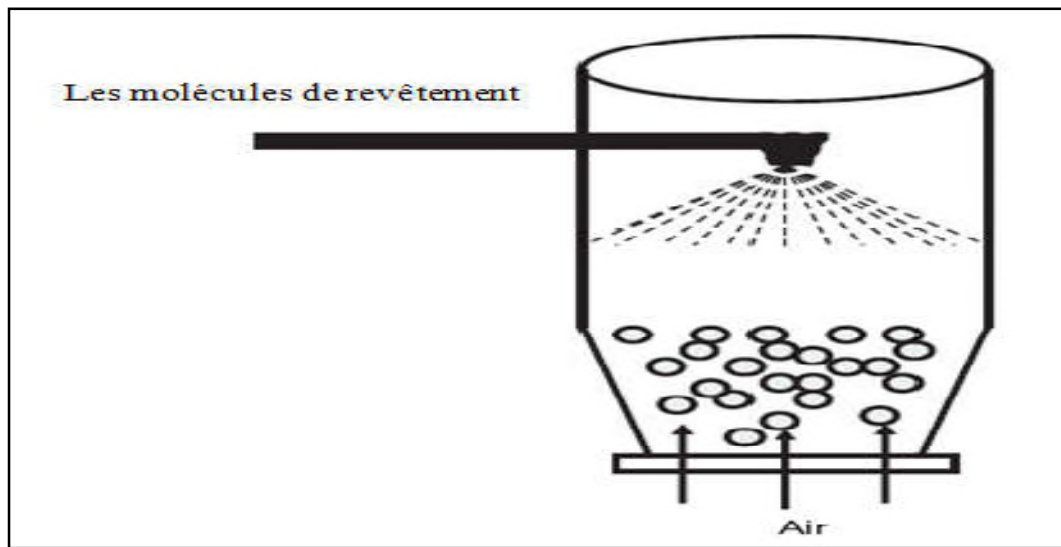


Figure 5: Schéma représentant la méthode de revêtement sur lit fluidisé (De Vos et *al.* 2010)

- **Extrusion :**

Très utilisée pour encapsuler des cellules bactériennes, la technique d'extrusion est simple et facile à réaliser, peu coûteuse. En plus d'être un processus assez doux, il garantit une viabilité élevée des cellules encapsulées (Krasaekoopt et *al.* 2003 ; Rodrigues et *al.* 2017). Cette technique consiste en l'utilisation de solutions hydrocolloïdes comme l'alginate contenant des cultures microbiennes qui sont expulsées sous forme de gouttelettes par une seringue dans une solution d'un agent de réticulation tel que le chlorure de calcium (De Vos et *al.* 2010) aboutissant à la formation de perles de diamètre allant de 500 μm à 3 mm (Figure 6) (Etchepare et *al.* 2015).

La taille des particules formées dépend du diamètre de l'aiguille utilisée pour égoutter la solution, de la viscosité et de la concentration de la solution hydrocolloïde, outre la distance entre la seringue et la solution de l'agent de réticulation (Rathore et *al.* 2013 ; Riaz et Masud 2013). Une concentration et une viscosité plus élevées de la solution d'encapsulation donnent des perles plus petites (Riaz et Masud 2013).

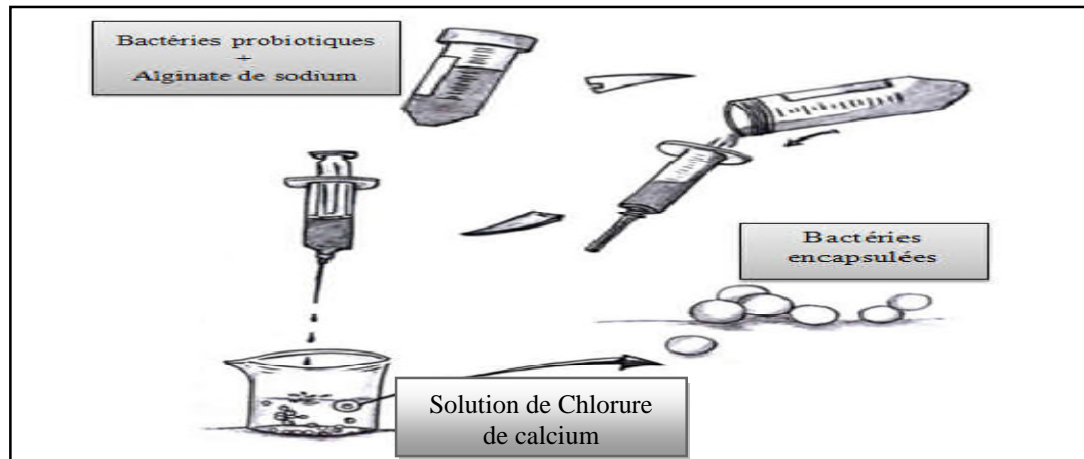


Figure 6: Schéma représentant la méthode d'extrusion (Serna-Cock et Vallejo-Casti. 2013)

3.4.2. Techniques chimiques

- **Emulsion :**

Les émulsions sont des systèmes formés par la dispersion de fines gouttelettes d'un liquide dans un autre. Les deux liquides appelés phase dispersée et phase continue sont non miscibles et il s'agit le plus souvent d'une solution aqueuse de cellules/polymère et d'une solution huileuse de plus grand volume (huile végétale) (Rathore et *al.*, 2013; Ozyurt et Ötles., 2014)

Le raffermissement des capsules est obtenu en abaissant la température ou en ajoutant une solution gélifiante telle que le chlorure de calcium sous agitation magnétique (Figure 7). Par la suite, la gélification est lancée en abaissant le pH par utilisation d'un acide liposoluble (Etchepare et *al.* 2015). La taille des billes résultantes est influencée par la concentration et la viscosité du mélange d'encapsulation avant la gélification, la vitesse d'agitation et le type d'émulsifiant utilisé (Riaz and Masud. 2013).

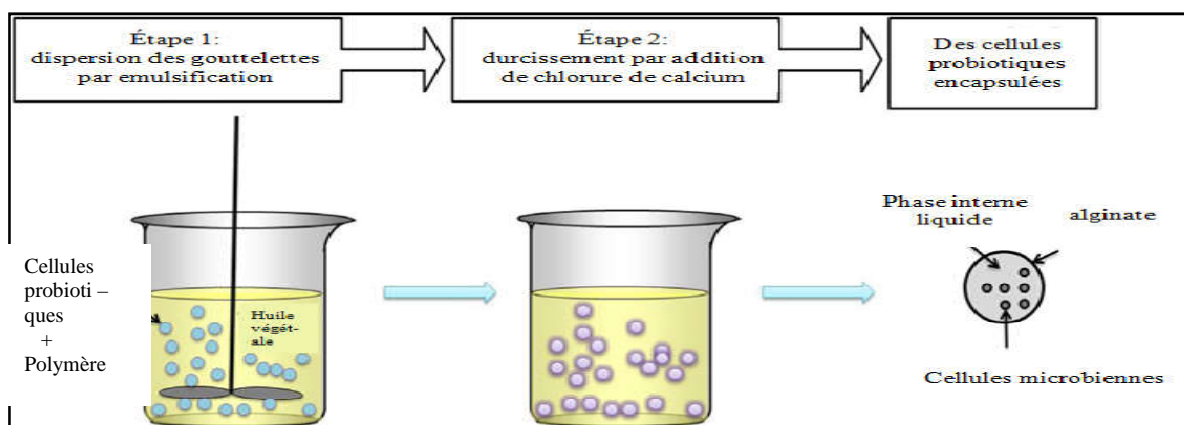


Figure 7: Schéma représentant la méthode d'émulsion (Burgain, 2011).

3.4.3. Techniques physico-chimiques

- **Coacervation :**

La coacervation est une séparation de phase d'un système colloïdal en deux parties liquides, l'une riche en colloïdes (coacervat) et l'autre pauvre en colloïdes (Martins *et al.* 2009). Cette séparation peut être provoquée par des changements de pH, de force ionique, de température, ou de type de solvant. (Corrêa-Filho *et al.* 2019).

Les processus de séparation de phase sont divisés en coacervation simple et complexe. La coacervation simple implique l'utilisation d'un seul polymère tel que la gélatine ou l'éthylcellulose, dans un milieu aqueux ou organique, respectivement. La coacervation complexe implique deux matériaux polymères de charge opposée, comme la gélatine et l'acacia, tous deux solubles dans un milieu aqueux (Gibbs *et al.* 1999; Aloys *et al.* 2016).

