

Université du Québec  
INRS – Institut Armand-Frappier

**Évaluation du pouvoir antibactérien et de la stabilité  
d'une boisson enrichie en micronutriments  
destinée aux pays en voie de développement**

Par  
Anne-Sophie Guenier

Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)  
en Microbiologie Appliquée

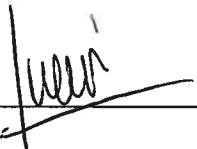
Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	<b>Claude Guertin</b> INRS – Institut Armand-Frappier
Examineur externe	<b>Selim Kermasha,</b> Département des sciences alimentaires Mc Gill University
Directeur de recherche	<b>Monique Lacroix</b> INRS – Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	<b>Mircea Alexandre Mateescu</b> Département de Chimie Université du Québec À Montréal

## Résumé


Les carences en micronutriments sont un problème de santé majeur dans les pays en voies de développement. La majorité des produits enrichis en vitamines et minéraux sont présentés sous forme de poudre à reconstituer avec de l'eau. Le séchage permet de stabiliser les nutriments, cependant les conditions climatiques (température et humidité relative élevées) rendent nécessaires l'emballage inerte de ces micronutriments. De plus, la faible qualité microbiologique de l'eau peut créer des problèmes de contamination responsables de maladies alimentaires tel que les salmonelloses. Afin d'optimiser un programme de fortification basé sur une boisson en poudre enrichie en micronutriments, trois axes de recherches ont été explorés : 1- L'évaluation du pouvoir antibactérien des acides organiques présents dans la boisson a d'abord été réalisée. L'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes dépend du genre bactérien et de sa concentration initiale dans l'eau. Un effet bactéricide total a été observé chez *Serratia liquefaciens* alors qu'une inhibition partielle de la croissance d'*Escherichia coli* a été enregistrée dans nos conditions expérimentales, 2- L'étude de la stabilité des vitamines sous des conditions normales d'entreposage (23°C et 56 % d'humidité relative) et tropicales (45°C et 100 % d'humidité relative) a été effectuée. Les résultats obtenus confirment la forte sensibilité de certaines vitamines déjà connue (notamment la vitamine C et l'acide folique) et mettent en évidence l'augmentation de cette sensibilité due aux interactions entre les micronutriments (notamment l'oxydation de la vitamine C par le fer ionique), et 3- L'évaluation d'une méthode d'encapsulation a été développée afin de préserver les micronutriments des interactions avec les autres micronutriments, des conditions d'entreposage et des conditions rencontrées lors du passage dans le tractus gastro-intestinal. La stabilité des micronutriments au cours de l'entreposage a grandement été améliorée grâce à la séparation physique des micronutriments mais également grâce à la bonne résistance des billes en présence d'enzymes digestives et face aux conditions de température, d'humidité relative, d'acidité extrêmes.

Les résultats microbiologiques montrent les limites d'efficacité de la boisson et pourrait ouvrir la porte à une amélioration de la formulation afin d'en améliorer les effets bactéricides. L'encapsulation des micronutriments a permis de démontrer que les polymères utilisés pourraient avoir des applications commerciales afin de préserver le contenu nutritionnel au cours de l'entreposage et permettent d'envisager de nombreuses applications pour cette méthode, aussi bien dans le domaine alimentaire que dans le domaine pharmaceutique.



---

Anne-Sophie Guenier  
Étudiante



---

Monique Lacroix, Ph. D.  
Directrice de recherche



*Ce projet s'est réalisé grâce à toute la confiance que les Drs. Monique Lacroix et Alexandre Mateescu m'ont accordée, à tous les bons conseils que les Drs. Blaise Ouattara et Stéphane Caillet m'ont prodigués, à la bonne humeur que tous les étudiants et stagiaires du laboratoire m'ont communiquée et au courage dont mes parents et mes grands-parents m'ont pourvu.*

## Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	ii
<b>Résumé</b> .....	iii
<b>Table des matières</b> .....	iv
<b>Liste des tableaux</b> .....	vi
<b>Liste des figures</b> .....	viii
<b>Liste des abréviations</b> .....	x
<b>Contexte</b> .....	1
<b>REVUE DE LITTÉRATURE</b> .....	4
<b>1. Qualité microbiologique de l'eau de boisson</b> .....	5
1.1. Définition de l'eau potable .....	5
1.2. Nature de la pollution microbiologique de l'eau .....	6
1.3. Pathologies d'origine microbiologique liées à l'eau de boisson .....	8
1.4. Amélioration de la qualité microbiologique de l'eau .....	11
<b>2. Les micronutriments</b> .....	13
2.1. Rôles physiologiques des micronutriments .....	13
2.2. Besoins nutritionnels et carences .....	16
2.3. Pathologie des carences en micronutriments .....	18
2.4. Stabilité des micronutriments .....	19
<b>3. Encapsulation</b> .....	23
3.1. Matrices d'encapsulation .....	23
3.2. Techniques d'encapsulation .....	25
3.3. Caractéristiques des capsules .....	26
3.4. Encapsulation de micronutriments .....	26
<b>PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE</b> .....	28
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODE</b> .....	31
<b>1. Étude de l'activité antibactérienne</b> .....	32
1.1. Milieu de culture .....	32
1.2. Souches bactériennes .....	32
1.3. Standardisation des cultures .....	32
1.4. Préparation des échantillons .....	33
1.5. Mesure de l'activité antibactérienne .....	34
1.6. Mesure du pH .....	34
1.7. Détermination du taux de dissociation des acides .....	35

<b>2. Stabilité des micronutriments</b> .....	36
2.1. Protocole expérimental .....	36
2.2. Extraction des vitamines hydrosolubles.....	36
2.3. Extraction des vitamines liposolubles.....	37
2.4. Dosage des vitamines : Chromatographie liquide à haute performance...	38
2.5. Dosage des minéraux : Spectrométrie par absorption atomique.....	39
<b>3. Encapsulation</b> .....	40
3.1. Préparation des solutions .....	40
3.2. Formation des billes .....	42
3.3 Mesures des propriétés physico-chimiques.....	43
3.4. Étude de la stabilité des micronutriments encapsulés.....	49
3.5. Libération contrôlée des micronutriments .....	50
<b>4. Analyses statistiques</b> .....	53
<b>RÉSULTATS</b> .....	54
<b>1. Activité antibactérienne de la boisson enrichie</b> .....	55
<b>2. Stabilité des micronutriments</b> .....	82
<b>3. Encapsulation des micronutriments</b> .....	106
<b>DISCUSSION</b> .....	147
<b>CONCLUSION</b> .....	158
<b>Appendice A – Courbes de croissance des souches bactériennes</b> .....	160
<b>Appendice B – Composition de la boisson</b> .....	164
<b>Appendice C – Fonctionnalisation des polymères</b> .....	166
<b>Appendice D – Analyses statistiques</b> .....	169
<b>Liste des références</b> .....	185

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> - Apports journaliers recommandés en micronutriments .....	17
<b>Tableau II</b> - Stabilité des micronutriments face aux facteurs externes.....	21
<b>Tableau III</b> - Composition des solutions pour la formation des billes .....	41
<b>Tableau IV</b> - Dénombrements bactériens de <i>Escherichia coli</i> .....	58
<b>Tableau V</b> - Dénombrements bactériens de <i>Salmonella Typhi</i> .....	62
<b>Tableau VI</b> - Dénombrements bactériens de <i>Serratia liquefaciens</i> .....	66
<b>Tableau VII</b> - Dénombrements bactériens du mélange des trois souches .....	69
<b>Tableau VIII</b> -pH et concentrations de la forme non dissociée des acides organiques pour <i>Escherichia coli</i> .....	72
<b>Tableau IX</b> -pH et concentrations de la forme non dissociée des acides organiques pour <i>Salmonella Typhi</i> .....	75
<b>Tableau X</b> -pH et concentrations de la forme non dissociée des acides organiques pour <i>Serratia liquefaciens</i> .....	78
<b>Tableau XI</b> -pH et concentrations de la forme non dissociée des acides organiques pour le mélange des trois souches .....	81
<b>Tableau XII</b> - Concentrations en vitamine B <sub>2</sub> au cours des 9 mois d'entreposage .....	90
<b>Tableau XIII</b> - Concentrations en vitamine B <sub>6</sub> au cours des 9 mois d'entreposage.....	91
<b>Tableau XIV</b> - Concentrations en vitamine B <sub>12</sub> au cours des 9 mois d'entreposage.....	92
<b>Tableau XV</b> - Concentrations en vitamine C au cours des 9 mois de d'entreposage .....	93
<b>Tableau XVI</b> - Concentrations en acide folique au cours des 9 mois d'entreposage .....	94
<b>Tableau XVII</b> - Concentrations en niacine au cours des 9 mois d'entreposage .....	95
<b>Tableau XVIII</b> - Concentrations en vitamine E au cours des 9 mois d'entreposage .....	100
<b>Tableau XIX</b> - Concentrations en provitamine A au cours des 9 mois d'entreposage...	101
<b>Tableau XX</b> - Concentrations en fer ferrique au cours des 9 mois d'entreposage .....	105
<b>Tableau XXII</b> - Force à la rupture des billes .....	109
<b>Tableau XXIII</b> - Déformation à la rupture des billes .....	113
<b>Tableau XXIV</b> - Viscoélasticité (coefficient de relaxation) des billes .....	115
<b>Tableau XXV</b> - Perméabilité à la vapeur d'eau après 24 heures .....	119

<b>Tableau XXVI</b> – Étude du gonflement des billes.....	121
<b>Tableau XXVII</b> – Rétention de la vitamine C encapsulée dans les billes après 6 mois d'entreposage à 23°C .....	126
<b>Tableau XXVIII</b> – Rétention de la vitamine C encapsulée dans les billes après 6 mois d'entreposage à 45°C .....	127
<b>Tableau XXIX</b> – Rétention de la provitamine A encapsulée dans les billes après 6 mois d'entreposage à 23°C .....	132
<b>Tableau XXX</b> - Rétention de la provitamine A encapsulée dans les billes après 6 mois d'entreposage à 45°C .....	133
<b>Tableau XXXI</b> - Rétention du fer ferrique encapsulé dans les billes après 6 mois d'entreposage à 23°C .....	138
<b>Tableau XXXII</b> - Rétention du fer ferrique encapsulé dans les billes après 6 mois d'entreposage à 45°C .....	139
<b>Tableau XXXIII</b> – Libération de la vitamine C au cours du temps .....	142
<b>Tableau XXXVI</b> – Libération de la provitamine A au cours du temps .....	144
<b>Tableau XXXV</b> – Libération du fer ionique au cours du temps .....	146



## Liste des figures

<b>Figure 1</b> - Schéma du montage servant à la formation des billes.....	42
<b>Figure 2</b> - Exemple de graphique obtenu lors du test de force et de déformation à la rupture .....	45
<b>Figure 3</b> - Exemple de graphique obtenu lors du test de viscoélasticité .....	47
<b>Figure 4</b> - Cinétique d'inhibition de la croissance d' <i>Escherichia coli</i> selon le degré de contamination initiale .....	57
<b>Figure 5</b> – Cinétique d'inhibition de la croissance de <i>Salmonelle</i> Typhi selon le degré de contamination initiale .....	61
<b>Figure 6</b> – Cinétique d'inhibition de la croissance de <i>Serratia liquefaciens</i> selon le degré de contamination initiale .....	65
<b>Figure 7</b> – Cinétique d'inhibition de la croissance du mélange des trois souches selon le degré de contamination initiale .....	68
<b>Figure 8</b> – Évolution du pH et de la concentration en acides organiques sous forme non dissociée pour <i>E. coli</i> .....	71
<b>Figure 9</b> – Évolution du pH et de la concentration en acides organiques sous forme non dissocié pour <i>Salmonella</i> Typhi .....	74
<b>Figure 10</b> – Évolution du pH et de la concentration en acides organiques sous forme non dissociée pour <i>Serratia liquefaciens</i> .....	77
<b>Figure 11</b> – Évolution du pH et de la concentration en acides organiques sous forme non dissociée pour le mélange des trois souches bactériennes .....	80
<b>Figure 12</b> - Stabilité des vitamines hydrosolubles après 9 mois d'entreposage à 23°C....	88
<b>Figure 13</b> - Stabilité des vitamines hydrosolubles après 9 mois d'entreposage à 45°C ...	89
<b>Figure 14</b> - Stabilité des vitamines liposolubles après 9 mois d'entreposage à 23°C .....	98
<b>Figure 15</b> - Stabilité des vitamines liposolubles après 9 mois d'entreposage à 45°C .....	99
<b>Figure 16</b> - Stabilité des minéraux après 9 mois d'entreposage à 23°C .....	103
<b>Figure 17</b> - Stabilité des minéraux après 9 mois d'entreposage à 45°C .....	104
<b>Figure 18</b> – Photographie des billes .....	107
<b>Figure 19</b> - Force à la rupture des billes.....	108

<b>Figure 20</b> – Déformation à la rupture des billes.....	112
<b>Figure 21</b> – Viscoélasticité (coefficient de relaxation) des billes .....	114
<b>Figure 22</b> – Perméabilité à la vapeur d'eau.....	118
<b>Figure 23</b> - Cinétique d'absorption de l'eau par les billes .....	120
<b>Figure 24</b> - Stabilité de la vitamine C encapsulée après 6 mois d'entreposage à 23°C. 124	
<b>Figure 25</b> - Stabilité de la vitamine C encapsulée après 6 mois d'entreposage à 45°C. 125	
<b>Figure 26</b> - Stabilité de la provit. A encapsulée après 6 mois d'entreposage à 23°C.. 130	
<b>Figure 27</b> - Stabilité de la provit. A encapsulée après 6 mois d'entreposage à 45°C ... 131	
<b>Figure 28</b> - Stabilité du fer ferrique encapsulé après 6 mois d'entreposage à 23°C ..... 136	
<b>Figure 29</b> - Stabilité du fer ferrique encapsulé après 6 mois d'entreposage à 45°C ..... 137	
<b>Figure 30</b> – Libération contrôlée de la vitamine C encapsulée.....	141
<b>Figure 31</b> - Libération contrôlée de la provitamine A encapsulée.....	143
<b>Figure 32</b> – Libération contrôlée du fer ferrique encapsulé.....	145
<b>Figure 33</b> – Mécanismes d'action des acides organiques dans la cellule bactérienne ...	151

## Liste des abréviations

°C : degré Celsius

μL : microlitre

μm : micromètre

AJR : apport journalier recommandé

AO : acide organique

ASTM : American Standard Tests and Methods

ATCC : American Type Culture Collection

CaCl<sub>2</sub> : chlorure de calcium

cm x min<sup>-1</sup> : centimètre par minute

CR : coefficient de relaxation

DR : déformation à la rupture

F<sub>f</sub> : force finale

F<sub>i</sub> : force initiale

FR : force à la rupture

g : gramme

GRAS : Generally Recognized As Safe

HCl : acide chlorhydrique

HPLC : High Performance Liquid Chromatography ou chromatographie liquide haute performance

HR : humidité relative

L : litre

Log : logarithme décimal

M : molaire

mL : millilitre

mm : millimètre

mm.s<sup>-1</sup> : millimètre par seconde

mmHg : millimètre de mercure

N : Normal

NaCl : chlorure de sodium

N.mm<sup>-1</sup> : newton par millimètre

ND : non détecté

nm : nanomètre

p / v : poids / volume

t : temps

TCA : trichloroacetic acid ou acide trichloroacétique

TSA : Tryptic Soy Agar ou gélose tryptonné au soja

TSB : Tryptic Soy Broth ou bouillon tryptonné au soja

UFC : unité formatrice de colonie

UV : ultraviolet

vs : contre (du latin versus)

WPC : Whey Protein Concentrate ou protéines laitières concentrées

WPI : Whey Protein Isolate ou protéines laitières isolées

## Contexte

Les carences en vitamines et en minéraux sont un problème de santé majeur dans les pays en voie de développement. L'Organisation mondiale de la santé estime à 228 millions le nombre d'enfants affectés à différents degrés par une carence en vitamine A, répartis dans plus de 75 pays (Cervinkas et Lofti, 1996). En ce qui concerne les micronutriments, selon la Fondation internationale de la nutrition et l'initiative pour les micronutriments (International nutrition foundation and the micronutrient Initiative, 1998), les pays en voie de développement doivent aussi faire face à d'autres carences en vitamines (C, E et du groupe B) et en minéraux (notamment le fer).