Le schéma général du processus de coacervation consiste en trois étapes qui se déroulent sous agitation continue : la séparation de phase, le dépôt et la solidification. La première étape consiste en la formation d'une émulsion huile-dans-eau, par dispersion de l'huile dans une solution aqueuse contenant un hydrocolloïde tensio-actif tel que l'alginate ou le chitosane. La seconde étape consiste en la formation du revêtement. Dans ce cas, la phase riche en colloïdes entoure les cœurs des microcapsules dispersées et forme une enveloppe visqueuse autour des microcapsules. La dernière étape est la stabilisation de la couche ou le durcissement du revêtement, par réticulation thermique ou par effet de solvant (Martins *et al.* 2009).

Le plus petit diamètre des particules pouvant être obtenu par coacervation simple est de 20 μm tandis que celui de la coacervation complexe peut aller de 1 μm à 500 μm (do Amaral 2019).

- **Evaporation de solvant /extraction de solvant :**

La formation de capsules par évaporation de solvant /extraction de solvant (Yamakawa *et al.* 1992 ; Bodmerier *et al.* 1987) est habituellement accomplie en utilisant un polymère de polyester hydrophobe. Celui-ci est dissout dans un solvant organique volatile non miscible à l'eau, tel que le dichlorométhane ou le chloroforme, dans lequel le matériau de base est à son tour dissous ou dispersé. Le site de solution résultant est ajouté goutte par goutte à une solution aqueuse agitée contenant un stabilisateur approprié tel que l'alcool polyvinylique pour former de petites gouttelettes de polymère contenant le matériau encapsulé (Dubey, 2009).

Avec le temps, les perles sont solidifiées pour produire les microcapsules de polymère correspondantes. Ce processus de durcissement est réalisé en éliminant le solvant des gouttelettes de polymère soit par évaporation du solvant (par la chaleur ou une pression réduite), soit par extraction du solvant (avec un troisième liquide qui est un précipitant pour le polymère et qui est miscible à l'eau et au solvant). Un schéma illustratif est représenté dans la figure 8.

L'extraction par solvant produit des capsules dont la porosité est plus élevée que celles obtenues par évaporation du solvant (Dubey, 2009).

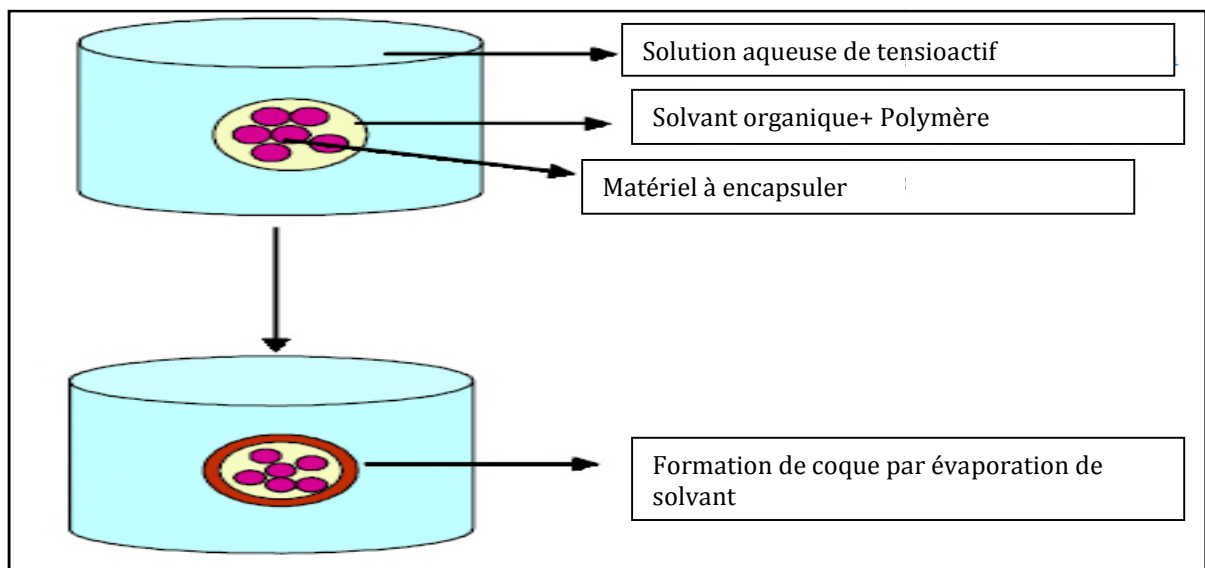


Figure 8 : Schéma de l'encapsulation par la technique d'évaporation du solvant (Dubey, 2009)

- **Polyélectrolyte couches multiples :**

Dans ce procédé, des multicouches de poly-électrolytes sont préparées en immergeant progressivement un substrat dans des solutions de poly-électrolytes chargés positivement et négativement, selon une procédure cyclique. Des particules noyau/enveloppe de taille et de propriétés adaptées sont préparées en utilisant des particules colloïdales comme matériau de base servant de modèle sur lequel des multicouches sont fabriquées. Des capsules creuses de particules inorganiques, organiques ou hybrides peuvent être obtenues en dissolvant le matériau de base. Cette méthode est à la fois polyvalente et simple avec l'épaisseur du film multicouche étant contrôlée avec précision en faisant varier le nombre total de couches déployées (Dubey2009).

Synthèse bibliographique

D'autres techniques d'encapsulation et de microencapsulation que celles citées ci-dessus sont aussi utilisées selon le principe actif, la matrice enrobante et le type de la capsule. Les techniques les plus importantes et les plus courantes, à titre indicatif, sont citées dans le Tableau II (Ngwuluka et al. 2020).

Tableau II : Techniques d'encapsulation (Ngwuluka et al. 2020).

Techniques physiques /mécaniques /thermiques				<i>Techniques Physico chimiques</i>	<i>Techniques chimiques</i>
<i>Enrobage</i>	<i>Atomisation</i>	<i>Extrusion</i>	<i>Thermique</i>	<i>Coacervation</i>	<i>Polymérisation</i>
Poêle enrobage		Buse stationnaire Extrusion centrifuge	Séchage par pulvérisation Refroidissement par pulvérisation	Dépôt couche par couche Evaporation du solvant	Suspension
Revêtement en lit fluidisé	Disque tournant	Buse vibrante/jet annulaire (coextrusion) Electrohydrodynamique Microextrusion Extrusion simple ou double vie	Gel de pulvérisation Inversion de phase	Extraction par solvant Inclusion moléculaire Sol-gel	Emulsion Interfacial

3.5. Polymères utilisés dans l'encapsulation

Pour l'encapsulation des bactéries d'intérêt, les supports utilisés devraient être doux et non toxiques que ce soit pour les cellules encapsulées ou pour la santé du consommateur (reconnu comme GRAS) , ils forment une barrière entre l'agent actif et son environnement pour le protéger des dommages causés par les facteurs externes, qu'ils soient biodégradables, biocompatibles, facilement accessibles ou résistants lors de la préparation, l'entreposage et le transport du produit dans lequel il sera incorporé(Serna-Cock et Vallejo-Castillo 2013).

Plusieurs études ont été menées sur les polymères pour l'encapsulation des probiotiques et les plus couramment utilisés sont :

a- Polysaccharides

L'alginate de sodium, le carraghénane, la gomme arabique, le chitosane, les dextrans, l'amidon, l'agar et la cellulose sont les principaux supports utilisés lors du procédé d'encapsulation (Serna-Cock et Vallejo-Castillo 2013).

- **Alginate**

L'alginate de sodium est le matériau le plus utilisé pour l'encapsulation des probiotiques, c'est un hétéro polysaccharide naturel extrait des algues brunes et de certaines bactéries telles que *Azotobacter vinelandii* et plusieurs espèces du genre *Pseudomonas*. C'est un polymère linéaire composé des acides β -D-manuronique et α -L-guluronique lié par des liaisons de type β 1-4 (Kamalian, 2014 ; Meiners 2010 ; Soma et al. 2009 ; Petrović et al. 2007).