Les mesures pour combattre les carences en micronutriments (vitamines et minéraux) sont nombreuses. L'éducation nutritionnelle, comme par exemple la modification des habitudes alimentaires ou la promotion de la culture de plantes riches en micronutriments, a démontré son efficacité dans certaines situations (Arroyave, 1987; Smitasiri, 1991; Attig, Smitasri et Ittikam, 1993). La distribution de suppléments alimentaires riches en nutriments est un moyen d'intervention efficace à court terme et lorsque la demande en nutriments est importante (Mahalanabis et Bhan, 2001). Toutefois, les coûts associés à cette approche sont importants et son efficacité dépend directement de l'infrastructure médicale en place. La fortification des aliments consiste en l'ajout d'un ou plusieurs micronutriments, qu'il y soit normalement contenu ou non, dans le but de prévenir ou de corriger une déficience en nutriments (FAO / WHO, 1994).

Les avantages des programmes de fortification des aliments par rapport aux autres méthodes sont notables. Ce sont des programmes simples à mettre en place et dont les résultats sont visibles rapidement et durablement (Mannar, 1991; Nestel, 1993). Ils permettent d'augmenter la biodisponibilité des micronutriments et donc de réduire l'impact des carences. De tels programmes, bien implantés dans les pays développés (Wiemer, 1995), sont particulièrement adaptés aux pays en voie de développement car ils

ne requièrent pas de participation de la part des populations et leurs coûts sont relativement faibles (De Oliveiri *et al*, 1996; Nadiger *et al*, 1980).

Les performances de tels programmes peuvent cependant être améliorées, notamment en identifiant et en limitant les effets des conditions climatiques. La majorité des pays en voie de développement sont situés dans des zones tropicales (chaudes et humides) et ces pays ne possèdent pas ou peu d'équipement de réfrigération. Le paramètre le plus important à prendre en compte est donc la stabilité des micronutriments puisque les vitamines sont bien connues pour être des molécules peu stables et pouvant être sévèrement dégradées dans certaines conditions d'entreposage (Harris, 1988).

La majorité des aliments enrichis en micronutriments et destinés aux pays en voie de développement sont présentés sous forme sèche (*i. e.* le lait en poudre) et doivent être reconstitués avec de l'eau avant utilisation. Dans ce contexte, une connaissance précise de la qualité microbiologique de l'eau de boisson est d'une grande importance et doit être intégrée dans les programmes de fortification pour un plus grand impact. Beaucoup de pays en voie de développement ne disposent pas de quantité suffisante d'eau potable, celle-ci étant le plus souvent polluée par des déchets domestiques (Chaudhuri et Sattar, 1990). Le manque d'eau potable et la consommation d'eau contaminée sont responsables de nombreuses maladies (Ramteke *et al*, 1992; Augustinos, Venter et Kfir, 1995). Ces maladies sont dues, le plus souvent, à la présence de micro-organismes (Reiff *et al.*, 1997).

Une variété d'aliments peut être utilisé dans les programmes de fortification. Les plus répandus sont les produits céréaliers, les produits laitiers lyophilisés, les sels et les boissons en poudre (Bauernfeind et De Ritter, 1991). Avant d'étudier l'efficacité du programme de fortification chez les populations cibles, le produit doit être développé et optimisé en laboratoire. L'objectif principal du projet était d'optimiser et de caractériser la formulation d'une boisson à l'orange en poudre enrichi en micronutriments, destinée aux pays en voie de développement. Les différentes étapes de ce projet avaient pour but de déterminer l'effet des acides organiques contenus dans la boisson sur des micro-

organismes pathogènes contenus dans l'eau servant à la reconstitution, d'évaluer l'effet de la température et de l'humidité relative sur la stabilité des micronutriments contenus dans la boisson; et de développer une méthode d'encapsulation des micronutriments afin les protéger.

Dans le présent mémoire, une revue des connaissances dans les domaines impliqués a été faite, les matériels et méthodes utilisés au cours du projet ont ensuite été expliqués. Les résultats ont été présentés puis discutés. Enfin, les principales avancées faites dans ce projet et les pistes éventuelles pour la poursuite du projet ont été résumées dans la conclusion.

# **REVUE DE LITTÉRATURE**



# 1. QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DE L'EAU DE BOISSON DANS LES PAYS EN VOIE DE DÉVELOPPEMENT

## 1.1. Définition de l'eau potable

Les directives de qualité pour l'eau de boisson de l'Organisation mondiale de la santé (1994) recommandent qu'une eau destinée à la consommation humaine doit être conforme aux normes microbiologiques suivantes :

Bactéries

Aucun échantillon ne doit contenir plus de 10 coliformes pour 100 mL, dont aucun ne doit être un coliforme fécal ;

Protozoaires

Aucun échantillon ne doit contenir de protozoaire ;

Virus

Aucun échantillon ne doit contenir de virus''.

Il ne s'agit que de recommandations car les méthodes de détection des protozoaires et des virus sont compliquées, onéreuses et pas toujours fiables. Les meilleures méthodes de protections contre la présence des virus (notamment des virus entériques humains) sont basées sur l'absence d'organismes indicateurs fécaux comme *Escherichia coli* (Santé Canada, 1996).

La 16<sup>ème</sup> édition des "Standards methods for the examination of water and the wastewater," (1996) définit le groupe des coliformes comme : "toute bactérie aérobie ou anaérobie facultative, en forme de bâtonnet, asporulée et Gram négative qui fermente le lactose avec production de gaz en moins de 48 heures à 35°C".

## **1.2. Nature de la pollution microbiologique de l'eau**

Les problèmes d'eau rencontrés par les pays en voie de développement portent autant sur la qualité de l'eau que sur la quantité. Actuellement on estime que 80 pays dans le monde, représentant 40 % de la population, connaissent de sérieuses pénuries d'eau (référence 1). De plus, l'accès à l'eau potable n'est pas le même pour tous. Une large proportion de la population dans les pays en voie de développement est répartie dans les zones rurales où les systèmes de traitement de l'eau sont généralement inexistantes (Thurman *et al.*, 1998).

### ***1.2.1. Les sources de pollution***

Les deux causes essentielles de la pollution microbiologique de l'eau dans les pays en voie de développement sont l'utilisation des eaux de surface et les mauvaises conditions d'entreposage de l'eau lorsqu'elle est potable. En effet, l'absence de traitement des déchets et des excréments humains et animaux a pour conséquence la pollution des ressources hydriques telles que les lacs et rivières (Pandey *et al.*, 1998). D'autre part, plusieurs études ont démontrées que l'eau, lorsqu'elle est potable à la sortie des pompes, apparaît progressivement contaminée lors de son transport et de son entreposage (Ahmed, Hoque et Mahmud, 1998 ; Genthe *et al.*, 1997 et Monjour, 1994).

Bien qu'ils soient moins importants, certains facteurs ont aussi une incidence sur les concentrations en micro-organismes. Les variations de la turbidité et de la composition chimique de l'eau peuvent entraîner un abondant développement des micro-organismes et la prolifération des algues a également parfois une incidence sur la densité des micro-organismes présents dans l'eau (Geldreich, 1991).

### 1.2.2. *Les micro-organismes impliqués*

La pollution microbiologique de l'eau correspond à la présence de bactéries, de virus et / ou de protozoaires. Les bactéries le plus souvent impliquées dans le contamination de l'eau de boisson dans les pays en voie de développement sont *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Campylobacter* sp. et *vibrio cholera* (Augustinos, Venter et Kfir, 1995; Shears *et al.*, 1995). On recense également la présence de *Serratia liquefaciens*, mais dans une moindre mesure. Il est très difficile de quantifier la contamination bactérienne de l'eau dans les pays en voie de développement puisque de nombreux facteurs entrent en jeu comme le niveau socioéconomique et les habitudes d'hygiène de la population. Anand et Singh (1988) rapportent une contamination supérieure à  $10^5$  coliformes totaux / mL d'eau, lors d'une étude menée en Inde sur de l'eau puisée. Une autre étude réalisée dans le bassin du Gange (Inde) fait part d'une contamination de  $10^7$  coliformes totaux / mL d'eau (Ramteke *et al.* 1992).

Les virus sont également des agents importants de la pollution de l'eau dans les pays en voie de développement. Leclerc, Schwartzbrod et Dei-Cas, (2002) ont notamment recensés les virus responsables des hépatites A et E dans les régions tropicales et subtropicales, les virus entériques Rotavirus et Adénovirus ainsi que les virus de type Norwalk reconnus comme la source virale principale des maladies liées à l'eau de boisson dans le monde.

Les Cryptosporidies, Giardia, Ascaris et Amibes sont les protozoaires les plus fréquemment retrouvés dans l'eau des pays en voie de développement (Jonnalagadda et Bhat, 1995 ; Thurman *et al.*, 1998). Franco, Rocha-Eberhardt et Cantusio Neto (2002) rapportent que 10.000 à 100.000 de personnes au Brésil utiliseraient de l'eau contaminée par Giardia, alors que 10 % de la population mondiale seraient touchés par les Amibes et 33 % seraient infectés par les Ascaris (Subbannayya, Kumari et Sivananda, 1990).

### 1.3. Pathologies d'origine microbiologique liées à l'eau de boisson

Les maladies infectieuses transmises par l'eau ont été responsables de 3 millions de décès en 1995 dans les pays en voie de développement (Morris, 1996).

#### 1.3.1. Bactéries

##### Famille des *Enterobacteriaceae*

Les entérobactéries sont des bacilles Gram négatif. La plupart sont mobiles et péritriches. Sur le plan respiratoire, ce sont des bactéries aérobies facultatives

##### *Escherichia coli*

Bien que *Escherichia coli* se retrouve parmi la flore intestinale de l'homme, plusieurs sérotypes sont pathogènes et sont responsables d'importantes infections intestinales (Ingram et Wilson, 1990). *Escherichia coli* est responsable des diarrhées causées par une entérotoxine thermolabile et / ou thermostable (Sack, 1975). La dose minimale infectieuse est de l'ordre de 10.000 bactéries (Coffin, 1994). Toutefois, il faut noter que les personnes ayant un système immunitaire affaibli sont beaucoup plus vulnérables aux infections microbiennes.

##### Genre *Salmonella*

*Salmonella* Typhi est responsable de la fièvre typhoïde, une grave infection débilitante qui s'accompagne d'une bactériémie pouvant aller jusqu'au décès. Cette bactérie parasite seulement l'être humain. La transmission du germe se fait par voie anale-buccale et l'eau est le vecteur de transmission le plus commun (Couture, 1997). La dose infectante est assez élevée : elle varie entre  $10^5$  et  $10^9$  bactéries.

Les autres espèces (notamment *Salmonella typhimurium* et *Salmonella enteritidis*) sont responsables d'entérites présentant les mêmes symptômes que celles causées par *Escherichia coli*.

#### *Genre Serratia*

Les bactéries du genre *Serratia* peuvent se comporter comme des bactéries pathogènes opportunistes notamment chez les malades affaiblis ou présentant un déficit immunitaire (référence 2). *Serratia liquefaciens* peut causer des complications oculaires (référence 3). Les infections causées par *Serratia marcescens* sont plus conséquentes : cette bactérie est responsable d'une forme grave de pneumonie.

#### *Genre Shigella*

Les *Shigella* sont les agents classiques de la dysenterie. *Shigella dysenteriae* est responsable de la forme de dysenterie la plus grave, due à une entérotoxine. L'infection peut être causée par moins de 200 bacilles (Guerrant et Boback, 1991). Les autres espèces de *Shigella* comme *Shigella flexneri* ou *Shigella sonnei* ont pour conséquences des formes moins graves de dysenteries.

#### Famille des *Vibrionaceae*

Les épidémies de choléra fréquemment rencontrées dans les pays en voie de développement sont causées par *Vibrio cholerae*, groupe sérologique 01 de biotypes classique et El Tor (Ingram et Wilson, 1990). Les germes, ingérés par le biais de l'eau souillée, survivent à l'acidité de l'estomac. Les bactéries produisent une endotoxine appelée toxine cholérigène. Le choléra est caractérisé par une diarrhée profuse et des vomissements. Dans les cas graves, la maladie peut être mortelle en moins de 24 heures (Couture, 1997).

### Famille des *Campylobacter*

*Campylobacter jejuni* est de loin l'espèce du genre *Campylobacter* la plus importante en pathologie humaine. Il est impliqué dans des troubles entériques provoquant des diarrhées due à une entérotoxine proche de celle retrouvée chez *Escherichia coli* (Megraud *et al.*, 1988).

#### **1.3.2. Virus**

Les infections causées par le virus coxsackie sont associés à des pathologies du cœur et de la circulation sanguine (péricardites et myocardites), à certaines formes de méningites (dont la méningite aseptique), au rhume, à la conjonctivite hémorragique aiguë et à une forme de paralysie évoquant la poliomyélite (Macler et Merkle, 2000).

Les rotavirus et les adénovirus sont des virus entériques. Ils sont responsables de diarrhées chez les enfants, pouvant aller jusqu'au décès dans les cas extrêmes. Chez les adultes, les symptômes sont moins sévères et parfois même, les infections sont asymptomatiques (Shaw, 1990).

L'agent de Norwalk est également responsable d'infection entérique. Il est à l'origine de diarrhées non sanglante accompagnées dans certains cas de céphalées et de nausées (référence 2).

L'infection par le virus de l'hépatite A s'accompagne de fièvre, d'une sensation de malaise, d'anorexie, de nausées et de gêne abdominale suivis après quelques jours d'un ictère (jaunissement de la peau); affection bénigne (1-2 semaines) ou gravement incapacitante (6-9 mois). On note toutefois de rares cas de mortalité. Le virus de l'hépatite E entraîne des symptômes proches de celui de l'hépatite A. Les symptômes comprennent l'ictère, l'anorexie, des douleurs et une sensibilité abdominales, des nausées, des vomissements et de la fièvre. Le taux de létalité de l'hépatite E peut atteindre 1 %.

### 1.3.3. Protozoaires

Les Cryptosporidies (*Cryptosporidium parvum*) causent une diarrhée aqueuse profuse, des crampes, des douleurs abdominales, une perte de poids, anorexie, flatulences et un malaise et, dans certains cas, des nausées, des vomissements, de la fièvre et des myalgies. Les symptômes sont spontanément curables chez les sujets immunocompétents, mais peuvent persister durant de longues périodes et croître en intensité chez les sujets immunodéprimés.

L'infection à Giardia (*Giardia lamblia*) provoque l'apparition subite de diarrhées nauséabondes, graisseuses mais non glaireuses ou sanglantes, accompagnées de crampes abdominales. L'infection non invasive dure normalement 1 à 2 semaines contrairement aux infections chroniques peuvent durer des mois.

Les infections à *Ascaris* sont des infections helminthiques. Elles se caractérisent par des manifestations pulmonaires et l'obstruction des canaux biliaires, pancréatiques et de l'appendice qui peuvent être fatales.

Enfin, la plupart des infections dues aux Amibes (*Entamoeba histolytica*) sont asymptomatiques. Les sujets affaiblis ou immunodéprimés peuvent présenter une brusque poussée de fièvre, des crampes abdominales sévères, une diarrhée sanglante. L'infection peut se compliquer d'une hémorragie grave, d'une péritonite et d'un abcès hépatique.

## 1.4. Amélioration de la qualité microbiologique de l'eau de boisson

Les méthodes efficaces de traitements de l'eau et bien établies dans les pays industrialisés sont rarement applicables aux pays en voie de développement notamment à cause du manque de financement et d'infrastructures. Différents programmes ont été implantés afin d'améliorer la qualité de l'eau des pays pauvres. Parmi ces projets on retrouve l'éducation de la population, le génie sanitaire et les méthodes de désinfections.

L'instauration de programme d'éducation de la population invitant par exemple les habitants à conserver une distance sécuritaire entre les lieux d'entreposage des déchets et les sources d'eau potable donne encore des résultats très aléatoires (Tchounwou *et al.*, 1997). D'autre part, le développement de la technologie et du génie sanitaire a permis l'amélioration des infrastructures tels que les pompes hydrauliques évitant ainsi la consommation des eaux de surfaces (référence 4). Bien que les pompes augmentent la quantité d'eau potable disponible, la qualité microbiologique de l'eau se dégrade toujours lors de son transport et de son entreposage.

C'est dans la perspective de préserver la qualité de l'eau potable que de nombreuses méthodes de désinfections de l'eau entreposée ont été mises au point. La filtration mécanique, bien connue des voyageurs, est onéreuse et peu fiable (Monjour *et al.*, 1990). La désinfection de l'eau par les rayons ultraviolets solaires dépend trop des conditions climatiques (De Lorenzi, Volta et Monjour, 1989). Certaines communautés ont recours à l'ébullition de l'eau avant son utilisation. Toutefois, il faut compter 1 kg de bois pour obtenir un litre d'eau potable (Monjour, 1998). La décontamination chimique, et principalement la chlorination, est une méthode peu coûteuse et bien implantée dans les pays en voie de développement. Cependant, l'efficacité antibactérienne du chlore diminue dans une eau riche en matières organiques en suspension (Chaudhuri et Sattar, 1990). Finalement, il est bien connu que la présence d'acides organiques contribuait à l'inhibition de certaines bactéries (Dickson et Anderson, 1992 ; Ouattara *et al.*, 1997 et Mahrour *et al.*, 1998a et 1998b). Les acides organiques sont naturellement présents dans les fruits, on les retrouve notamment en grande quantité dans les agrumes (*i. e.* l'acide citrique et l'acide ascorbique).



## 2. LES MICRONUTRIMENTS

Les micronutriments sont des molécules sans valeur énergétique propre. Elles sont requises en quantité minime (quelques microgrammes à 60 mg / jour) mais elles sont indispensables à la croissance, au maintien et à la reproduction de l'organisme. Elles ne sont généralement pas synthétisées par lui et doivent donc être apportées de façon exogène. On distingue deux types de micronutriments : les vitamines qui sont des molécules organiques et les minéraux, d'origine inorganique (référence 5). C'est par la négative que les micronutriments ont été découverts, c'est-à-dire par le biais de maladie résultant de leur absence dans le régime alimentaire. Depuis des siècles, la valeur des aliments est reconnue et utilisée dans la prévention et le traitement de certaines maladies. La cécité nocturne, symptôme d'une carence en vitamine A, était connue des grecs et déjà Hippocrate soignait cette maladie avec du foie de bœuf cru. (Scheider, 1985). Dans les paragraphes suivants, le rôle physiologique, les besoins nutritionnels, la pathologie des carences et la stabilité des micronutriments seront décrits.

### 2.1. Rôles physiologiques des micronutriments

#### *La vitamine A*

La vitamine A (rétinol) est une vitamine liposoluble dont les précurseurs sont les caroténoïdes. La provitamine A ( $\beta$ -carotène) est le caroténoïde le mieux connu. Précurseur de la vitamine A, il ne développe son activité qu'après avoir été transformé en rétinol dans l'organisme. La vitamine A joue quatre rôles essentiels dans l'organisme. Elle facilite la vision en entrant dans la composition des bâtonnets responsables de la vision. Elle est essentielle au maintien et au renouvellement des cellules épithéliales. Elle influence également la taille et la forme des os. Enfin, elle favorise le fonctionnement normal du système reproducteur (Scheider, 1985). Environ 10 à 50 % de la vitamine A contenu dans l'alimentation est absorbée par l'organisme au niveau du tractus gastro-intestinal. Des études récentes suggèrent que la vitamine A améliore l'absorption du fer non hémique par l'organisme (Garcia-Casal *et al.*, 1998).

### *Les vitamines du groupe B*

Les vitamines du groupe B assurent le fonctionnement de plusieurs enzymes dans l'organisme. Ce sont des vitamines hydrosolubles. La vitamine B<sub>2</sub> (riboflavine) joue un rôle plus particulier dans les réactions d'oxydoréduction. Les vitamines contenues dans les aliments sont relarguées dans l'estomac par acidification et absorbées au niveau de l'intestin grêle par transport actif impliquant les sels biliaires. Les excès de vitamine B<sub>2</sub> sont excrétés dans l'urine. La vitamine B<sub>6</sub> (pyridoxine) est un élément essentiel à la synthèse de l'hème et de la sérotonine. Enfin, la vitamine B<sub>12</sub> (cyanocobalamine) est impliquée, à différents niveaux, dans le processus de division cellulaire (Scheider, 1985). L'absorption de cette vitamine a lieu au niveau de l'intestin grêle ; elle est ensuite redistribuée vers toutes les cellules via la circulation sanguine.

### *La vitamine C*

La vitamine C (acide ascorbique) est un acide organique hydrosoluble. Elle participe également à la synthèse du collagène (protéine importante des tissus conjonctifs, des os, des dents et de la peau). La vitamine C est un fort promoteur de l'absorption du fer non hémique contenu dans les aliments (Halleberg, Brune et Rossander, 1986).

### *L'acide folique*

L'acide folique est également une vitamine hydrosoluble. Elle participe au métabolisme des acides aminés et à la synthèse des acides nucléiques. C'est un élément essentiel à la croissance et au bon fonctionnement du système nerveux (Scheider, 1985).

### *La niacine*

La niacine est essentielle à l'utilisation de l'énergie métabolique fournie par les tissus, elle est donc indispensable à la croissance. Elle est hydrosoluble et joue un rôle dans la synthèse des hormones. La niacine est très rapidement absorbée par l'organisme (au niveau de l'intestin grêle) (Scheider, 1985).

### *La vitamine E*

Le terme vitamine E désigne à la fois les tocophérols et les tocotriénols. Cette vitamine liposoluble est l'un des plus puissants piègeurs de radicaux libres connus. C'est également un protecteur vasculaire, un antiviellissement et un stimulant de l'immunité (référence 6). L'action protectrice antioxydante de la vitamine E est améliorée en présence de vitamine C et de provitamine A (bêta carotène). L'organisme n'absorbe en moyenne que 20 à 40 % de la vitamine E consommée le reste est excrété dans les fèces.

### *Le fer*

Le fer est un minéral indispensable à l'activité enzymatique. Il peut faire partie intégrante des enzymes (le fer hémique) ou bien agir à titre de cofacteur enzymatique (le fer non hémique). Seul le fer soluble est utilisé par l'organisme. La liaison du fer à l'hème facilite l'absorption du fer dans l'intestin et sa libération dans le foie. L'organisme absorbe en moyenne 15 % du fer consommé. Les excès sont excrétés dans l'urine, les fèces et la transpiration (Scheider, 1985).

## 2.2. Besoins nutritionnels et carences en micronutriments

Les besoins en micronutriments varient d'un individu à l'autre, selon l'âge, le sexe, les habitudes alimentaires et l'état de santé. Les apports journaliers recommandés (AJR) en micronutriments sont présentés dans le tableau I. Les vitamines hydrosolubles ne peuvent pas être stockées dans l'organisme. Il faut donc en consommer quotidiennement (à l'exception de la vitamine B<sub>12</sub> qui peut être stockée dans le foie). Les vitamines liposolubles peuvent être emmagasinées dans le foie et les tissus adipeux ; un apport quotidien n'est donc pas vital (Roche, 2001).

Une alimentation variée permet normalement de combler tous les besoins en vitamines et minéraux. Une carence en micronutriments est l'absence ou l'insuffisance de ces éléments, indispensables à l'organisme. Dans les pays en voie de développement, la restriction dans la variété ou dans la quantité des aliments ingérés, les problèmes métaboliques et l'augmentation des besoins physiologiques (*i. e.* croissance, grossesse) sont les trois facteurs responsables des carences en micronutriments. Les carences graves en micronutriments sont encore malheureusement très répandues dans les pays en voie de développement (Cervinskas et Lofti, 1996).

**Tableau I – Apports journaliers recommandés \* en micronutriments (Roche, 2001)**

<b>Micronutriments</b>	<b>AJR en mg</b>
Vitamine A	1500
Vitamine B <sub>1</sub>	1.1
Vitamine B <sub>2</sub>	1,2 à 1,8
Niacine	13
Vitamine B <sub>6</sub>	2
Acide folique	0,165 à 0,210
Vitamine B <sub>12</sub>	0.002
Vitamine C	45 à 60
Vitamine D	0.0025
Vitamine E	6
Fer	7 à 8

\* Apports Journaliers Recommandés pour un adulte de 19 ans et plus, en bonne santé

### 2.3. Pathologie des carences en micronutriments

Les carences en vitamines A sont endémiques dans certains pays du monde depuis des années. De nos jours, elles constituent encore un problème de santé majeur dans certains pays d'Asie, d'Afrique et d'Amérique du sud. Chaque année plus de 100.000 nouveaux cas de cécité, attribués aux carences en vitamine A, sont dénombrés dans le monde (OMS, 1996). Un des premiers signes de la déficience en vitamine A est la cécité nocturne (incapacité de voir quand la lumière est faible). Puis la cornée se kératinise, se qui la rend opaque : cette maladie s'appelle la xérophtalmie. Les carences en vitamine A affectent également la croissance et la reproduction.

Les conséquences pathologiques d'une faible carence en vitamine B<sub>2</sub> sont d'ordre dermatologique (dermatites, eczéma, etc.). Si elle n'est pas traitée, la déficience peut entraîner, dans de rares cas, des troubles nerveux de type dépression.

Dans le cas d'une faible carence en vitamine B<sub>6</sub> entraîne une anémie. Les formes plus graves de déficience en vitamine B<sub>6</sub> se traduisent par un retard de croissance, une dégénérescence neuronale et des convulsions.

La vitamine B<sub>12</sub> et l'acide folique fonctionnent de concert pour promouvoir la division cellulaire. Les symptômes de déficience de ces deux vitamines sont donc semblables. En effet, puisque ces deux vitamines sont reliées à la division cellulaire, lors d'une carence, les tissus les plus atteints sont ceux qui se renouvellent le plus rapidement. De plus une carence en vitamine B<sub>12</sub> entraîne une dégénérescence du système nerveux qui peut être fatale.

Le scorbut est la maladie due à une carence en vitamine C. Les symptômes précoces sont la perte d'appétit et des douleurs aux articulations et aux muscles. Puis des hémorragies apparaissent notamment au niveau des gencives (perte des dents), dans les muscles et les voies digestives. Le scorbut non traité est fatal, mais il est rare de nos jours, même dans les pays en voie de développement.

Les premiers symptômes de la pellagre, maladie de déficience en niacine sont la diarrhée, les flatulences et les céphalées. Le système nerveux est ensuite perturbé entraînant la dépression et l'apathie. La mort est souvent due à une insuffisance cardiaque.

Les carences en vitamine E sont plus rares car on trouve cette vitamine en grande quantité dans les aliments et l'organisme peut la mettre en réserve. Toutefois, des études ont révélées certaines modifications biochimiques comme la détérioration des globules rouges. Une perte de l'équilibre pouvant aller jusqu'à l'incapacité de marcher a également été observée dans les cas les plus graves.

L'anémie est caractéristique d'une carence en fer. Elle est due à la réduction du transport de l'oxygène par le sang. L'anémie se traduit par certains symptômes comme la fatigue, l'accélération du rythme cardiaque et des céphalées.

En plus des conséquences spécifiques à chacun de ces micronutriments, d'une manière plus générale, les carences quelques soient leurs origines, augmentent le taux de mortalité du aux maladies infectieuses en affaiblissant les individus. Pas exemple, un organisme carencé répondra moins bien à un traitement contre l'anémie (Allen, 2002)

## **2.4. Stabilité des micronutriments**

### *Effets des facteurs externes*

Les micronutriments, notamment les vitamines, sont des molécules bien connues pour leur instabilité face aux conditions environnementales. Les principaux facteurs responsables de la dégradation biochimiques des micronutriments sont le pH, la présence d'oxygène, la lumière, la température, l'humidité relative (ou activité de l'eau) et la combinaison de tous ces facteurs. L'effet de ces facteurs sur la stabilité des micronutriments est récapitulé dans le tableau II. La provitamine A (ou bêta carotène)

peut perdre son activité durant le stockage car il est sensible à l'air et la lumière. La vitamine B<sub>2</sub> est une vitamine thermostable mais extrêmement sensible à la lumière. La vitamine B<sub>6</sub> est relativement stable à la chaleur, mais se décompose à la lumière et dans des milieux alcalins. La vitamine B<sub>12</sub> perd son activité en présence de lumière, d'oxygène, d'acide et d'alcalin. La vitamine C est sensible à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène ainsi qu'aux milieux acide et alcalin. Alors que la niacine est l'une des vitamines les plus stables, l'acide folique est très sensible à la lumière, à l'oxygène et à la température. La lumière, l'oxygène et la chaleur réduisent également partiellement la teneur en vitamine E des aliments (Harris, 1988).

Contrairement à la croyance populaire, Kramer (1977) précise que la plus forte dégradation des vitamines a lieu au cours de l'entreposage et non lors de la transformation des produits les contenant. Les conditions d'entreposage rencontrées dans les pays en voie de développement sont souvent extrêmes, surtout dans le cas de la température et de l'humidité relative. Renner (1988) rapporte notamment une perte de 50 % de vitamine B<sub>1</sub> au cours de l'entreposage du lait U.H.T. (lait de longue conservation traité à Ultra Haute Température) et ce, après 30 semaines d'entreposage à 26°C. Chen, Peng et Chen (1996) montrent également une perte de 65,18 % de provitamine A dans le jus de carotte après 3 mois d'entreposage à 35°C.

La dégradation des micronutriments a des conséquences importantes. Des modifications biochimiques entraînent une perte de l'activité biologique des micronutriments et peuvent également conduire à la formation de composés potentiellement toxiques (Harris, 1988). L'oxydation est le mécanisme le plus fréquemment responsable de telles dégradations (Gimenez *et al*, 2002).