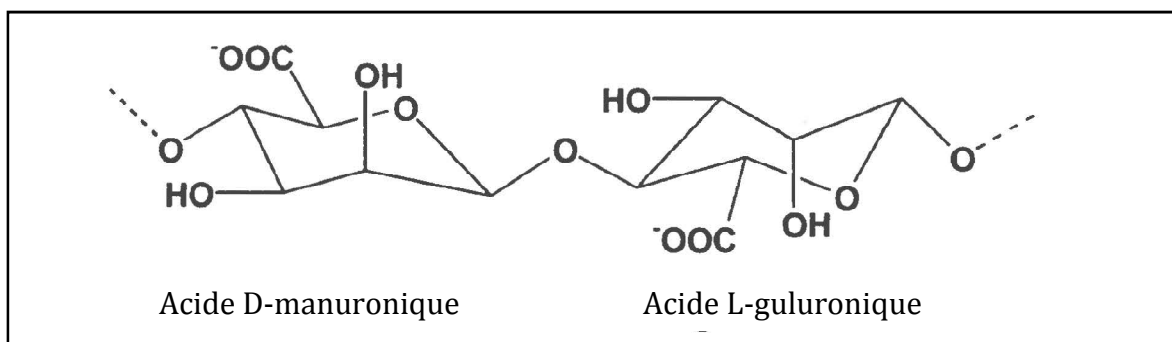


Figure 9 : Structure chimique de l'alginate (Islam et al. 2010).

Les propriétés fonctionnelles de l'alginate comme matériau de revêtement sont particulièrement liées à la composition et à la séquence de ces deux acides (Chávarriet al 2010).

L'alginate de sodium a été largement utilisé avec succès depuis de nombreuses années dans l'industrie alimentaire comme agent épaississant, comme stabilisateur colloïdale et aussi comme agent gélifiant en raison de sa capacité à former des hydrogels (des billes) avec des cations divalents tels que Ca^{+2} , Ba^{+2} , Sr^{+2} dans des conditions modérées. L'hydrogel est formé parce que les blocs d'acide guluronique se lient aux cations, ce qui donne un réseau tridimensionnel de filaments d'alginate qui sont maintenus ensemble avec des interactions ioniques (Serna-Cock et Vallejo-Castillo 2013).

En plus d'être facile à manipuler (simplicité), capable de former une matrice hautement polyvalente, biocompatible et non-toxique pour la protection des composants actifs, et des cellules sensibles à la chaleur, au pH, à l'oxygène et d'autres facteurs dans lesquels les aliments sont exposés pendant son traitement et son stockage (Etchepare et al.2015), l'alginate de sodium permet la livraison des cellules prises en piège dans l'intestin humain ce qui ne peut être qu'un autre avantage.

- **Carraghénane**

Le carraghénane est un polysaccharide linéaire naturel extrait d'algues rouges. Elle a une masse moléculaire élevée, elle est constituée de répétitions d'unités de 3,6 anhydrogalactose, à la fois sulfaté et ester-sulfaté, rejoints par une alternance de liaisons α -1,3 et β -1,4glycosidiques. Divers arrangements se produisent naturellement dans ces composants et créent trois types de base de carraghénane(Mosilhey, 2003).

Ces polymères sont traditionnellement identifiés par des préfixes grecs, *kappa*, *iota* et *lambda*-carraghénanes. Ce dernier est utilisé pour augmenter la viscosité des produits tandis que les deux premiers sont reconnus pour leur capacité à former des gels mais les plus utilisés sont les *Kappa*-carraghénanes (Van De Velde *et al.* 2002)

Les températures élevés (de 60°C à 80°C) sont nécessaires pour dissoudre le polymère à des concentrations allant de 2% à 5%, même s'il y a des différences entre chaque type de carraghénane, toutes sont solubles à des températures élevées et sont stables au-dessus de pH 4,5. La formation de gel en utilisant ce polymère se fait par le changement de température. La suspension cellulaire est mélangée avec la solution de ce polymère stérilisé à 40-50°C et le mélange est rajouté par la suite goutte par goutte à une solution de KCl ou de CaCl₂ à la température ambiante afin de former des billes de carraghénane bien distinguées. (Soma et al. 2009; Anal et Singh 2007).

- **Gomme arabique**

La gomme arabique (GA) est un exsudat de tiges et de branches de l'arbre *Acacia Senegal*, c'est un arabinogalactan(Espinosa-Andrews et al. 2007). Elle est composée d'arrangements ramifiés de sucres simples et de protéines (2%) (Rokka et Rantamiiki 2010). C'est un agent efficace d'encapsulation des probiotiques en raison de sa solubilité dans l'eau, sa faible viscosité pour des solutions concentrées par rapport à d'autres

gommes d'hydrocolloïdes, sa capacité d'agir en tant qu'agent émulsifiant et par rapport à la plupart des autres polysaccharides, la gomme d'acacia est extrêmement résistante aux divers traitements physico-chimiques, en particulier dans des conditions acides (Mosilhey, 2003).

- **Chitosane**

Le chitosane est un biopolymère polysaccharidique, le produit N-désacétylé de la chitine qui se trouve dans la paroi cellulaire des champignons. Ce polysaccharide est bon marché, possède d'excellentes propriétés adhésives aux cellules (biocompatible), soluble dans l'eau dans des conditions acides ($\text{pH} < 6$) (Sankalia et al. 2007), biodégradable par la microflore du colon et non-toxique pour les cellules humaines mais sa propriété antibactérienne a limité son utilisation comme un matériau de revêtement pour l'encapsulation des probiotiques. Le chitosane est souvent utilisé en combinaison avec l'alginate comme revêtement afin de modifier la vitesse de diffusion des substances encapsulées ou en tant qu'additif pour la modification de la structure des billes (Lee et al. 2004; And et Kailasapathy 2005) de ce fait les systèmes chitosane-alginate améliorent la stabilité des billes d'alginate et augmentent la viabilité des microorganismes probiotiques encapsulés (Chàvarri et al. 2010 ; Soma et al. 2009 ; Anal et Singh 2007 ; Kailasapathy 2002).

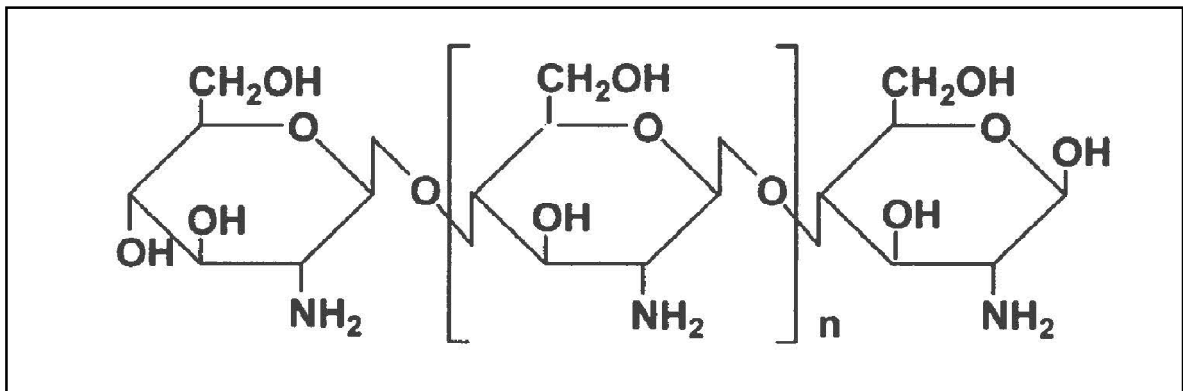


Figure 10 : Structure chimique du chitosane (Islam et al., 2010).

- **Amidon**

L'amidon est un polysaccharide généralement transparent, inodore, insipide et incolore constitué d'un grand nombre d'unités de D-glucose réunies par des liaisons glucosidiques. Les granules d'amidon contiennent l'amylose et l'amylopectine, qui peuvent former des solutions et des gels (Rokka et Rantamäki 2010 ; Pavli et *al.* 2018). Ce polymère présente des avantages qui constituent un atout pour son utilisation en microencapsulation des probiotiques, dont sa capacité à atteindre le colon où il sera fermenté et son utilisation par la suite par les bactéries probiotiques dans le gros intestin en plus de la facilité d'adhérence de certaines bactéries à ce dernier ce qui permet l'amélioration de la rétention des probiotiques viables et métaboliquement actifs dans le tractus intestinal (Burgain et *al.* 2011).