**Tableau II – Stabilité des micronutriments face aux facteurs externes (adapté de Harris, 1988)**

	pH			Oxygène	Lumière	Température	Humidité relative
	Acide	Neutre	Alcalin				
	pH<7	pH=7	pH>7				
Provitamine A	S	I	S	I	I	I	S
Vitamine B <sub>2</sub>	S	S	I	S	I	S	I
Vitamine B <sub>6</sub>	S	S	I	S	I	S	I
Vitamine B <sub>12</sub>	I	S	I	I	I	S	I
Vitamine C	I	S	I	I	I	I	I
Acide folique	I	I	S	I	I	I	I
Niacine	S	S	S	S	S	S	S
Vitamine E	S	S	S	I	I	I	S
Fer	S	S	S	S	S	S	S

S : Stable (pas de dégradation importante)

I : Instable (destruction significative)

### *Interactions entre micronutriments*

En plus de l'influence des différents facteurs externes, les pertes en micronutriments peuvent être catalysées par la présence d'autres micronutriments (Dary, Guamuch et Nestel, 1998). Des expériences multifactorielles démontrent l'existence de réactions antagonistes entre vitamines et minéraux. Par exemple, la présence de traces de fer catalyse fortement l'oxydation de la vitamine C et donc inhibe ses capacités antiscorbutiques (Premkumar et Bowlus, 2002). Au contraire, Machlin et Gabriel (1980) ont mis en évidence des réactions synergiques entre les vitamines. En effet, la vitamine C participe à la régénération du radical tocophérol assurant ainsi la conservation de ses fonctions biologiques au cours du stockage.

### 3. L'ENCAPSULATION

L'encapsulation est une technique relativement nouvelle permettant l'enrobage de diverses substances. Outre une action protectrice, l'encapsulation permet dans une certaine mesure de maîtriser voire de contrôler la libération des substances encapsulées. Il existe deux types d'encapsulation : la substance est soit enfermée à l'intérieur d'une capsule, soit piégée dans une matrice (aussi appelé le confinement). Ses domaines d'applications sont nombreux : l'alimentaire (*i. e.* arômes, enzymes, micro-organismes, etc.), l'horticulture (*i. e.* graines et cellules végétales) et le pharmaceutique (*i. e.* principe actif de médicament, etc.).

#### 3.1. Les matrices d'encapsulation

Les matériaux, utilisés pour la constitution de la matrice, sont choisis en fonction de l'ingrédient à encapsuler et des caractéristiques recherchées pour la capsule. Ces matériaux doivent répondre à plusieurs critères, notamment : de bonnes propriétés rhéologiques, absence de réactivité avec l'ingrédient à encapsuler, protection maximale des ingrédients encapsulés vis-à-vis des conditions de stockage et enfin ils doivent être comestible ou GRAS (Generally Recognized As Safe). En pratique, chaque matériau ne possède pas toutes ces propriétés, et ce sont souvent des combinaisons de plusieurs matériaux qui sont utilisées. Les matériaux les plus courants sont des hydrates de carbone (amidon, chitosane), des gommes (alginates, carraghénanes), des lipides, et des protéines, en particulier les protéines laitières (Sloms, 1986, Knorr et Daly, 1988 et Edwards-Lévy et Lévy, 1999).

##### *L'amidon*

L'amidon est la forme privilégiée de mise en réserve du glucose chez les végétaux. C'est un polymère d'unités de glucose (environ 200 unités). Ce polysaccharide se présente sous forme de poudre blanche soluble dans l'eau. L'amidon présente un intérêt

dans l'encapsulation des arômes : sa structure hélicoïdale induit des complexes très stables avec ce type de molécule (Sloms, 1986).

### *Le chitosane*

Le chitosane est obtenu à partir des carapaces de crustacés. C'est un polymère cationique de D-glucosamine en  $\beta$  (1-4). Le chitosane est soluble dans les acides dilués. Outre son utilisation pour l'encapsulation, le chitosane présente des propriétés antibactérienne, antifongique et antitumorale (Moreno, 2000). Le chitosane est rarement utilisé seul dans les techniques d'encapsulation. En effet, les procédés d'encapsulation basé sur les interactions entre le chitosane et l'alginate sont nombreux (Knorr et Daly, 1988 et Pandya et Knorr, 1991 et Shahidi et Han, 1993).

### *L'alginate*

On retrouve l'alginate dans la paroi cellulaire des algues brunes. C'est un hétéropolymère anionique d'acide-D-mannuronique et d'acide-L-glucuronique (Martin, 1986). Ses propriétés chimiques (*i. e.* la capacité de réticulation, la solubilisation selon le pH du milieu, etc.) font de l'alginate un biopolymère très prisé dans le développement de matrice pour l'encapsulation (Edwards-Lévy et Lévy, 1999). Une des méthodes d'encapsulation des cellules vivantes la plus utilisée est basée sur une matrice d'alginate et d'ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$  (Edwards-Lévy et Lévy, 1999).

### *Les carraghénanes*

Comme l'alginate, les carraghénanes sont issues des algues marines. Ce sont des polymères d'unités de galactose. Elles forment des gels thermoréversibles et sont utilisées en faible concentration (Shahidi et Han, 1993).

### *La lécithine*

On retrouve la lécithine dans les céréales oléagineuses comme le soja. Cet émulsifiant, constitué de différents phospholipides, est important dans l'industrie alimentaire. Une des applications les plus courantes de la lécithine est la formation de vésicules (les liposomes), pour l'encapsulation d'enzymes, car elle peut être réalisée à basse température (Koide et Karel, 1987).

### *Les protéines laitières*

Les protéines laitières sont les caséinates (alpha, bêta et kappa) et les protéines du lactosérum (5 protéines dont l' $\alpha$ -lactalbumine, la  $\beta$ -lactoglobuline). Selon le mode d'extraction, on distingue deux types de mélange protéique issue du lactosérum: les protéines du lactosérum concentrées ou Whey Protein Concentrate (WPC) contenant environ 70 % de protéines et les protéines du lactosérum isolées ou Whey Protein Isolate (WPI) contenant environ 90 % de protéines (Sabato *et al.*, 2001). Elles sont reconnues pour leur valeur nutritive et leur faible coût. Elles sont le plus souvent utilisées en association avec des polysaccharides dans les procédés d'encapsulation pour l'amélioration des propriétés physicochimiques des matrices (Schmitt *et al.*, 1998).

## **3.2. Les techniques d'encapsulation**

Différents procédés d'encapsulation sont utilisés : méthodes physiques (les liposomes), chimiques (la gélification) ou physico-chimiques (l'atomisation et le lit fluidisé). L'encapsulation dans les liposomes réside en le piégeage d'une substance à l'intérieure d'une sphère formée d'une bicouche de phospholipides (*i. e.* les vésicules de lécithine). La gélification consiste en l'ajout d'un agent gélifiant dans un mélange constitué de la substance à protéger et de la solution d'encapsulation (*i. e.* l'ajout d'ions calcium à une solution d'alginate). L'atomisation est la vaporisation à chaud de la solution d'encapsulation sur la substance à protéger. Enfin, dans l'encapsulation sur lit fluidisé, les particules à protéger sont mises en suspension par un jet d'air (chaud ou

froid) provenant du dessous, alors que la solution d'encapsulation est vaporisée par le dessus (Shahidi et Han, 1993).

Le procédé est choisi en fonction des contraintes économiques, de la sensibilité de l'ingrédient à encapsuler, de ses propriétés physiques et chimiques, de la taille des capsules désirée, de l'utilisation des capsules, du mécanisme de libération des ingrédients.

### **3.3. Caractéristiques des capsules**

Les capsules résultant de l'encapsulation sont essentiellement de forme sphérique. Selon leur taille, on distingue deux sortes de capsules : les microcapsules (dont le diamètre est de l'ordre du micromètre) et les capsules (dont le diamètre est de l'ordre du millimètre). Le mode de libération de la substance encapsulée est également un élément caractéristique des capsules. Il dépend des propriétés rhéologiques de la capsule (force à la rupture, viscoélasticité, gonflement, etc.), de la nature inhérente à la matrice (propriété du polymère, etc.) et de la méthode d'encapsulation (interactions chimiques impliquées).

### **3.4. Encapsulation de micronutriments**

L'encapsulation est une technique parfaitement adaptée aux micronutriments, qui sont réputés pour être des molécules chimiquement instables.

L'objectif principal de l'encapsulation des micronutriments est d'améliorer leur stabilité face aux conditions de stockage. Toutefois, dans le domaine alimentaire, l'encapsulation permet aussi de diminuer la dégradation de certains micronutriments (comme le fer) au cours des différentes étapes de transformation des aliments, qui se traduit par l'apparition de mauvaises saveurs. Un autre intérêt de l'encapsulation est aussi de réduire les interactions entre les micronutriments eux-mêmes ou bien entre les micronutriments et les autres ingrédients de la préparation. Enfin, dans de nombreuses

applications, l'encapsulation peut également avoir pour but de contrôler la libération des micronutriments (Shahidi et Han, 1993). L'encapsulation des micronutriments est notamment très usitée dans le domaine de la cosmétique. La vitamine C encapsulée dans des liposomes est ajoutée aux crèmes de soins (référence 7). C'est toutefois dans le domaine de l'alimentaire que l'encapsulation des micronutriments est la plus répandue. Les vitamines et les minéraux encapsulés sont utilisés seuls ou ajoutés dans des mélanges d'aliments secs tels que la farine, le lait en poudre, les céréales ou les boissons aux fruits. Les applications sont nombreuses, autant pour les vitamines hydrosolubles et liposolubles que pour les minéraux. Dans les pays industrialisés, l'enrichissement des pâtes avec la vitamine B<sub>1</sub>, la vitamine B<sub>2</sub> et la niacine encapsulées a permis de limiter les pertes imputables à la cuisson des produits (Berglund, Dick et Dreher, 1987). L'encapsulation de la vitamine A dans une matrice de gélatine lors de la fabrication de lait maternisé en poudre permet d'augmenter significativement sa stabilité (Shahidi et Han, 1993). Finalement, dans le cadre de programme de fortification en minéraux, l'encapsulation de l'iode pour l'enrichissement du sel est une technologie en voie de développement pour des applications dans les pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du sud (référence 8).

# **PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE**



Le présent projet de recherche a pour objectif l'optimisation d'un programme de fortification en micronutriments basé sur l'emploi d'une boisson en poudre, enrichie en vitamines et minéraux et destinée aux pays en voie de développement. L'optimisation d'un tel programme consiste d'une part en l'évaluation de l'activité antibactérienne de la boisson reconstituée et d'autre part en l'étude de la stabilité de la poudre au cours du stockage.

Cette étude est basée sur les hypothèses suivantes : 1- Les deux acides organiques présents dans la boisson (l'acide citrique et l'acide ascorbique) pourraient posséder un effet bactéricide; 2- L'instabilité individuelle des micronutriments (vis-à-vis des facteurs externes tels que la température et l'humidité relative) est déjà connue mais les interactions entre les micronutriments présents dans la boisson pourraient également être la source de nouvelles dégradations; 3- La mise au point de polymères pour l'encapsulation de micronutriments permettrait une meilleure stabilisation de ceux-ci.

Les objectifs du présent projet sont 1- de **déterminer l'effet des acides organiques contenus dans la boisson sur des micro-organismes pathogènes** après reconstitution avec de l'eau contaminée; 2- **d'évaluer l'effet de la température et de l'humidité relative sur la stabilité des micronutriments** contenus dans la boisson; 3- **développer une méthode d'encapsulation des micronutriments** afin de protéger les micronutriments les plus sensibles lors du passage dans le tractus gastro-intestinal et au cours du stockage dans des conditions extrêmes.

Pour atteindre les objectifs, plusieurs techniques de microbiologie, de biochimie et de chimie ont été utilisées. L'activité antibactérienne de la boisson a été déterminée grâce à l'étude de la cinétique d'inhibition de trois souches appartenant aux espèces les plus représentatives de la flore microbienne pathogène de l'eau (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhi* et *Serratia liquefaciens*). Ces dénombrements bactériens ont permis d'étudier l'impact du type et du degré de contamination de l'eau ainsi que l'influence du temps de contact entre les bactéries et la boisson. L'effet spécifique des acides organiques a été démontré par le suivi du pH et l'utilisation d'acide minéral. La stabilité des

micronutriments a été évaluée par dosage chromatographique sur des échantillons de boisson en poudre entreposés à deux températures (23°C et 45°C) et deux degrés d'humidité relative (56 % et 100 %) pendant 9 mois, soit la date limite d'utilisation optimale (DLUO) du produit. L'encapsulation des micronutriments a été effectuée conjointement avec l'équipe de chimistes du laboratoire qui a développé la matrice. L'étude de stabilité des micronutriments encapsulés a été faite sur les trois micronutriments les plus sensibles (une vitamine hydrosoluble, une vitamine liposoluble et un minéral). L'étude de stabilité a été réalisée i) en mimant le passage dans le tractus gastro-intestinal et ii) lors du stockage dans des conditions normales et extrêmes de température (23°C et 45°C) et de d'humidité relative (56 % et 100 %) pendant 6 mois.

## **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

# 1. ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE

## 1.1. Milieux de culture

Le bouillon tryptonné au soja (Tryptic Soy Broth, TSB, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) a été utilisé pour la culture des souches. La gélose tryptonnée au soja (Tryptic Soy Agar, TSA, Difco laboratoires, Detroit, MI, USA) a été préparée pour le dénombrement bactérien.

## 1.2. Souches bactériennes

Trois souches bactériennes ont été retenues pour cette étude. La souche *Escherichia coli* ATCC 25922 et la souche *Salmonella* Typhi ATCC 19340 proviennent de l'American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). La souche *Serratia liquefaciens* provient du Centre de Recherche et de Développement sur les Aliments (CRDA, Ste-Hyacinthe, QC.). Un mélange bactérien composé des trois souches en quantité égale (33 % d'*E. coli*, 33 % de *S. Typhi* et 33 % de *S. liquefaciens*) a également été utilisé.

## 1.3. Standardisation des cultures

Les souches congelées ont été décongelées, puis repiquées deux fois dans du bouillon TSB (1 mL de culture dans 9 mL de bouillon) et incubées sous agitation pendant 24 heures à 35°C.

Des courbes de croissance ont été effectuées pour chacune des souches pures. Un flacon erlenmeyer contenant 90 mL de bouillon TSB a été inoculé avec 10 mL de culture, puis incubé sous agitation à 35°C. Des prélèvements ont été effectués toutes les heures pendant 24 heures. La croissance bactérienne a été suivie parallèlement sur chaque prélèvement par 1) dénombrement des colonies présentent sur gélose TSA après 24

heures d'incubation à 35°C et 2) par mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre (DMS 200 UV visible spectrophotomètre, Varian, Sunnyvale, CA, USA) à 540 nm. Les résultats obtenus ont permis de tracer les courbes de croissance de chaque bactérie au cours du temps (voir appendice A).

Le pouvoir antibactérien de la boisson a été évalué sur les souches pathogènes énumérées plus haut. Les souches bactériennes ont été cultivées pendant 18 heures à 35°C permettant l'obtention d'une culture bactérienne en phase stationnaire, et donc un nombre de bactéries par mL constant et homogène. Les concentrations de ces cultures ont été déterminées après mesure de la densité optique, grâce aux courbes de croissance établies.