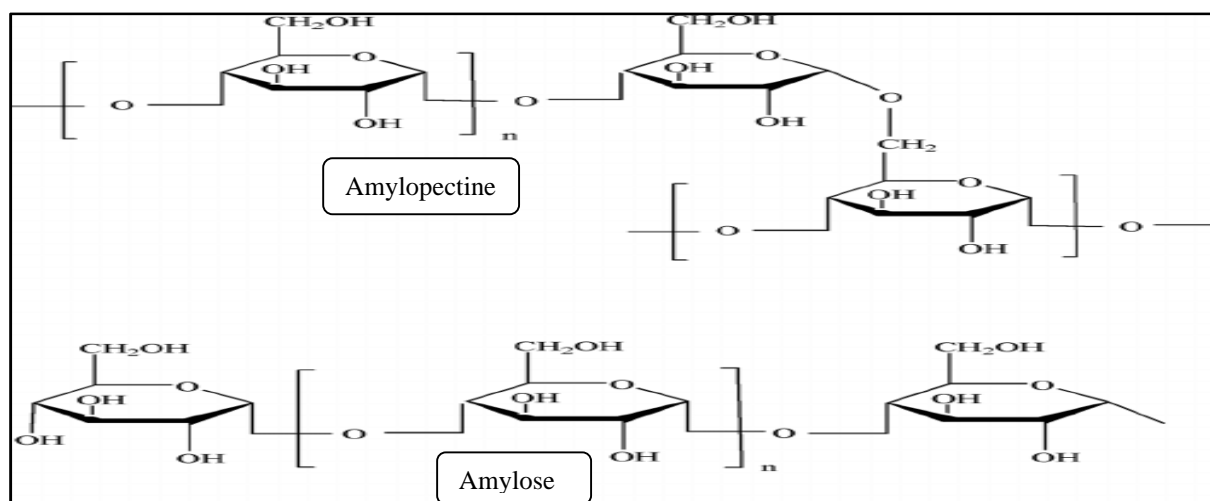


Figure 11 : Structure chimique de l'amylopectine et de l'amylose (Tester et al. 2004).

- **Gélatine**

La gélatine a une structure très particulière et des propriétés polyvalentes fonctionnelles. Lorsqu'elle est mélangée avec l'eau froide, elle forme un gel colloïdal semi-solide. Comme l'amidon, la gélatine ne forme pas de billes. En raison de sa nature amphotère, la gélatine pourrait être combinée avec d'autres polymères tels que la gomme de géllane comme matrice pour la microencapsulation (Anal et Singh 2007 ; Rokka et Rantamaki 2010).

b- Lipides

Les lipides utilisés dans l'encapsulation comprennent les cires naturelles, les huiles végétales et les acides gras. Ces composés marquent certains désavantages concernant leur application, montrant des instabilités mécaniques et chimiques ainsi qu'une diminution de la qualité organo-lipidique c'est pourquoi ils sont généralement appariés avec d'autres matériaux tels que les polysaccharides et les protéines (Pavli *et al.* 2018).

c- Protéines

Le gluten, la caséine, les protéines du lactosérum et l'albumine sont les protéines d'encapsulation les plus utilisées (Serna-Cock et Vallejo-Castillo 2013).

3.6. Critères de sélection d'une technologie d'encapsulation

Pour apporter les avantages désirés de l'encapsulation, il faut étudier soigneusement la conception d'encapsulation (Solanki *et al.* 2013), soient :

- Etudier les caractéristiques physicochimiques du principe actif ;
- Etudier les conditions de traitement appliquées au cours de la production ou la transformation des aliments ;
- Avoir une idée sur la façon dont les encapsulés sont stockés avant leur utilisation ;
- Analyser les conditions de stockage du produit alimentaire qui contient les encapsulés avant l'utilisation par le consommateur ;
- Savoir la taille et la densité nécessaires des particules pour qu'elles soient incorporées correctement dans le produit alimentaire ;
- Chercher les déclencheurs et les modes de libération de la matière encapsulée ; estimer le coût de l'opération et les limites financières.

Partie pratique

Le présent travail a été réalisé aux laboratoires de Microbiologie Appliquée et de Biotechnologies Végétales et Ethnobotanique de l'université Abderrahmane Mira – Bejaïa.

III. Matériel

1. La souche utilisée

Une souche de bactéries lactiques a été utilisée à savoir : *Pediococcus acidilactici*. Elle fait partie de la collection des souches du laboratoire de microbiologie appliquée (équipe : interaction microbienne, biofilms et probiotiques). La souche a été congelée à (-80°) dans du bouillon MRS additionné de 15% de glycérol.

2. Milieu de culture et polymère

➤ Milieu de culture

Milieu MRS (de MAN, ROGOSA et SHARPE) : Bouillon (Conda . pronadisa. Espagne) et gélose (Biokar) préparée fraîchement au niveau du laboratoire.

➤ Polymère

Polymère de type *iota*-carraghénane (SIGMA).

IV. Méthodes

1. Revivification et Isolement de la souche bactérienne:

La pureté de la souche *Pediococcus acidilactici* a été vérifiée sur gélose MRS à partir d'un bouillon MRS. Les boîtes de Pétri contenant la gélose MRS préalablement coulée et séchée sont stérilement ensemencées par étalement en stries d'une goutte du bouillon de culture, l'incubation est faite à 37°C pendant 48h, la culture est dite pure si on obtient des colonies homogènes de même forme (sphérique), même taille (petite) et même couleur (blanche).

2. Repiquage

Après avoir vérifié la pureté de la culture (absence de contamination dans la boîte de Pétri), on repique stérilement quatre colonies, de même taille, de la souche qu'on dépose

dans un tube contenant 9mL de bouillon MRS précédemment préparé. L'incubation se fait pendant 18h à 37°C.

3. Dénombrement

1mL du bouillon de culture est déposé aseptiquement dans 9mL d'eau physiologique et des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-8}) ont été réalisées. Le dénombrement de la flore mésophile a été effectué sur milieu MRS.

L'ensemencement se fait en profondeur. La méthode consiste à verser un volume de 1mL des dilutions (10^{-7}) et (10^{-8}) dans une boîte de Pétri, couler le milieu MRS en surfusion et homogénéiser en effectuant des mouvements en 8. Après solidification des milieux, les deux boîtes sont incubées à 37°C pendant 18h.

Après incubation, le dénombrement de la flore lactique a été réalisé selon la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{v(n_1 + 0,1n_2)d}$$

N : Nombre d'UFC par gramme ou par mL de produit initial.

ΣC : somme totale des colonies dénombrées.

n_1 : nombre de boîtes prises en compte dans la première dilution (la plus faible).

n_2 : nombre de boîtes prises en compte dans la seconde dilution (la plus forte).

d : taux de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

v : volume d'inoculum utilisé.

Le résultat est :

$$N = 5,2 \cdot 10^9 \text{ UFC/mL}$$

4. Préparation des solutions CaCl_2 , KCl et carraghénane :

➤ CaCl_2

On prépare trois solutions de 100mL chacune : la première à 0,2M, la seconde à 0,5M et la dernière à 1M, qu'on dépose dans le bain marie jusqu'à ébullition, après homogénéisation sous agitation à température ambiante (Selon le protocole d'Elida et al. (2020) modifié).

➤ KCl

Une solution de KCl à 1M est préparée sous agitation avec chauffage à 40°C jusqu'à homogénéisation.

➤ Carraghénane

Plusieurs solutions de carraghénane à différentes concentrations ont été préparées selon le protocole d'Elida et al. (2020) modifié (Tableau III).

Tableau III : Solutions de carraghénane préparées.

<i>Carraghénane</i>	4%	3%	2%	1,8%	1,7%	1,6%	1,5%	1,4%	1,3%	1,2%	1%
<i>Masse (g)</i>	0,8	0,6	0,4	0,36	0,34	0,32	0,3	0,28	0,26	0,24	0,2
<i>Volume (mL)</i>	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

La préparation des solutions a été effectuée comme suit:

- Chauffer l'eau distillée à utiliser à 80°C,
- Ajouter le carraghénane sous agitation et laisser homogénéiser,
- Stériliser les solutions obtenues à 121 °C pendant 20 min et laisser refroidir jusqu'aux alentours de 40°C pour pouvoir ajouter la souche bactérienne.

Le Tableau IV résume les différentes observations constatées après la préparation de chaque solution :

Tableau IV : État du polymère à différentes concentrations à 40°C.

<i>Concentration</i>	<i>État</i>	<i>Remarque</i>
4%	Gel	Gélification du polymère avant d'atteindre les 40°C et impossible de l'aspirer dans la seringue pour réaliser l'encapsulation.
3%	Gel	
2%	Gel	
1,8%	Gel	Gélification avant d'atteindre 40°C et difficulté d'aspiration avec la seringue.
1,7%	Gel	
1,6%	Gel	
1,5%	Semi- Gel	Partiellement gélifié à 40°C mais peut être aspiré par la seringue sous agitation douce.
1,4%	Semi- Gel	
1,3%	Non gélifié	Un bon état de gélification et facilité d'aspiration avec la seringue.
1,2%	Non gélifié	
1%	Liquide	Reste liquéfié même aux alentours de 40°C.

D'après ce tableau, les concentrations 1% ; 1,2% ; 1,3% ; 1,4% ; 1,5% sont les concentrations qui ont donné de meilleurs résultats et par conséquent un bon nombre de capsules.

Pour choisir la concentration de carraghénane à retenir, un test avec les deux solutions de coagulation CaCl_2 et KCl a été réalisé puis le polymère est extrudé sous forme de gouttelette par une seringue sans la bactérie dans la solution. Le tableau V regroupe les tests et les observations constatées.

Remarque : une première expérience avec le CaCl_2 (4%) a été réalisée avec les concentrations 4% ; 1,8% ; 1,7% ; 1,6% ; et 1,5% du polymère mais aucune capsule n'a été retrouvée d'où le passage à l'usage du CaCl_2 (1M).

Tableau V : État des capsules formées avec les deux solutions de coagulation.

Polymère	CaCl_2 (1M)	KCl (1M)
1,5%	Formation de quelques petites capsules dans les deux solutions	
1,4%	Apparition de quelques capsules	Formation de petites capsules séparées
1,3%	Formation de capsules plus définies	Apparition de petites capsules
1,2%	Formation de petites capsules attachées non persistantes facilement solubles	
1,0%	Capsules minuscules qui se dissolvaient rapidement	

D'après les tests réalisés, la concentration en carraghénane qui a permis l'obtention de capsules est celle à 1,3% et la solution de coagulation la plus appropriée est le CaCl_2 (1M).

5. Préparation de la souche probiotique pour l'encapsulation

La souche lactique *Pediococcus acidilactici* a été cultivée dans le bouillon MRS à 37°C pendant 18h puis les cellules sont recueillies par centrifugation à 4500 rpm pendant 15 minutes. Le culot contenant les cellules bactériennes a été lavé deux fois avec de l'eau physiologique puis suspendu dans 5mL d'eau physiologique.

Afin de vérifier si l'ajout de la suspension bactérienne au polymère peut affecter sa gélification, la suspension a été réalisée dans 5mL d'eau physiologique puis dans 5mL d'eau distillée séparément. Les résultats et observations obtenus sont résumés dans le tableau VI.

Tableau VI : Etat du polymère avec l'eau distillée et avec l'eau physiologique.

<i>Polymère + eau distillée</i>	<i>Polymère + eau physiologique</i>
Le polymère est plus liquide même aux alentours de 40°C mais les capsules sont moins rigides et moins définies.	Gélification du polymère qui peut être facilement aspiré avec la seringue, les capsules sont plus dures et plus persistantes.

On peut constater que suspendre la bactérie dans de l'eau physiologique est le meilleur choix pour obtenir de meilleures capsules.

6. Test d'encapsulation dans le carraghénane (1,3%) par Emulsion

Après la préparation des deux solutions stériles du carraghénane (1,3%) et de CaCl₂ (1M), et selon le protocole de (Ziar et al. 2012) modifié, 100 mL d'huile végétale (Tournesol) est versé dans un bécher stérile, supplémenté de 1mL de Tween-80. Le mélange est aussitôt expulsé sous forme de petites gouttes à l'aide d'une seringue stérile de 1 mL avec une aiguille de sortie (30G) sur l'huile. La solution de CaCl₂ est par la suite délicatement ajoutée sur les parois jusqu'à la rupture de l'émulsion.

Après 15 minutes d'agitation, les capsules formées sont séparées de la phase aqueuse et rincées 2 fois avec une solution saline stérile (0,9 % NaCl) puis conservées dans des tubes stériles à 4°C.

7. Encapsulation de la souche dans le Carraghénane par extrusion

L'encapsulation de la bactérie a été réalisée, selon le protocole de De prisco et al. (2015) modifié, en mélangeant 5 mL de la suspension bactérienne (en phase exponentielle) avec 20 mL du polymère (1,3%) préalablement stérilisé et refroidi aux alentours de 40°C. Le mélange est immédiatement extrudé sous forme de gouttelettes par une seringue stérile de 1 mL avec aiguille sortie 30G dans 40 mL d'une solution de chlorure de calcium à 1M stérile et déjà refroidie.

Les billes ainsi formées sont récupérées, lavées une fois avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer l'excès de calcium. Elles sont ensuite conservées dans quelques gouttes d'eau physiologique à 4°C.

8. Dénombrement après encapsulation

Après la filtration des capsules via un papier filtre (110 mm), on récupère la solution de CaCl_2 qui contient les bactéries non encapsulées pour effectuer des dilutions. **1mL** a été prélevé aseptiquement de la solution de CaCl_2 puis ajouté à **9mL** d'eau physiologique et des dilutions décimales ont été réalisées (10^{-1} à 10^{-8}). Le dénombrement de la flore mésophile a été effectué, en versant en masse un volume de 1mL des dilutions (10^{-5}) et (10^{-7}) dans le milieu MRS en boîtes. Après solidification des milieux, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18h.

La lecture des deux boîtes a donné un nombre de 22 colonies pour la dilution 10^{-5} et aucune colonie n'a été dénombrée pour la dilution 10^{-7} .

En appliquant la règle du dénombrement on aura : $N = 2,2 \cdot 10^6$ UFC/mL

Résultats et discussion

V. Résultats et discussion

1. Extrusion

L'encapsulation de la souche de *Pediococcus acidilactici* dans 1,3% d'*iota*-carraghénane et CaCl_2 à 1M a donné des billes de forme sphérique.

Les billes obtenues sont plus ou moins homogènes (Figure 12) ce qui pourrait être dû à des facteurs techniques comme ceux rencontrés par Ouled- Haddar *et al.* (2016) après encapsulation de *Lactobacillus plantarum* avec le *k*-carraghénane, il a été obtenu des billes homogènes avec quelques variations dues à des facteurs comme la distance entre l'origine de l'aiguille d'extrusion et le bain de gélification et à certains facteurs associés au gel, comme la concentration, la viscosité et la densité de ce dernier.



Figure 11 : Aspect des billes de la souche *Pediococcus acidilactici* dans l'*iota*-carraghénane

Des billes sous forme cylindrique ont été aussi obtenues par Ouled- Haddar *et al.* (2016) avec la *kappa*-carraghénane à 2%, alors que celles obtenues dans notre travail avec l'*iota*-carraghénane à 1,3% sont de forme sphérique, ce qui signifie que le type de polymère utilisé et sa concentration influenceraient la morphologie des billes formées.

2. Emulsion

Les capsules formées par la technique d'émulsion sont bien rigides et bien séparées (Figure 13), avec formation d'une couche d'huile à la surface de la solution durcissante ;

ce qui empêche l'utilisation de cette technique en aviculture (à cause de la couche d'huile qui reste à la surface).

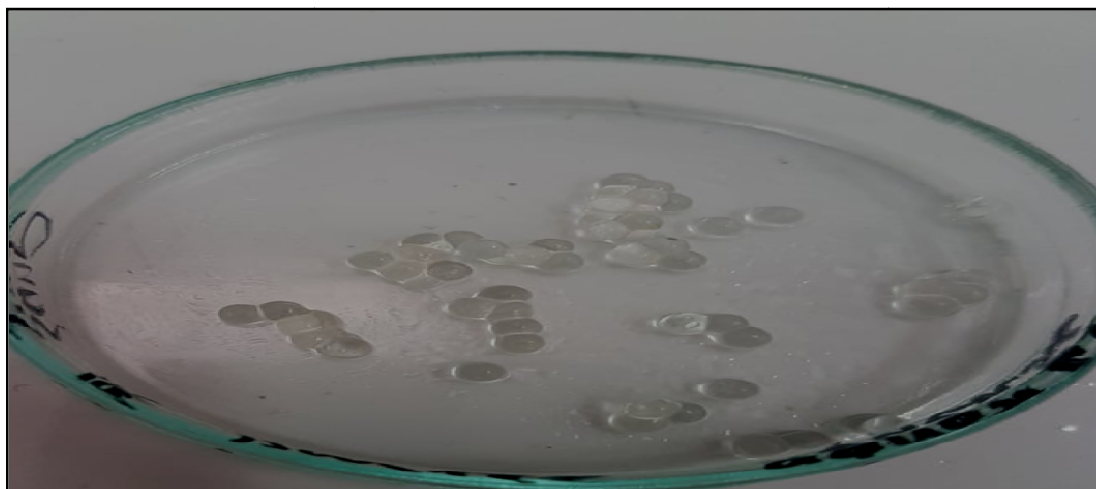


Figure 12 : Aspect des billes formées par la technique d'émulsion.