#### **1.4. Préparations des échantillons**

La boisson en poudre utilisée est une formulation commerciale artificielle (Centre de Recherche pour le Développement Industriel, Ottawa, ON) composée de sucre, d'arômes, de colorant et enrichie en micronutriments (la composition est présentée dans l'appendice B). Elle est présentée en sachet individuel de 25 g chacun à reconstituer dans 200 mL d'eau. Le produit a été reconstitué selon les indications du fabricant, mais avec de l'eau artificiellement contaminée selon le protocole expérimental.

Le protocole expérimental mis en place a permis l'étude de deux facteurs : 1) le degré de contamination initial et 2) le temps de contact entre la boisson et les bactéries.

La boisson originale a été préparée comme suit : trois flacons erlenmeyer contenant chacun 200 mL d'eau physiologique (contenant 0.9 % de chlorure de sodium, Laboratoire Mat, Beauport, QC) stérile ont été préalablement mis à une température de 30°C pendant 18 heures. Les flacons erlenmeyer ont été artificiellement contaminés avec un volume précis d'un type bactérien pur ou du mélange des trois souches afin d'obtenir une concentration finale de  $10^3$ ,  $10^5$  et  $10^7$  bactéries / mL. Enfin, 25 g de boisson en poudre (un sachet) ont été ajoutés dans chaque flacon erlenmeyer désignant le temps zéro de l'expérience. Afin de démontrer l'action spécifique des acides minéraux, la totalité de

l'expérience a également été réalisée avec une boisson en poudre (préparée par le fabricant) ne contenant pas d'acide organique. Ce deuxième type de boisson a été préparée comme suit : le pH de l'eau physiologique stérile destinée à la reconstitution de la boisson a été ajusté au pH de la boisson originale (soit  $\text{pH} = 3,2$ ) avec un acide minéral (HCl 1 M) avant la contamination bactérienne. Finalement, le contrôle négatif de cette expérience a été obtenu en répétant la totalité de l'expérience avec la boisson en poudre ne contenant pas d'acide organique et sans ajustement de pH.

### **1.5. Mesure de l'activité antibactérienne**

Des prélèvements ont été effectués à  $t = 0$  (reconstitution de la boisson en poudre avec l'eau artificiellement contaminée), 5, 10, 60 et 180 min correspondant au temps de contact entre la boisson et les bactéries. À chaque jour de prélèvement, plusieurs dilutions décimales de chaque échantillon dans de l'eau peptonée (0,9 g / L, Bactopeptone, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) stérile ont été préparées. Les trois dilutions les plus appropriées ont été ensemencées en masse dans environ 15 mL de gélose TSA en surfusion (deux boîtes par dilution). Après 24 heures d'incubation à 35°C, le compte bactérien a permis de déterminer le nombre de bactéries dans l'échantillon de départ.

### **1.6. Mesure du pH**

À chaque jour de prélèvement, le pH de chaque échantillon a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre (modèle 420A, Orion research Inc., Boston, MA, USA) préalablement calibré.

## 1.7. Détermination du taux de dissociation des acides

Afin de mettre en évidence l'action des acides organiques (acides ascorbique et citrique), la concentration de la forme non dissociée des acides dans la boisson originale a été déterminée sur une base théorique tel que définie par Ouattara *et al*, 1997 :

$$[\text{A.O. non dissocié}] = [\text{A.O. totale}] / (1+10^{(\text{pH}-\text{pKa})})$$

où: [A.O.non dissocié] est la concentration en acide organique non dissociée (g/L)  
 [A.O. totale] est la concentration totale en acide organique (g/L)  
 pKa est la constante de dissociation de l'acide impliqué  
 (soit 3,14 pour l'acide ascorbique et 4,1 pour l'acide citrique (Merck, 1996))

Exemple de calcul dans le cas de l'expérience avec *Escherichia coli* dont l'inoculum de départ est  $10^3$  bactéries /mL, à  $t = 5$  min :

- la valeur du pH est 3,19
- la concentration initiale de l'acide ascorbique dans la boisson est 0,375 g / L
- le pKa de l'acide citrique est 4,10 (Merck, 1996)

La concentration en acide ascorbique sous forme non dissociée est alors :

$$[\text{A.O. non dissocié}] = 0,375 / (1+10^{(3,19-4,10)})$$

$$[\text{A.O. non dissocié}] = \mathbf{0,33 \text{ g / L}}$$

## **2. STABILITÉ DES MICRONUTRIMENTS**

### **2.1. Protocole expérimental**

Les sachets contenant 25 g de boisson en poudre ont également été utilisés comme échantillons dans cette expérience. Le protocole expérimental a permis l'étude de deux facteurs : l'effet de l'humidité relative et celui de la température de stockage. Les deux degrés d'humidité relative, 100 % et 56 % ont été obtenus en utilisant des dessiccateurs en verre fermés hermétiquement et contenant respectivement de l'eau distillée et une solution saturée de bromure de sodium (Laboratoire Mat, Beauport, QC). Les dessiccateurs ont été placés dans deux étuves à  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  et  $45^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Les sachets de boisson en poudre ont été stockés dans ces quatre conditions de stockage ( $23^{\circ}\text{C}$ -56 % H. R. ,  $23^{\circ}\text{C}$ -100 % H. R.,  $45^{\circ}\text{C}$ -56 % H. R. et  $45^{\circ}\text{C}$ -100 % H. R.) pendant 9 mois, soit, la date limite d'utilisation optimale (DLUO) déterminée par le fabricant. Des échantillons ont été prélevés périodiquement (jour 1, jour 15 et après 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 mois) afin de déterminer la concentration de chaque micronutriment encore présent dans la boisson en poudre. Le jour de l'analyse, les échantillons ont été reconstitués selon les recommandations du fabricant, soit un sachet de 25 g de poudre dans 200 mL d'eau.

### **2.2. Extraction des vitamines hydrosolubles**

Les vitamines B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, l'acide folique et la niacine ont été extraits selon la méthode d'Albalà-Hurtado *et al.* (1997). Dix millilitres d'échantillon (c'est-à-dire la boisson reconstituée) ont été mélangés à 1 g d'acide trichloroacétique solide (TCA, Laboratoire Mat, Beauport, QC) dans un tube à centrifuger de 50 mL, pendant 10 min. Afin de déterminer le rendement de l'extraction, 1 mL de vitamine B<sub>1</sub> 1 g / L (thiamine, Supelco, Oakville, ON) a été ajouté comme standard interne. Après 10 min de centrifugation (Centrifugeuse Sorval RT6000B, Dupont Cie, Wilmington, USA) à 1250 x g à 4°C, le surnageant a été conservé. Le culot a été repris avec 3 mL de solution



aqueuse de TCA à 4 %, puis centrifugé à nouveau pendant 10 min à 1250  $x g$  à 4°C. Les deux surnageants ont été déposés dans une fiole jaugée de 10 mL, et le volume a été complété avec la solution aqueuse de TCA à 4 %.

La vitamine C a été extraite tel que décrit par Lavigne *et al.* (1987). Une mini colonne préparative Sep-Pak C<sub>18</sub> (Waters, Milford, Ma, USA), a permis de purifier et de concentrer la vitamine C totale. La mini colonne préparative fonctionnant comme une seringue a été préalablement activée par 5 mL de méthanol 100 % (Laboratoire Mat, Beauport, QC) puis, par 15 mL d'eau distillée. Trente millilitres d'échantillons ont ensuite été filtrés par cette mini-colonne. Les 20 derniers millilitres ont été collectés pour le dosage de la vitamine C.

Tous les échantillons ont été filtrés à travers un filtre de pores de 45  $\mu m$  de diamètre (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA) avant l'analyse. Durant toute l'expérience, les vitamines hydrosolubles ont été protégées de la lumière en recouvrant les contenants de papier d'aluminium.

### **2.3. Extraction des vitamines liposolubles**

La vitamine E (DL,  $\alpha$ -Tocopherol acétate) et la provitamine A (bêta carotène) ont été extraites selon la méthode de Epler, Ziegler et Craft, (1993). Dans un tube à centrifuger de 15 mL, 1 mL de boisson reconstituée a été mélangé avec 1 mL d'hexane (qualité HPLC, Laboratoire Mat, Beauport, QC). Afin de déterminer le rendement de l'extraction, 100  $\mu L$  d'une solution standard de vitamine D<sub>2</sub> à 100 mg / L (Ergocalciférol, Supelco, Oakville, ON) ont été ajoutés comme standard interne. Après centrifugation pendant 30 secondes à 2000  $g$  à 4°C, le surnageant a été conservé. Le culot a été repris avec 1 mL d'hexane puis centrifugé à nouveau pendant 30 secondes à 2000  $x g$  à 4°C. Les deux surnageants ont été mélangés, évaporés sous azote (Praxair Canada Inc., Mississauga, ON) puis reconstitués avec un millilitre d'éthanol (qualité HPLC, Laboratoire Mat, Beauport, QC). Tous les échantillons ont également été filtrés à travers un filtre de pores de 45  $\mu m$  de diamètre avant l'analyse. Durant toute l'extraction, les vitamines

liposolubles ont été protégées de la lumière en recouvrant les contenants de papier d'aluminium.

#### **2.4. Dosage des vitamines : la chromatographie liquide haute performance**

Après extraction, la concentration de chaque vitamine a été déterminée par chromatographie liquide haute performance à l'aide d'un appareil HPLC (Vista 5500, Varian, Walnut Creek, CA, USA) équipé d'un détecteur UV standard.

Les vitamines hydrosolubles ont été séparées grâce à une colonne Supelcosil LC-8-DB, phase inverse, 33 mm x 4,6 mm (Supelco, Oakville, ON) précédée d'une colonne de garde. L'analyse a été effectuée à température ambiante ( $23^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). Un mélange de méthanol (qualité HPLC, Laboratoire Mat, Montréal, QC) et d'une solution aqueuse d'hexane sulfonate (4,3 mM, Fluka chemika, Oakville, ON) dans un rapport 15 : 85 a été utilisé comme phase mobile avec un débit de 1 mL / min. Pour chaque analyse, 10  $\mu\text{L}$  d'échantillon ont été injectés. L'identification des vitamines a été basée sur leur temps de rétention. La détermination de la concentration a été obtenue par mesure de l'aire sur la courbe de chaque pic à 210 nm et par comparaison avec les courbes standards. Les courbes standards pour chaque micronutriment ont été établies avant chaque analyse selon la même procédure analytique à l'aide de cinq dilutions de standards commerciaux purs (Supelco, Oakville, ON).

Les vitamines liposolubles ont été séparées sur une colonne Supelcosil LC-18, phase normale, 250 mm x 4,6 mm (Supelco, Oakville, ON) précédée d'une colonne de garde. L'analyse a été réalisée à  $35^{\circ}\text{C}$  grâce à un chauffe colonne. La phase mobile, composée d'un mélange de méthanol (qualité HPLC, Laboratoire Mat, Beauport, QC) et d'eau distillée dans un rapport 98 : 2, a été utilisée au débit de 1 mL / min. Pour chaque analyse, 20  $\mu\text{L}$  d'échantillon ont été injectés. L'identification des vitamines a été basée sur leur temps de rétention. La quantification de chaque vitamine a été obtenue par la mesure de l'aire sous la courbe des pics chromatographiques et par comparaison avec les courbes

standards. La mesure a été réalisée à 325 nm pour la provitamine A et à 290 nm pour la vitamine E. Les courbes standards ont été établies à l'aide de 5 dilutions de standards commerciaux purs (Supelco, Oakville, ON) analysés selon cette méthode.

## **2.5. Dosage des minéraux : la spectrométrie par absorption atomique**

La concentration des minéraux a été déterminée directement sur la boisson reconstituée, sans extraction préalable, à l'aide d'un spectromètre par absorption atomique (SpectrAA-10, Varian, Walnut Creek, CA, USA). Un mélange gazeux d'air et d'acétylène a permis d'obtenir la flamme nécessaire à la combustion des échantillons.

La concentration du fer ionique a été déterminée par mesure de la densité optique à 248.3 nm et par comparaison avec la courbe standard. La courbe standard a été obtenue selon la même procédure analytique à l'aide de cinq dilutions (0,5 ; 1,0 ; 1,5 ; 2,0 et 2,5 g / L) d'un standard commercial pur, le citrate d'ammonium ferrique préparé par le CRDI (Ottawa, ON).

### 3. ENCAPSULATION DES MICRONUTRIMENTS

#### 3.1. Préparations des solutions

Les billes sont constituées d'un cœur (contenant le micronutriment, et donnant son nom à la bille) et d'une couche externe. Deux types de polymères, l'un anionique, l'alginate (alginate de sodium, Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON) et l'autre cationique, le chitosane (faible poids moléculaire, 85 % désacétylé, Pêcheries Marinard Ltée., Rivières-Aux-Renards, QC) ont été utilisés en alternance sous leur forme native (non fonctionnalisée) et fonctionnalisée. La fonctionnalisation, une acylation, a été réalisée selon la méthode de Le Tien *et al.* (2001), (voir appendice C), selon le ratio 4 (polymère) : 1 (chlorure de palmitoyle, Fluka chemika, Oakville, ON). Le chitosane et l'alginate ont été choisis par rapport à leur bonne propriété de gélification. Toutefois un phénomène d'érosion des billes à base d'alginate a été démontré (Murata *et al.*, 1993) c'est pourquoi le système de double encapsulation a été choisi. Les propriétés du cœur des billes seront, par la suite, comparés deux à deux, afin d'étudier l'effet de la nature du polymère (alginate, recette n° 1 vs. chitosane, recette n° 3 et alginate fonctionnalisé, recette n° 2 vs. chitosane fonctionnalisé, recette n° 4). Les protéines laitières (isolat de protéines de lactosérum, 97,8 % de protéines) ont été fournies par Davisco Foods International Inc. (Eden Prairie, USA).

**Tableau III : Composition des solutions pour la formation des 4 types de billes (% en poids / volume)**

Type de billes	Solution du cœur	Solution de la couche externe
N°1 – AN (Alginate Natif)	3 % alginate 1,5 % protéines laitières	0,5 % chitosane 1,5 % protéines laitières
N°3 – CN (Chitosane Natif)	3 % chitosane 1,5 % protéines laitières	0,5 % alginate 1,5 % protéines laitières
N°2 – AF (Alginate Fonctionnalisé)	3 % alginate fonctionnalisé 1,5 % protéines laitières	0,5 % chitosane fonctionnalisé 1,5 % protéines laitières
N°4 – CF (Chitosane Fonctionnalisé)	3 % chitosane fonctionnalisé 1,5 % protéines laitières	0,5 % alginate fonctionnalisé 1,5 % protéines laitières

Les solutions ont été préparées par dissolution des poudres d'alginate, d'alginate fonctionnalisé et de protéines laitières dans de l'eau distillée. La dissolution des poudres de chitosane et de chitosane fonctionnalisé a été réalisée dans une solution aqueuse acide (0,5 mL d'acide acétique par gramme de poudre).