Il a déjà été rapporté par Afzaal et al. 2020 que l'encapsulation de *Bifidobacterium bifidum* dans 3% de *k*-carraghénane par la technique d'émulsion a montré une efficacité de 93%.

Donc la technique d'encapsulation peut influencer l'efficacité.

3. Rendement de l'encapsulation

Le rendement de l'encapsulation a été calculé par le dénombrement des cellules restantes dans la solution durcissante utilisée pour l'encapsulation et cela sur gélose MRS. Le Tableau VII résume les résultats obtenus.

Tableau VII: Taux d'encapsulation (%) obtenu par la technique d'extrusion.

<i>Nombre de cellules avant encapsulation (UFC/mL)</i>	<i>Nombre de cellules restantes dans la solution de CaCl₂ après encapsulation (UFC/mL)</i>	<i>Nombre de cellules encapsulées (UFC/mL)</i>	<i>Taux d'encapsulation (%)</i>
1,3*10⁹	1,4*10 ⁸	1,16*10 ⁹	89%

Le taux initial de cellules bactériennes *Pediococcus acidilactici* avant encapsulation était de 5,2.10⁹UFC/mL. La suspension bactérienne a subi une dilution de ¼ (5mL de la suspension bactérienne dans 20mL de la solution d'*iota*- carraghénane), ce qui diminue la charge bactérienne initiale à 1,3.10⁹ UFC/ mL.

En tenant compte du facteur de dilution rencontré lors de la manipulation, le nombre de cellules restantes après encapsulation est de l'ordre de $1,4 \cdot 10^8$ UFC/mL. Ainsi, un taux d'encapsulation de 89 % a pu être obtenu au terme du protocole d'encapsulation adopté.

Un des facteurs causant le déclin du taux d'encapsulation serait la perte de cellules dans la solution de CaCl_2 .

Selon Elida et al. (2020), le carraghénane peut protéger les cellules bactériennes pendant le processus d'extrusion des facteurs extérieurs afin que le processus de piégeage ait lieu.

4. Effet des cations sur la gélification du carraghénane

D'après l'état de l'*iota*-carraghénane, la gélification s'est produite par contact avec la solution aqueuse contenant le cation du métal alcalino-terreux Ca^{2+} avec une concentration de 1M et par conséquent la formation des billes est plus définie.

Tosa et al. (1979) ont montré que le *kappa*-carraghénane se gélifie facilement au contact d'ions métalliques, d'amines et de dérivés d'acides aminés.

Les billes se forment d'une manière plus compacte lorsqu'elles sont égouttées dans la solution de CaCl_2 , ceci correspond aux résultats d'Elida et al. (2020) qui ont montré que l'augmentation du nombre de perles générées est affectée par une augmentation de la concentration de solution de CaCl_2 ce qui améliore l'efficacité de l'absorption des molécules au moment de la formation des perles.

Un mélange de polymères pourrait ainsi améliorer le potentiel d'encapsulation et augmenter le rendement de ce procédé.

D'après les résultats des expériences réalisées dans cette étude à savoir un taux d'encapsulation élevé de 89% ; l'utilisation de l'*iota*-carraghénane pour l'encapsulation des cellules par la technique d'extrusion a montré son efficacité.

Il est nécessaire de réaliser des études complémentaires sur la caractérisation physico-chimique des billes et des tests de viabilité des cellules encapsulées afin d'étudier avec plus de précision l'efficacité de cette technique.

Conclusion

Conclusion

Ce travail a été réalisé dans le but de trouver les conditions nécessaires pour réussir l'encapsulation de la bactérie lactique probiotique *Pediococcus acidilactici* dans une matrice de biopolymère iota-carraghénane.

Les résultats obtenus ont montré que l'encapsulation de la souche probiotique, dans l'*iota*-carraghénane à 1,3% et dans une solution durcissante de CaCl₂ à 1M, est optimale à ces concentrations pour la production de capsules avec le polymère sélectionné avec un taux d'encapsulation de 89%.

En outre, il est nécessaire de réaliser des études complémentaires telles que la caractérisation physico-chimique des capsules, la viabilité *in vitro* et *in vivo* afin d'étudier avec plus de précision l'efficacité de cette technique dans la libération contrôlée des probiotiques et son application dans la production alimentaire humaine et animale.

Références bibliographiques

Liste des références bibliographiques

A

- Afzaal, M., Saeed, F., Ateeq, H., Ahmed, A., Ahmad, A., Tufail, T., Ismail, Z; et Anjum, F. M. (2020). Encapsulation of *Bifidobacterium bifidum* by internal gelation method to access the viability in cheddar cheese and under simulated gastrointestinal conditions. *Food science & nutrition*, 8(6), 2739-2747.
- Aloys, H., Korma, S. A., Alice, T. M., Chantal, N., Ali, A. H., Abed, S. M., et Ildephonse, H. (2016). Microencapsulation by complex coacervation: Methods, techniques, benefits, and applications-A review. *American Journal of Food Science and Nutrition Research*, 3(6), 188-192.
- Anal, A. K., et Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology* 18 (5):240–51.
- Angahar, L. T. (2016). Applications of probiotics in aquaculture. *American Journal of Current Microbiology*, 4(1), 66-79.
- Arslan-Tontul, S., et Erbas, M. (2017). Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. *LWT-Food Science and Technology*, 81, 160-169.

B

- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., et Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61, 160-174.
- Bodmeier, R., et McGinity, J. W. (1987). Polylactic acid microspheres containing quinidine base and quinidine sulphate prepared by the solvent evaporation technique. II. Some process parameters influencing the preparation and properties of microspheres. *Journal of microencapsulation*, 4(4), 289-297.
- Boukhouya, I. (2019). Elaboration de microparticules chargées d'Amoxicilline et de Théophylline à partir de polymères biodégradables ; Etude cinétique de leur libération. Thèse de Doctorat Université Djillali Liabes, Sidi Bel- Abbes. P 221
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., et Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of food engineering*, 104(4), 467-483.

C

- Castex M. (2009). Evaluation du probiotique bactérien *Pediococcus acidilactici* MA18/5M chez la crevette péneï de *Litopenaeus stylirostris* en Nouvelle-Calédonie. Thèse de Doctorat, INRA Agro Paris Tech (France), p 384.
- Cavalheiro, C. P., Ruiz-Capillas, C., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F., Ragagnin de Menezes, C., et Fries, L. L. M. (2015). Application of probiotic

delivery systems in meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 120-131.

- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., et Villarán, M.C (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International journal of food microbiology*, 142(1-2), 185-189.
- Chen, M. J., et Chen, K. N. (2007). Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In *Encapsulation and controlled release technologies in food systems*, Blackwell Publishing: Ames, Iowa, USA, pp 83-112.
- Choudhari A., Shinde S. et Ramteke B.N. (2008) Prebiotics and probiotics as health promoter. *Veterinary World*: 59-61.
- Chun, H., Kim, C., et Cho, Y. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* DKL 109 using External Ionic Gelation Method. *Korean Journal Society for Food Science of Animal Resources*. 34(5), 692-699.
- Collins, J. K., Thornton, G., et Sullivan, G. O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *International dairy journal*, 8(5-6), 487-490.
- Corrêa-Filho, L., Moldão-Martins, M., et Alves, V.D. (2019). Advances in the Application of Microcapsules as Carriers of Functional Compounds for Food Products. *Applied Sciences*, 9(3), 571.