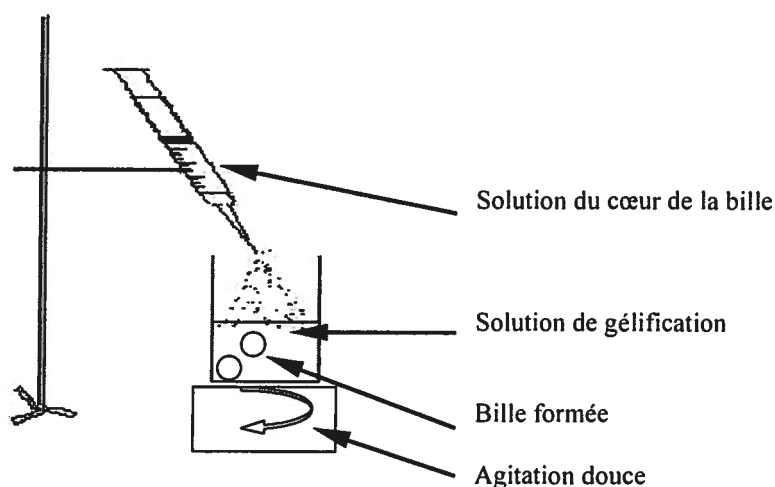
Pour l'étude des propriétés physico-chimiques, des billes ne contenant pas de micronutriments ont été fabriquées. Pour les études de stabilité et de libération contrôlée des micronutriments, les micronutriments ont été ajoutés aux différentes solutions, tel que décrit plus bas.

### 3.2. Formation des billes

Les billes ont été formées selon le principe de la gélification. La gélification est le résultat d'interactions fortes et spécifiques entre les polymères ioniques (anionique comme l'alginate) et des ions divalents (par exemple, les ions calcium  $\text{Ca}^{++}$ ) (Braccini et Perez, 2001).

#### *Formation du cœur de la bille.*

Les solutions du cœur à base d'alginate natif et fonctionnalisé (solutions 1 et 2) ont été laissées tomber goutte à goutte, à l'aide d'une seringue, dans une solution aqueuse de chlorure de calcium à 10 % ( $\text{CaCl}_2$ , Laboratoire Mat, Beauport, QC). Les solutions du cœur à base de chitosane natif et fonctionnalisé (solutions 3 et 4) ont été déposées dans le corps de la seringue et sont tombées goutte à goutte grâce à la seule poussée de la pesanteur, dans une solution aqueuse de sodium tripolyphosphate 5 % (Aldrich, Oakville, ON). Puis les billes ont été laissées sous agitation douce dans leur solution respective de gélification pendant 30 min. Le montage utilisé est présenté sur la figure 1.



**Figure 1 - Schéma du montage servant à la formation des billes**

#### *Formation de la couche externe de la bille*

Afin d'améliorer les propriétés mécaniques des billes en créant des liaisons hydrophobes (cas des polymères fonctionnalisés) ou des liaisons ioniques (cas des polymères non fonctionnalisés) les couches externes des billes ont été composées du polymère de charge opposée au polymère formant le cœur de la bille, mais de même nature fonctionnelle (natif ou fonctionnalisé). Pour former cette couche externe, les billes à base d'alginate natif et fonctionnalisé ont été déposées, sous agitation douce pendant une heure, dans la solution de la couche externe à base de chitosane (natif et fonctionnalisé), dont la composition est décrite dans le tableau III, et inversement. Les billes ont ensuite été rincées rapidement avec de l'eau distillée, filtrée et séchées 24 heures à 40°C dans un four Pasteur.

### **3.3. Mesure des propriétés physico-chimiques**

#### ***3.3.1. Propriétés mécaniques***

Les propriétés mécaniques des billes ont été mesurées à l'aide d'un texturomètre Voland Stevens-LFRA (modèle TA-1000, Texture Technologies Corp., Scarsdale, USA), selon les méthodes de Beaulieu *et al.* (2001). Les mesures ont été effectuées sur des billes sèches remise en solution pendant 10 min dans de l'eau distillée, la mise en solution permettant de mimer la reconstitution de la boisson.

#### **Force et déformation à la rupture**

Un poinçon en plastique de 20 mm de diamètre descend perpendiculairement à la bille à une vitesse de  $0,2 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$  jusqu'à 50 % de sa hauteur. La résistance de la bille jusqu'à sa rupture a été enregistrée par une imprimante (la vitesse de déroulement du papier est de  $50 \text{ cm} \times \text{min}^{-1}$ ). Le texturomètre est calibré à 700 g.

Les 2 valeurs ont ensuite été calculées grâce au graphique obtenu (figure 2) présenté à la page suivante. La force à la rupture a été déterminée selon la formule suivante :

$$FR = 9,81 \frac{28 h}{e}$$

FR : force à la rupture (N x mm<sup>-1</sup>)

9,81 : constante de l'accélération de la pesanteur (m x s<sup>-2</sup>)

28 : coefficient multiplicateur correspondant à la calibration du texturomètre (700 g) divisé par la longueur du papier (25 cm)

h : hauteur du pic sur le graphique (cm)

e : épaisseur de la bille (uM)

(Le calcul nécessite de connaître le diamètre de la bille. Celui-ci a été mesuré à l'aide d'un indicateur digital Mitutoyo (Mitutoyo MFG, Tokyo, Japon)).

La déformation à la rupture a été déterminée selon la formule suivante :

$$DR = \frac{l}{8,33}$$

DR : déformation à la rupture (mm)

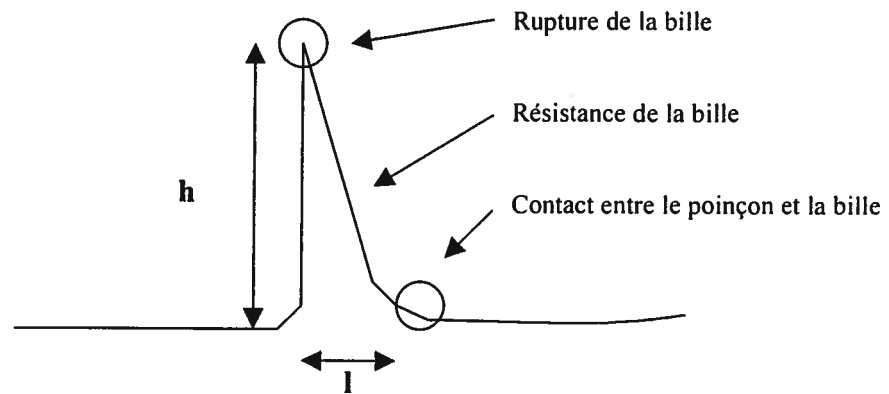
l : largeur du pic sur le graphique (mm)

8,33 : vitesse de déroulement du papier (en mm x s<sup>-1</sup>, soit 50 cm x min<sup>-1</sup>)



$h$  : hauteur en mm

$l$  : longueur en mm



**Figure 2 - Exemple de graphique obtenu lors du test de force et de déformation à la rupture**

### Viscoélasticité ou coefficient de relaxation

La viscoélasticité correspond à la réponse mécanique de la bille après l'application d'une force pendant 30 secondes. Un poinçon cylindrique de 20 mm de diamètre descend perpendiculairement à la bille avec une vitesse de 0,2 mm x s<sup>-1</sup> jusqu'à 90 % de sa hauteur. La relaxation de la bille, à partir de l'instant où le poinçon entre en contact, a été enregistrés par une imprimante (la vitesse de déroulement du papier est de 10 cm x min<sup>-1</sup>). Le texturomètre est calibré à 700 g. La viscoélasticité a ensuite été calculée grâce au graphique obtenu (figure 3) présenté page suivante.

La mesure des forces enregistrées à l'instant t = 0 (Fi) et t = 30 s (Ff) permet de déterminer la viscoélasticité selon la formule suivante :

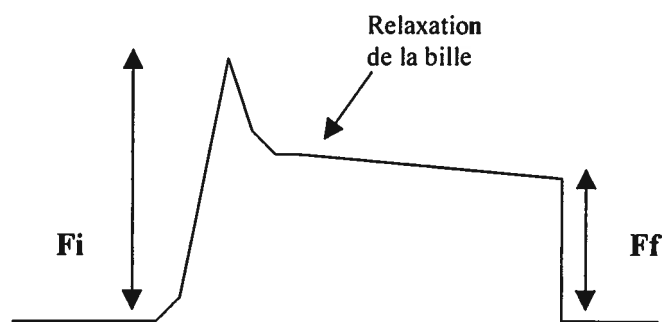
$$CR_{(30 \text{ secondes})} = \frac{F_i - F_f}{F_i}$$

CR : coefficient de relaxation ou viscoélasticité ( $0 \leq CR_{(30\text{sec.})} \leq 1$ )

Fi : force initiale mesurée à l'instant t = 0 (en Newton)

Ff : force finale mesurée à l'instant t = 30 secondes (en Newton)

$F_f$  : Force finale en N x mm  
 $F_i$  : Force initiale en N x mm



**Figure 3 - Exemple de graphique obtenu lors du test de viscoélasticité**

### 3.3.2. Perméabilité à la vapeur d'eau

La perméabilité à la vapeur d'eau a été déterminée selon un test ATSM (1983) modifié par Gontard, Guilbert et Cuq (1992).

Ce test a été réalisé sur des films de même composition que les billes, mais la gélification a été effectuée dans des boîtes de Pétri. Quinze millilitres de solution du cœur ont tout d'abord été coulés, puis laissés sécher à 23°C pendant 24 heures. La gélification a ensuite été réalisée en déposant les films dans les solutions de gélification appropriées (soit le chlorure de calcium pour les films à base d'alginate et une solution aqueuse de sodium tripolyphosphate à 5 % pour les films à base de chitosane) pendant 30 min. Après un rinçage à l'eau distillée, les films ont été déposés pendant une heure dans leur solution respective afin de former la couche externe. Enfin les films ont été séchés à 23°C pendant 24 heures.

Les films ainsi préparés ont été scellés hermétiquement sur des cellules de perméabilité métalliques (The Thwing-Albert vapometer, Kalamazoo Chemicals, Richland, MI, USA) contenant chacune 30 g de chlorure de calcium anhydre (Laboratoire Mat, Beauport, QC), elles-mêmes placées dans une chambre à température (30°C ± 1) et humidité contrôlée (100 %).

La surface du film exposée était de 0,0023 m<sup>2</sup>. La perméabilité à la vapeur d'eau a été calculée selon la formule suivante :

$$PVE = 24 \times w \times e / a \times t \times \Delta P$$

PVE : perméabilité à la vapeur d'eau du film (g x mm x m<sup>-2</sup> x 24h<sup>-1</sup> x mmHg<sup>-1</sup>)

w : poids gagné par la cellule (g)

e : épaisseur du film

t : durée d'incubation du film (h)

a : surface exposée du film (m<sup>2</sup>)

ΔP : pression de vapeur différentielle de l'eau (ΔP : 17.821 mmHg à 30°C)

(Le calcul nécessite de connaître l'épaisseur du film. Celle-ci a été mesurée en 9 points à l'aide d'un indicateur digital Mitutoyo (Mitutoyo MFG, Tokyo, Japon)).

### ***3.3.3. Cinétique d'absorption de l'eau (gonflement)***

Un  $\text{cm}^3$  de billes sèches a été déposé dans un cylindre gradué de  $5 \text{ cm}^3$  (subdivision de  $0,2 \text{ cm}^3$ ). Le volume a été complété à  $5 \text{ cm}^3$  avec de l'eau distillée. La cinétique d'absorption de l'eau par les billes a été déterminée en mesurant le volume occupé par les billes en fonction du temps.

## **3.4. Étude de la stabilité des micronutriments encapsulés**

### ***3.4.1. Micronutriments sélectionnés***

Trois types de micronutriments ont été sélectionnés pour leur forte instabilité : la vitamine C (vitamine hydrosoluble), la provitamine A (vitamine liposoluble) et le fer ionique sous forme de citrate de fer (minéral), le fumarate de fer présent dans la boisson originale n'étant pas soluble avec le chitosane. Les micronutriments ont été ajoutés extemporanément dans la solution du cœur des billes (1,5 % (p / v) pour le fer ionique et la vitamine C et 0,5 % (p / v) pour la provitamine A) en raison de son insolubilité dans l'eau. Le pH des solutions du cœur des billes à base de chitosane a été ajusté à  $\text{pH} = 6,0$  à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N avant l'ajout des micronutriments.

### ***3.4.2. Préparation des échantillons***

Les sachets contenant 1 g de boisson en poudre (ne contenant pas de vitamine C, ni de provitamine A, ni de fer) et 100 mg de billes sèches contenant les micronutriments étudiés ont été utilisés comme échantillons dans cette expérience. Un sachet renferme donc les 3 micronutriments encapsulés séparément, avec un même type de billes. Comme dans le cas de l'étude de la stabilité des micronutriments non encapsulés, le protocole expérimental a permis l'étude de deux facteurs : l'humidité relative et la température. Les

sachets ont été stockés dans quatre conditions de stockage (23°C-56 % H. R. , 23°C-100 % H. R., 45°C-56 % H. R. et 45°C-100 % H. R.) pendant six mois. Des échantillons ont été prélevés périodiquement (jour 1, jour 15 et mois 1, 2, 3, 4, 5 et 6) afin de déterminer la concentration de chaque micronutriment.

### ***3.4.3. Méthode de solubilisation des billes***

Tous les jours d'analyse, les billes à base d'alginate (non fonctionnalisé ou fonctionnalisé) ont été dissoutes sous agitation dans une solution de phosphate (Phosphate de potassium monobasique, 0,1 M, pH 8,0). Les billes à base de chitosane (non fonctionnalisé ou fonctionnalisé) ont été dissoutes, sous agitation, dans une solution aqueuse d'acide acétique à 3 % (pH = 3,8). Les billes ont été laissées en solution, sous agitation à température ambiante, jusqu'à dissolution totale (jusqu'à 12 heures pour les billes stockées pendant 6 mois). Par la suite, l'extraction et le dosage des micronutriments ont été effectués selon les méthodes décrites précédemment.

## **3.5. Libération contrôlée des micronutriments dans le tractus gastro-intestinal**

### ***3.5.1. Préparation des échantillons***

Le fer ionique, la vitamine C et la provitamine A ont été encapsulés individuellement dans les quatre types de billes. Pour chaque micronutriment et pour chaque type de bille, un gramme de billes sèches a été remis en solution pendant 10 min dans de l'eau distillée afin de mimer la reconstitution de la boisson.

### 3.5.2. *Passage dans le tractus gastro-intestinal*

#### Passage dans l'estomac

Les billes égouttées ont ensuite été digérées pendant 30 min sous agitation constante à 37°C dans 30 mL d'une solution proche de celle retrouvée dans l'estomac dont la composition, pour un litre, est la suivante (The United States Pharmacopiae, 1990) :

- 2 g de chlorure de sodium
- 3.2 g de pepsine cristallisée et lyophilisée (activité de 2.500 à 3.500 unités par mg, Sigma, Oakville, ON)
- 7 mL d'acide chlorhydrique 100%

(Ajouter tous ces ingrédients à 900ml d'eau distillée, agiter pour dissoudre et compléter le volume à un litre avec de l'eau distillée.)

À  $t = 0$ , puis après 10, 20 et 30 min d'incubation, des prélèvements de 1 mL ont été effectués.

#### Passage dans l'intestin

Les billes ont été égouttées à nouveau puis déposées dans 30 mL d'une solution proche de celle retrouvée dans l'intestin (The United States Pharmacopiae, 1990). Cette solution a été préparée avec :

- 6,8 g de phosphate de sodium monobasique (Laboratoire Mat, Beauport, QC)
- 90 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium (0,2 N, Laboratoire Mat, Beauport, QC)
- 10,0 g de pancréatine de porc (activité au moins équivalente au spécification U.S.P., Sigma, Oakville, ON)

Après agitation, le pH de la solution a été ajusté à  $7,5 \pm 0,1$  à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (0,2 N). Le volume a finalement été complété à un litre avec de l'eau distillée.