D

- De Prisco, A., Maresca, D., Ongeng, D., et Mauriello, G. (2015). Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. *LWT - Food Science and Technology*. 61(2), 452-562.
- De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., et Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*. 20 (4), 292-302.
- Dimitrellou, D., Kandylis, P., Lević, S., Petrović, T., Ivanović, S., Nedović, V., et Kourkoutas, Y. (2019). Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 in alginate capsules for probiotic fermented milk production. *LWT-Food Science and Technology*, 116, 108501.
- Do Amaral, P. H. R., Andrade, P. L., et de Conto, L. C. (2019). Microencapsulation and Its Uses in Food Science and Technology: A Review, Microencapsulation Processes, Technologies and Industrial Applications, Fabien Salaün, Intech Open, 93.
- Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., et Nedović, V. (2015). "Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds." *Food Engineering Reviews* 7(4), 452-490.
- Dubey, R., Shami, T.C et Bhasker Rao, K.U. (2009). Microencapsulation technology and applications. *Defence Science Journal*, 59(1), 82-95.

E

- Elida, M., Gusmaliniet Saufani, I. A. (2020). Characteristics and viability of probiotic capsule *Lactobacillus paracaseisspparacasei* M13 encapsulated by extrusion using Carrageenan. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 583 (1).
- Espinosa-Andrews, H., Báez-González, J. G., Cruz-Sosa, F., et Vernon-Carter, E. J. (2007). Gumarabic– chitosancomplex coacervation. *Biomacromolecules*, 8(4), 1313-1318.
- Etchepare, M. D. A., Barin, J. S., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Wagner, R., Fries, L. L. M., et Ragagnin de Menezes, C. (2015). Microencapsulation of probiotics using sodium alginate. *Ciência Rural*, 45, 1319-1326.

F

- Frakolaki, G., Giannou, V., Kekos, D., etTzia, C. (2021). A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(9), 1515-1536.
- Franz, C.M.A.P., Endo, A., Abriouel, H., Reenen, C. A. V., Gálvez, A., & Dicks, L.M.T. (2014). The genus *Pediococcus*. *Lactic acid Bacteria: biodiversity and taxonomy*, 359-376.
- Frey, C. R (2015). Encapsulation via Pan-Coating, in Handbook of Encapsulation and Controlled Release, Munmaya Mishra (Boca Raton: CRC Press), Routledge Handbooks Online. 147–175.

G

- Gbassi, G. K., et Vandamme, T. (2012). Probiotic encapsulation technology: From microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*. 4(1), 149–163.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., et Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food research international*, 40(9), 1107-1121.
- Gibbs. B.F, Kermasha, S., Ali, I., Mulligan, C.N (1999). "Encapsulation in the food industry: a review." *International journal of food sciences and nutrition* 50(3), 213-224.
- Givry S. (2006). Optimisation de procédés de fermentation lactiques sur sirop de blé et purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bifermantans*. Thèse de doctorat en Microbiologie Industrielle. Université de Reims Champagne-Ardenne. France, p221.

H

- Haddadin, M.S., Abdulrahim, S.M., Hashlamoun, E.A. et Robinson, R.K. (1996). The effects of *Lactobacillus acidophilus* on the production and chemical composition of hen's eggs. *Poultry Science* 75(4): 491-494.

I

- Islam, M. A., Yun, C. H., Choi, Y. J. et Cho, C. S. (2010). "Microencapsulation of live probiotic bacteria. " *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(10): 1367-1377.
- Iver, C., et Kailasapathy, K. (2005). Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. *Journal of food science*, 70(1), M18-M23.

J

- Joint FAO/WHO. Expert Consultation on Evaluation of Health and Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, Argentina: (2001). Oct 1-4, Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.
- Joint, FAO/ WHO(2002). working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, 30.

K

- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current issues in intestinal microbiology*, 3(2), 39-48.
- Kamalian, N., Mirhosseini, H., Mustafa, S., et Manap, M. Y. A. (2014). Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 in simulated gastrointestinal fluid. *Carbohydrate Polymers*. 111, 700-706.
- Kerry, R.G., Patra, JK., Gouda, S., Park, Y., Shin, HS., Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*.1;26 (3):927-939.
- Khalighi, A., Behdani, R., et Kouhestani, S. (2016). Probiotics: a comprehensive review of their classification, mode of action and role in human nutrition. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. Venketeshwer Rao et Leticia G. Rao, Intech Open.
- Khan, R. U., et NAZ, S. (2013). The applications of probiotics in poultry production. *World's Poultry Science Journal*, 69(03), 621–632.
- Kim, J. U., Kim, B., Shahbaz, H. M., Lee, S. H., Park, D., et Park, J. (2017). Encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by ionic gelation with electrostatic extrusion for enhancement of survival under simulated gastric conditions and during refrigerated storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(2), 519-530.
- König, H., et Fröhlich, J. (2017). Lactic acid bacteria. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 3-29). Springer, Cham.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., et Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International dairy journal*, 13(1), 3-13.

- Krasaekoopt, W., et Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galacto oligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 761-766.
- Kurtoglu, V., Kurtoglu, F., Seker, E., Coskun, B., Balevi, T., et Polat, E. S. (2004). Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol. *Food additives and contaminants*, 21(9), 817-823.

L

- Lee, J. S., Cha, D. S. et Park, H. J. (2004). "Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(24): 7300-7305.

M

- Martins, M., Rodrigues, S. N., Barreiro, F., et Rodrigues, A. E. (2009). "Microencapsulation of thyme oil by coacervation." *Journal of Microencapsulation* 26(8): 667-675.
- Meiners, J. A. (2009). Micro-encapsulation of probiotics. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, 805-823.
- Mizock, B. A. (2015). *Probiotics. Disease-a-month*, 61(7), 259-290.
- Mosilhey, S. H. (2003). Influence of different capsule materials on the physiological properties of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. Institute of Food Technology, Faculty of Agriculture, University of Bonn. 153 pages.
- Musa, H. H., Wu, S. L., Zhu, C. H., Seri, H. I., et Zhu, G. Q. (2009). The potential benefits of probiotics in animal production and health. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(2), 313-321.

N

- Nami, Y., Haghshenas, B., et YariKhosroushahi, A. (2017). Effect of psyllium and gum Arabic biopolymers on the survival rate and storage stability in yogurt of *Enterococcus durans* IW 3 encapsulated in alginate. *Food Science & Nutrition*, 5(3), 554-563.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., et Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815.
- Ngwuluka, N. C., Abu-Thabit, N. Y., Uwaezuoke, O. J., Erebor, J. O., Ilomuanya, M. O., Mohamed, R. R., ... et Ebrahim, N. A. (2020). Natural Polymers in Micro- and Nanoencapsulation for Therapeutic and Diagnostic Applications: Part I: Lipids and Fabrication Techniques. In *Nano- and Microencapsulation-Techniques and Applications*. IntechOpen Books. p 365.

O

- O’Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K., et Conway, P. 2001. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1059-1066.
- Ouled-Haddar, H., Sifour, M., Idoui, T., Bouridane, H., et Arid, S. (2016). *Lactobacillus plantarum* G1 Microencapsulation enhanced its Viability during Storage and Gastrointestinal Transit. *Sains Malaysiana*. 45(7), 1049–1055.
- Ozyurt, V. H., et Ötles, S. (2014). Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 13(4), 413-424.

P

- Pavli, F., Tassou, C., Nychas, G-J. E., et Chorianopoulos, N. (2018). Probiotic incorporation in edible films and coatings: bioactive solution for functional foods. *International Journal of Molecular Sciences*. 19,150.
- Petrović, T., Nedović, V., Dimitrijević-Branković, S., Bugarski, B., et Lacroix, C. (2007). Protection of probiotic microorganisms by microencapsulation. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 13(3), 169-174.
- Poe, S. L., Kobašlija, M., et McQuade, D. T. (2006). Microcapsule enabled multicatalyst system. *Journal of the American Chemical Society*, 128(49), 15586-15587.

R

- Raddatz, G. C., da Fonseca, B. D. S., Poletto, G., Jacob-Lopes, E., Cichoski, A., Muller, E. I., Moraes Flores, E. M. , da Silva, C. D. B., Ragagnin de Menezes, C. (2020). "Influence of the prebiotics hi-maize, inulin and rice bran on the viability of pectin microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* LA-5 obtained by internal gelation/emulsification." *Powder Technology*, 362,409-415.
- Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G. S., et Anandharamakrishnan, C. (2012). Effect of whey protein–alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 891-898.
- Rajam, R., et Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructo oligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 773-780.
- Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C. V., Chan, L. W., et Heng, P. W. S. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 369-381.
- Riaz, Q. U. A., et Masud, T. (2013). Recent trends and applications of encapsulating materials for probiotic stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(3), 231-244.