Aux temps  $t = 0$ , puis 30 min, 60 min, 90 min et 2, 3, 4, 5 et 6 heures d'incubation, des prélèvements de 1 mL ont été effectués dans cette solution intestinale contenant les billes.

### ***Dosage des micronutriments***

Sur chaque prélèvement, un dosage de micronutriments a été réalisé selon le protocole utilisé pour l'étude de la stabilité des micronutriments, c'est-à-dire par HPLC pour les vitamines et par spectrométrie par absorption atomique pour le minéral, selon les méthodes préalablement décrites ci haut.



#### 4. ANALYSES STATISTIQUES

Le dispositif expérimental utilisé dans l'étude microbiologique consiste en un bloc complet aléatoire de (4 x 3 x 5 x 3) échantillons, soit 4 types bactériens, 3 types de boisson, 5 temps de prélèvement et 3 degrés d'inoculum. Les analyses de l'étude de stabilité des micronutriments ont été réalisées selon un bloc complet aléatoire de (10 x 11 x 2 x 2) échantillons, soit 10 micronutriments, 11 temps de prélèvement, 2 températures et 2 degrés d'humidité relative. Le dispositif expérimental utilisé dans les analyses de la force et de la déformation à la rupture consiste en un bloc de 40 échantillons soit 4 types de billes (AN-recette n°1, AF-recette n°2, CN-recette n°3 et CF-recette n°4) x 10 billes par test. Les analyses de la perméabilité à la vapeur d'eau ont été réalisées sur 12 échantillons répartis comme suit : 4 types de films (AN, AF, CN et CF) x 3 films par test. Pour l'étude de gonflement, les analyses ont été réalisées sur 60 échantillons soit 4 types de billes (alginate natif, alginate fonctionnalisé, chitosane natif et chitosane fonctionnalisé) x 15 temps de mesure. Les analyses concernant la stabilité des micronutriments encapsulées ont été réalisées selon un bloc complet aléatoire de (3 x 4 x 8 x 2 x 2) échantillons, soit 3 micronutriments, 4 types de billes, 8 temps de prélèvement, 2 températures et 2 degrés d'humidité relative. Finalement, les analyses de la libération contrôlée ont été réalisées selon un bloc complet aléatoire de (3 x 4 x 11) échantillons, soit 3 micronutriments, 4 types de billes et 11 temps de prélèvement.

Toutes ces expériences ont été réalisées en duplicata. Les résultats ont été recueillis sur Microsoft Excel (Microsoft Office, version XP, Microsoft Corporation, USA). Les analyses statistiques ont été effectuées sur les données brutes à l'aide du logiciel SPSS (Version 6.1, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Une analyse multifactorielle de la variance (ANOVA) a été effectuée pour déterminer la signification ou non de chacun des paramètres. Les moyennes ont été comparées avec le test de la plus petite différence significative (LSD, "Least Significant Difference") lorsqu'il y avait plus de deux groupes, ou par un test *t* de (Student *t* test) lorsqu'il y avait deux groupes. La différence entre les moyennes a été considérée significative lorsque  $p \leq 0,05$ .

## **RÉSULTATS**

# 1. ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DE LA BOISSON RECONSTITUÉE

## 1.1. Cinétique d'inhibition de la croissance bactérienne

### 1.1.1. *Escherichia coli*

La cinétique d'inhibition d'*Escherichia coli*, et plus particulièrement l'effet du type de boisson sur sa croissance sont présentés à la figure 4 et au tableau IV qui s'y rattache.

Les résultats montrent que quelque soit le degré de contamination initiale de l'eau servant à la reconstitution de la boisson, la population bactérienne présente dans la boisson sans acide (témoin) est stable pendant la période d'analyse, soit 180 min.

En présence des acides organiques comme en présence de l'acide minéral, de  $10^3$  bactéries / mL, la population bactérienne décroît rapidement pour atteindre un niveau non détectable après 180 min de contact. Aux temps intermédiaires (5, 10 et 60 min), le contenu en micro-organismes mesuré en présence des acides organiques est supérieure ( $p \leq 0,05$ ) à celui mesurée en présence de l'acide minéral. Ainsi, à  $t = 60$  min, la population bactérienne présente dans la boisson contenant l'acide minéral était de  $1,54 \pm 0,13$  log de UFC comparativement à  $0,68 \pm 0,09$  log de UFC dans la boisson contenant les acides organiques. Les résultats montrent qu'en présence de  $10^3$  bactéries / mL, l'activité antibactérienne en présence des acides organiques est plus importante et plus rapide qu'en présence de l'acide minéral.

À un degré de contamination plus élevé ( $10^5$  bactéries / mL), des diminutions de la population bactérienne ont été observées en présence de l'acide minéral et plus remarquablement en présence des acides organiques, et ce après 5 min de contact seulement. Au terme de l'expérience, la population bactérienne était de  $2,99 \pm 0,10$  log de UFC et de  $2,54 \pm 0,13$  log de UFC en présence de l'acide minéral et des acides

organiques respectivement (représentant des diminutions significatives ( $p \leq 0,05$ ) de 40,09 % et 50,00 %).

Pour ce degré de contamination initiale ( $10^5$  bactéries / mL), les acides organiques et minéral affectent significativement ( $p \leq 0,05$ ) la croissance bactérienne, mais seulement après 180 min de contact.

Pour un inoculum initial  $10^7$  bactéries / mL, après 180 min de contact, des diminutions de 20,86 % de la population bactérienne (soit  $5,54 \pm 0,60$  log de UFC) en présence des acides organiques et de 17,71 % en présence de l'acide minéral (soit  $5,76 \pm 0,41$  log de UFC) ont été enregistrées. Pour ce degré de contamination et au terme de l'expérience, les différences observées entre l'activité inhibitrice des deux types d'acide ne sont pas significative ( $p > 0,05$ ). Les valeurs brutes de l'analyse de la variance sont présentées dans l'appendice D

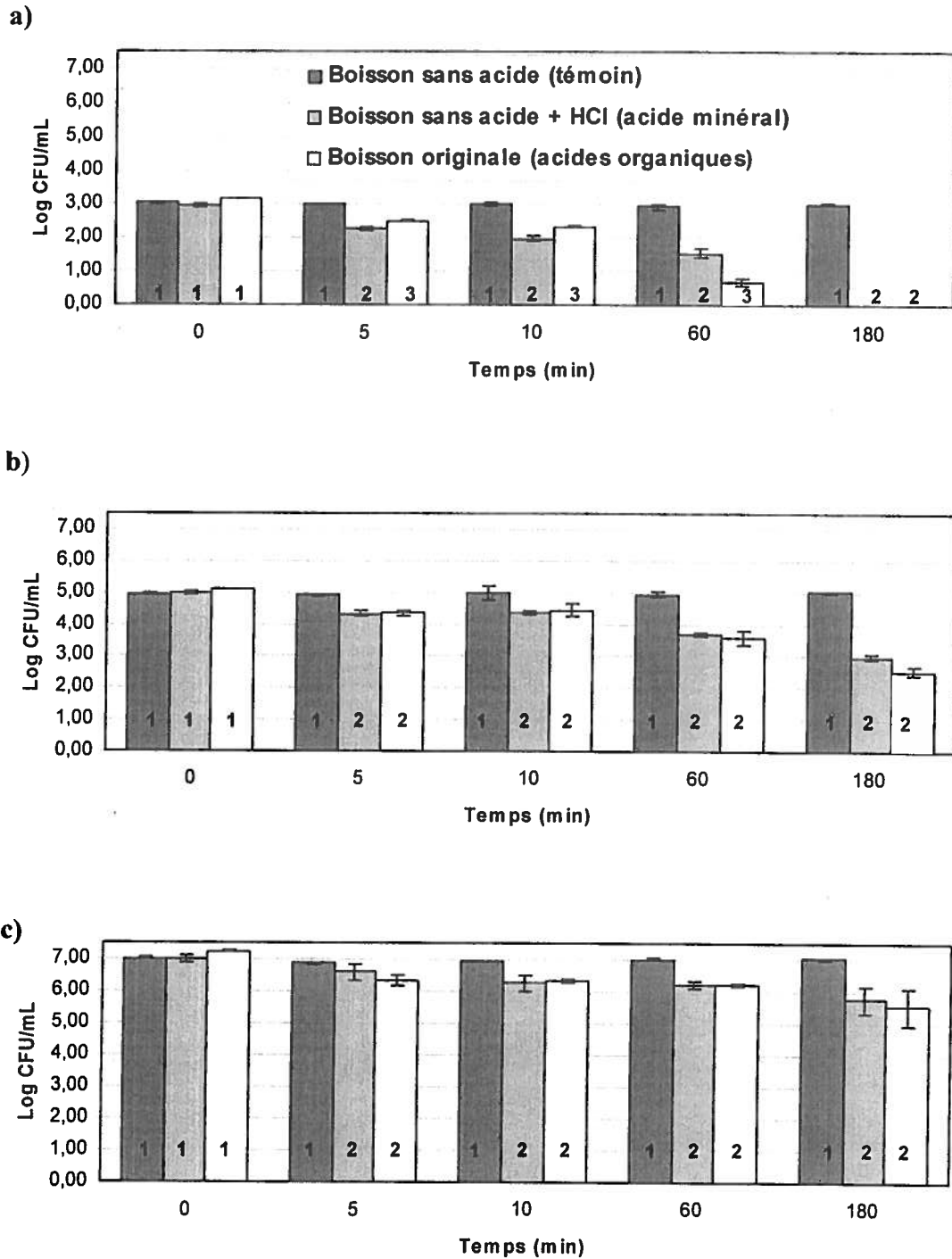


Figure 4 – Cinétique d'inhibition de la croissance d'*Escherichia coli* selon le degré de contamination initiale : a)  $10^3$  bactéries / mL, b)  $10^5$  bactéries / mL et c)  $10^7$  bactéries / mL.

1, 2, 3 Pour un degré de contamination initiale identique et pour un temps donné, des chiffres différents indiquent une différence significative entre les types de boisson ( $p \leq 0,05$ )

Tableau IV - Dénombrements bactériens (en log de UFC / mL) de *Escherichia coli*

Type de boisson	Temps (min)	Degré de contamination initiale		
		10 <sup>3</sup> bact. /mL	10 <sup>5</sup> bact. /mL	10 <sup>7</sup> bact. /mL
Sans acide (témoin)	0	3,02 ± 0,03 <sup>a</sup>	4,95 ± 0,03 <sup>a</sup>	7,01 ± 0,03 <sup>a</sup>
	5	2,99 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,90 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,87 ± 0,02 <sup>a</sup>
	10	2,97 ± 0,05 <sup>a</sup>	5,00 ± 0,23 <sup>a</sup>	6,95 ± 0,02 <sup>a</sup>
	60	2,93 ± 0,08 <sup>a</sup>	4,95 ± 0,08 <sup>a</sup>	7,03 ± 0,01 <sup>a</sup>
	180	3,02 ± 0,04 <sup>a</sup>	5,01 ± 0,05 <sup>a</sup>	7,04 ± 0,02 <sup>a</sup>
Acide minéral (HCl)	0	2,92 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,99 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,99 ± 0,11 <sup>a</sup>
	5	2,25 ± 0,03 <sup>b</sup>	4,33 ± 0,07 <sup>b</sup>	6,59 ± 0,23 <sup>b</sup>
	10	1,96 ± 0,08 <sup>c</sup>	4,35 ± 0,07 <sup>b</sup>	6,25 ± 0,27 <sup>c</sup>
	60	1,54 ± 0,13 <sup>d</sup>	3,69 ± 0,05 <sup>c</sup>	6,22 ± 0,13 <sup>c</sup>
	180	N. D. <sup>e</sup>	2,99 ± 0,10 <sup>d</sup>	5,76 ± 0,41 <sup>d</sup>
Acides organiques (originale)	0	3,15 ± 0,00 <sup>a</sup>	5,08 ± 0,00 <sup>a</sup>	7,25 ± 0,02 <sup>a</sup>
	5	2,49 ± 0,02 <sup>b</sup>	4,35 ± 0,09 <sup>b</sup>	6,34 ± 0,17 <sup>b</sup>
	10	2,33 ± 0,03 <sup>b</sup>	4,43 ± 0,19 <sup>b</sup>	6,33 ± 0,06 <sup>b</sup>
	60	0,68 ± 0,09 <sup>c</sup>	3,59 ± 0,22 <sup>c</sup>	6,22 ± 0,06 <sup>c</sup>
	180	N. D. <sup>d</sup>	2,54 ± 0,13 <sup>d</sup>	5,54 ± 0,60 <sup>d</sup>

a, b, c, d et e : pour un même type de boisson et pour un degré de contamination identique, les lettres différentes indiquent une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre les temps. (le temps n'a pas d'effet significatif sur les dénombrements effectués dans la boisson sans acide).

N. D. : inférieure au niveau de détection (la valeur "0" a été attribuée dans l'analyse statistique)

### 1.1.2. *Salmonella* Typhi

La figure 5 et le tableau V correspondant présentent la cinétique d'inhibition de *Salmonella* Typhi selon sa concentration initiale, en présence de différents acides.

Tel qu'observé pour *Escherichia coli*, la population bactérienne présente dans la boisson sans acide (témoin) est stable quelque soit le degré de contamination initiale de l'eau.