- Rodrigues, F. J., Omura, M. H., Cedran, M. F., Dekker, R. F. H., Barbosa-Dekker, A. M., et Garcia, S. (2017). Effect of natural polymers on the survival of *Lactobacillus casei* encapsulated in alginate microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 34(5), 431-439.
- Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., et Garcia, S. (2018). Influence of linseed mucilage incorporated into an alginate-base edible coating containing probiotic bacteria on shelflife of fresh-cut yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Food and Bioprocess Technology*, 11(8), 1605-1614.
- Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., et Sato, H. H. (2020). Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications-a narrative review. *Food Research International*, 137.
- Rokka, S., et Rantamäki, P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, 231(1), 1-12.

S

- Saad N. (2010) Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *lactobacillus plantarum* 299v avec l'hôte : approche in vitro. Thèse de Doctorat. Université de Limoge.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., et Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197-215.
- Sankalia, M. G., Mashru, R. C., Sankalia, J. M., et Sutariya, V. B. (2007). Reversed chitosan–alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: optimization and physicochemical characterization. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 65(2), 215-232.
- Savadogo, A., Ouattara Cheik, A. T., BassoleImael, H. N., et Traore S. A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria, a mini review. *African Journal of Biotechnology*. 5 (9), 678-683.
- Serna-Cock, L., et Vallejo-Castillo, V. (2013). Probiotic encapsulation. *African Journal of Microbiology Research*, 7(40), 4743-4753.
- Shori, A. B. (2017). Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit. *HAYATI journal of biosciences*, 24(1), 1-5.
- Shortt, C. (1999). The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends in food science & technology*, (10(12), 411-417.
- Silva, M. P., Tulini, F. L., Martins, E., Penning, M., Fávares-Trindade, C. S., et Poncelet, D. (2018). Comparison of extrusion and co-extrusion encapsulation techniques to protect *Lactobacillus acidophilus* LA3 in simulated gastrointestinal fluids. *LWT-Food Science and Technology*, 89, 392-399.
- Singh, M. N., Hemant, K. S. Y., Ram, M., et Shivakumar, H. G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in pharmaceutical sciences*, 5(2), 65-77.
- Solanki, H. K., Pawar, D. D., Shah, D. A., Prajapati, V. D., Jani, G. K., Mulla, A. M., et Thakar, P. M. (2013). Development of Microencapsulation Delivery System

for Long-Term Preservation of Probiotics as Biotherapeutics Agent. *BioMed Research International*, 1–21.

- Soma, P. K., Williams, P. D., et Lo, Y. M. (2009). Advancements in non-starch polysaccharides research for frozen foods and microencapsulation of probiotics. *Frontiers of Chemical Engineering in China*, 3(4), 413-426.
- Specos, M. M., García, J. J., Tornesello, J., Marino, P., Vecchia, M. D., Tesoriero, M. D., et Hermida, L. G. (2010). Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(10), 653-658.
- Suhartatik, N., Cahyanto, M. N., Rahardjo, S., Miyashita, M., et Rahayu, E. S. (2014). Isolation and identification of lactic acid bacteria producing β glucosidase from Indonesian fermented foods. *International Food Research Journal* .21(3), 973-978.

T

- Tester, R. F., Karkalas, J., et Qi, X. (2004). Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of cereal science*, 39(2), 151-165.
- Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Yamamoto, K., Takata, I., Nishida, Y., et Chibata, I. (1979). Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix. *Biotechnology and Bioengineering*, 21(10), 1697-1709.

V

- Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., et Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 82, 187–216.
- Van de Velde, F., Knutsen, S. H., Usov, A. I., Rollema, H. S., et Cerezo, A. S. (2002). ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13(3), 73-92.
- Van der Ark, K. C.H., Nugroho, A. D. W., Berton-Carabin, C., Wang, C., Belzer, C., de Vos, W. M., et Schroen, K. (2017). Encapsulation of the therapeutic microbe *Akkermansia muciniphila* in a double emulsion enhances survival in simulated gastric conditions. *Food Research International*, 102, 372-379.
- Van Immerseel, F., Russell, J. B., Flythe, M. D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F et Ducatelle, R. (2006). The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian pathology*, 35(3), 182-188.

Y

- Yamakawa, I.; Tsushima, Y.; Machida, R. et Watanabe, R. (1992). Preparation of neurotensin analogue containing Poly (DL-lactic acid) Microsphere formed by oil in water solvent evaporation. *Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 81(9), 899-903.
- Yang, S. T. (2007). Bioprocessing—from biotechnology to biorefinery. In *Bioprocessing for value-added products from renewable resources. New technologies and application*, (pp. 1-24). Elsevier.

Z

- Zhang, Y., Lin, J., et Zhong, Q. (2016). S/O/W emulsions prepared with sugar beet Pectin to enhance the viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514. *Food Hydrocolloids*, 52, 804-810.
- Ziar, H., Gerard, P., Riazi A. (2012). Calcium alginate-resistant starch mixed gel improved the survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Science and Technologie* .47(7). p 1421-1429.

Annexe

Réactifs

Polymère : <i>iota</i> -carraghénane (SIGMA).
Tween-80 (BIOCHE Mchemopharma).
Eau physiologique 0,9%.
Chlorure de calcium CaCl ₂ (110.98 g/mol) (BIOCHEM chemopharma).
Chlorure de potassium KCl (74.55 g/mol) (SIGMA-ALDRICH).
Huile végétale de Tournesol du commerce.

Appareillage

Plaque chauffante et agitatrice (VELP SCIENTIFICA).	Bain marie-agitateur.
Balance (RADWAG).	Four Pasteur.
Bec Bunsen.	Étuve.
Micropipette.	Papier filtre 110 mm (Macherey-Nagel)
pH mètre.	Réfrigérateur.
Autoclave (BIOBASE).	Vortex.
Centrifugeuse.	Barreau magnétique.

Préparation de la Gélose MRS

- Gélose (Biokar).
 - 70,3g/ L.
 - pH= 5,7.
 - Température d'autoclavage 121°C/ 15à 20 min.
-
- Chauffer une petite quantité d'eau distillée.
 - Ajouter la gélose Biokar en poudre doucement sous agitation.
 - Agiter jusqu'à dissolution.
 - Ajouter la quantité restante d'eau.
 - Couvrir l'erenmeyer avec du papier aluminium pour empêcher l'évaporation.
 - Laisser bouillir environ 30min.
 - Ajuster le pH.
 - Autoclaver le milieu préparé.

Résumé :

Ce travail a permis d'encapsuler la bactérie lactique probiotique *Pediococcus acidilactici* dans le carraghénane comme matériau d'enrobage et dans la solution de CaCl_2 à 1M en utilisant la technique d'extrusion. Les paramètres observés sont la forme et l'aspect des capsules ainsi que le rendement d'encapsulation. Les résultats ont montré qu'avec le carraghénane (1,3%), on obtient des capsules de forme sphérique plus ou moins homogènes avec un taux d'encapsulation qui atteint les 89%.

Mots clés : encapsulation, carraghénane, capsules, bactéries probiotiques, extrusion.

Abstract:

This work has enabled to encapsulate the probiotic lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* in carrageenan as coating material in the solution CaCl_2 1M using the extrusion technique. The monitored parameters are the shape and appearance of the capsules as well as the encapsulation yield. The results showed that with carrageenan (1.3%) we got capsules of spherical shape, more or less homogeneous and an encapsulation rate that has reached 89%.

Key words: Encapsulation, carrageenan, capsules, probiotic bacteria, extrusion.

ملخص :

كُرس هذا العمل للتغليف الدقيق للبكتيريا اللبنية البروبيوتيك *Pediococcus acidilactici* في الكاراجينان كمادة تغليف في محلول CaCl_2 1M باستخدام تقنية القذف . كانت المعلمات المرصودة هي شكل ومظهر الكبسولات بالإضافة إلى كفاءة و مردود التغليف. أظهرت النتائج أنه مع الكاراجينان (1.3%) يتم الحصول على كبسولات كروية الشكل متجانسة إلى حد ما، ومعدل تغليف يبلغ 89%.

الكلمات المفتاحية: التغليف الدقيق , كاراجينان, كبسولات، بكتيريا بروبيوتيك ، قذف.