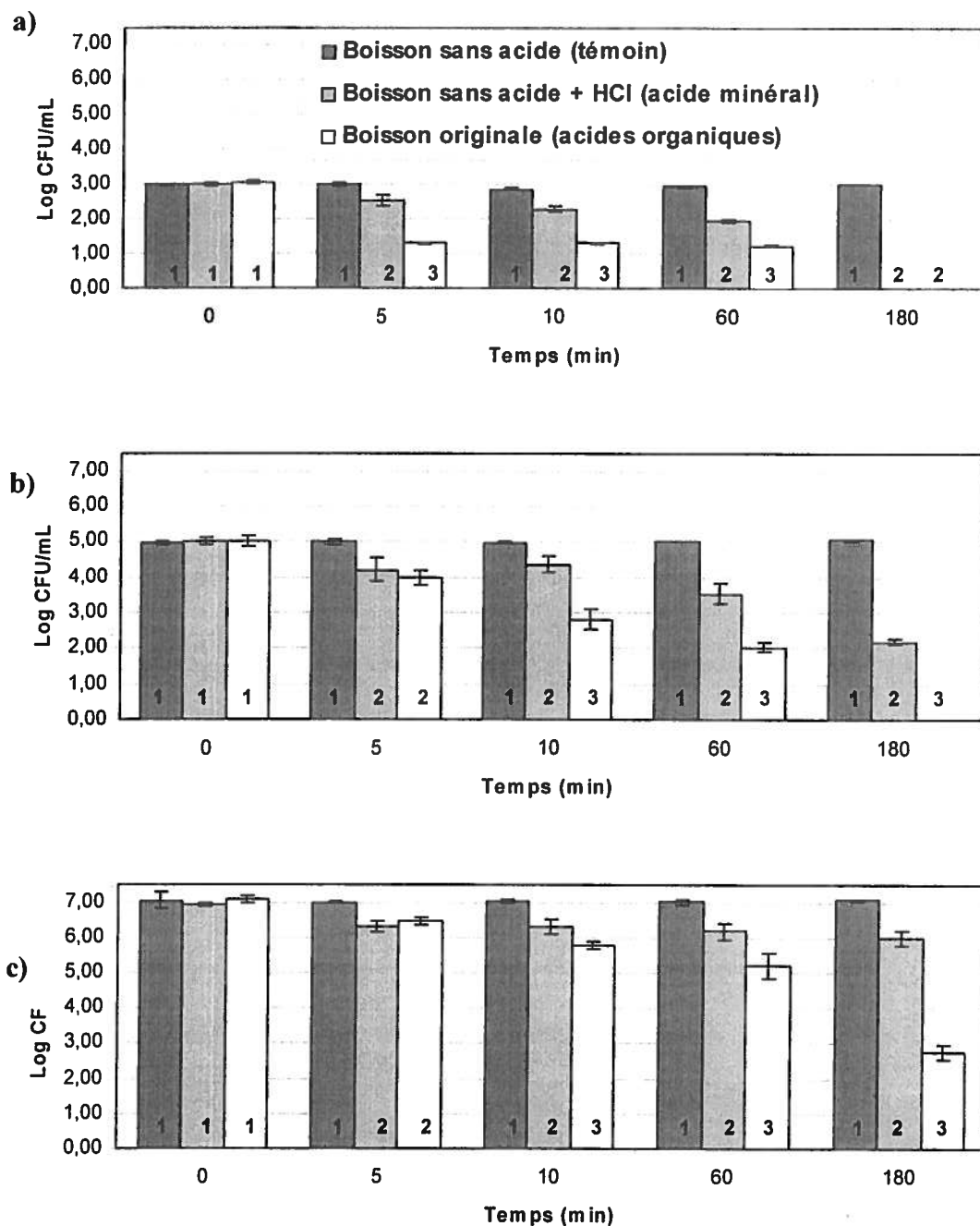
Pour le plus faible degré de concentration initiale ( $10^3$  bactéries / mL), une absence totale de la population bactérienne est observée après 180 min de contact entre les bactéries et les acides (en présence d'acide minéral ou des acides organiques). Le pouvoir antibactérien de la boisson contenant les acides organiques est plus important et plus rapide que celui de la boisson contenant l'acide minéral. La nature des acides affecte de manière significative ( $p \leq 0,05$ ) affecte de manière significative la croissance bactérienne aux temps intermédiaires (5, 10 et 60 min).

Lorsque le degré de contamination initiale de l'eau de reconstitution est plus élevé ( $10^5$  bactéries / mL), la disparition de *Salmonella* Typhi en présence des acides organiques (boisson originale) est totale après 180 min de contact. L'activité antibactérienne de la boisson contenant l'acide minéral est moindre : une population bactérienne de  $2,20 \pm 0,07$  log de UFC est dénombrée au terme de l'expérience. La nature des acides ajoutés (minéral ou organique) affecte de manière significative ( $p \leq 0,05$ ) la croissance de *Salmonella* Typhi après seulement 10 min de contact entre les bactéries et la boisson.

Pour un inoculum de départ de  $10^7$  bactéries / mL, l'extinction complète de la population bactérienne n'a pas lieu, même après 180 min de contact. Une nette réduction de la population bactérienne est cependant observée en présence des acides organiques à la fin de l'expérience (de  $7,07 \pm 0,12$  à  $2,74 \pm 0,21$  log de UFC, soit une diminution de 61,25 %). Par comparaison, la population bactérienne décroît seulement de 13,15 % en

présence de l'acide minéral pour la même période de temps (les contenus bactériens étant respectivement de  $6,92 \pm 0,06$  log de UFC à  $t = 0$  et de  $6,01 \pm 0,21$  log de UFC à  $t = 180$  min). La nature des acides ajoutés affecte ( $p \leq 0,05$ ) la croissance bactérienne dès 10 min de contact entre les bactéries et la boisson. Les concentrations bactériennes déterminées à ce temps de contact sont alors de  $5,78 \pm 0,12$  log de UFC et  $6,31 \pm 0,11$  log de UFC dans la boisson contenant respectivement les acides organiques et l'acide minéral.





**Figure 5 – Cinétique d'inhibition de la croissance de *Salmonelle* Typhi selon le degré de contamination initiale : a) 10<sup>3</sup> bactéries / mL, b) 10<sup>5</sup> bactéries / mL et c) 10<sup>7</sup> bactéries / mL**

1, 2, 3 Pour un degré de contamination initiale identique et pour un temps donné, des chiffres différents indiquent une différence significative entre les types de boisson ( $p \leq 0,05$ )

Tableau V - Dénombrements bactériens (en log de UFC / mL) de *Salmonella* Typhi

Type de boisson	Temps (min.)	Degré de contamination initiale		
		10 <sup>3</sup> bact. /mL	10 <sup>5</sup> bact. /mL	10 <sup>7</sup> bact. /mL
Sans acide (témoin)	0	3,00 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,97 ± 0,05 <sup>a</sup>	7,05 ± 0,24 <sup>a</sup>
	5	3,02 ± 0,06 <sup>a</sup>	5,00 ± 0,09 <sup>a</sup>	7,00 ± 0,02 <sup>a</sup>
	10	2,88 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,99 ± 0,01 <sup>a</sup>	7,02 ± 0,05 <sup>a</sup>
	60	2,95 ± 0,02 <sup>a</sup>	5,02 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,01 ± 0,10 <sup>a</sup>
	180	3,01 ± 0,00 <sup>a</sup>	5,06 ± 0,03 <sup>a</sup>	7,07 ± 0,02 <sup>a</sup>
Acide minéral (HCl)	0	3,00 ± 0,05 <sup>a</sup>	5,02 ± 0,12 <sup>a</sup>	6,92 ± 0,06 <sup>a</sup>
	5	2,51 ± 0,16 <sup>b</sup>	4,21 ± 0,34 <sup>b</sup>	6,33 ± 0,16 <sup>b</sup>
	10	2,28 ± 0,09 <sup>c</sup>	4,35 ± 0,23 <sup>b</sup>	6,31 ± 0,11 <sup>b</sup>
	60	1,96 ± 0,06 <sup>d</sup>	3,54 ± 0,28 <sup>c</sup>	6,18 ± 0,02 <sup>c</sup>
	180	N. D. <sup>e</sup>	2,20 ± 0,07 <sup>d</sup>	6,01 ± 0,21 <sup>d</sup>
Acides organiques (originale)	0	3,04 ± 0,06 <sup>a</sup>	5,02 ± 0,16 <sup>a</sup>	7,07 ± 0,12 <sup>a</sup>
	5	1,30 ± 0,04 <sup>b</sup>	4,00 ± 0,20 <sup>b</sup>	6,45 ± 0,11 <sup>b</sup>
	10	1,30 ± 0,02 <sup>b</sup>	2,82 ± 0,30 <sup>c</sup>	5,78 ± 0,12 <sup>c</sup>
	60	1,24 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,04 ± 0,11 <sup>d</sup>	5,22 ± 0,36 <sup>d</sup>
	180	N. D. <sup>e</sup>	N. D. <sup>e</sup>	2,74 ± 0,21 <sup>e</sup>

a, b, c, d et e : pour un même type de boisson et pour un degré de contamination identique, les lettres différentes indiquent une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre les temps. (le temps n'a pas d'effet significatif sur les dénombrements effectués dans la boisson sans acide).

N. D. : inférieure au niveau de détection (la valeur "0" a été attribuée dans l'analyse statistique)

### 1.1.3. *Serratia liquefaciens*

La cinétique d'inhibition de la croissance de *Serratia liquefaciens* est présentée à la figure 6 et au tableau VI.

La population bactérienne présente dans la boisson sans acide (témoin) est stable ( $p > 0,05$ ) de  $t = 0$  à  $t = 180$  min, pour les trois degrés de contamination initiale.

La diminution de la concentration de *Serratia liquefaciens* dans la boisson contenant les acides organiques sur est drastique lorsque la contamination initiale de l'eau est de  $10^3$  bactéries / mL. Au cours des cinq premières min de contact, la population bactérienne décroît rapidement pour atteindre un niveau non détectable (inhibition totale) en présence des acides organiques. À ce même temps de contact, une population bactérienne de  $2,47 \pm 0,12$  log de UFC a été enregistrée en présence de l'acide minéral. L'absence totale de la population bactérienne en présence de l'acide minéral est cependant observée, mais seulement après 180 min de contact entre *Serratia liquefaciens* et la boisson reconstituée. L'activité inhibitrice des acides organiques sur la population bactérienne est significativement ( $p \leq 0,05$ ) supérieure à celle de l'acide minérale à partir de 5 min d'expérimentation.

Pour un degré de contamination initiale de  $10^5$  bactéries / mL, une destruction complète de la population de *Serratia liquefaciens* en présence des acides organiques est enregistrée au terme de l'expérience. Pour cette même période, mais en présence d'acide minéral, une concentration finale de log de  $2,26 \pm 0,04$  UFC a été observée. La nature de l'acide ajouté affecte ( $p \leq 0,05$ ) la croissance bactérienne après 10 min de contact. Les concentrations bactériennes étaient alors de  $2,82 \pm 0,07$  log de UFC dans la boisson contenant les acides organiques et  $3,77 \pm 0,02$  log de UFC pour celle contenant l'acide minéral.

Au niveau de contamination initiale maximum ( $10^7$  bactéries / mL), une disparition totale de la population de *Serratia liquefaciens* a également été remarquée en présence d'acides organiques, et ceci après seulement 60 min de contact. Pour cette même période, une diminution de 40,20 % de la population bactérienne en contact avec l'acide minéral a été notée. Au terme de l'expérience, la population bactérienne présente dans la boisson contenant l'acide minéral est de  $3,06 \pm 0,05$  log de UFC (vs.  $7,04 \pm 0,03$  à  $t = 0$ ). L'activité antibactérienne des acides organiques sur *Serratia liquefaciens* est significativement ( $p \leq 0,05$ ) supérieure à celle de l'acide minéral dès les 5 premières min de l'expérience.

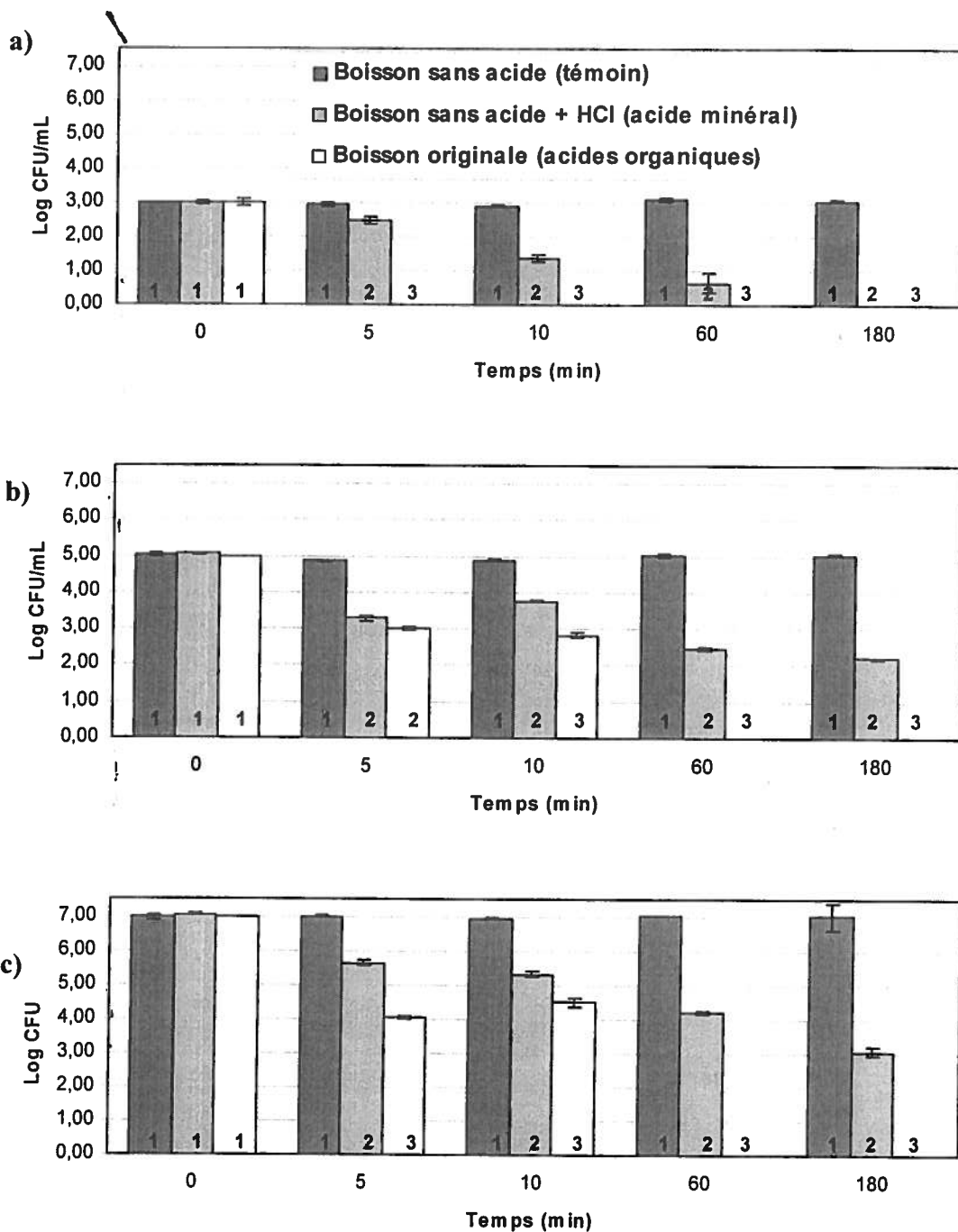


Figure 6 – Cinétique d'inhibition de la croissance de *Serratia liquefaciens* selon le degré de contamination initiale : a) 10<sup>3</sup> bactéries / mL, b) 10<sup>5</sup> bactéries / mL et c) 10<sup>7</sup> bactéries / mL

1, 2, 3 Pour un degré de contamination initiale identique et pour un temps donné, des chiffres différents indiquent une différence significative entre les types de boisson ( $p \leq 0,05$ )

Tableau VI - Dénombrements bactériens (en log de UFC / mL) de *Serratia liquefaciens*

Type de boisson	Temps (min.)	Degré de contamination initiale		
		10 <sup>3</sup> bact. /mL	10 <sup>5</sup> bact. /mL	10 <sup>7</sup> bact. /mL
Sans acide (témoin)	0	3,00 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,02 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,96 ± 0,07 <sup>a</sup>
	5	2,95 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,87 ± 0,01 <sup>a</sup>	7,00 ± 0,02 <sup>a</sup>
	10	2,90 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,91 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,95 ± 0,01 <sup>a</sup>
	60	3,08 ± 0,05 <sup>a</sup>	5,01 ± 0,05 <sup>a</sup>	7,02 ± 0,01 <sup>a</sup>
	180	3,06 ± 0,02 <sup>a</sup>	5,06 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,02 ± 0,40 <sup>a</sup>
Acide minéral (HCl)	0	2,99 ± 0,06 <sup>a</sup>	5,06 ± 0,03 <sup>a</sup>	7,04 ± 0,03 <sup>a</sup>
	5	2,47 ± 0,12 <sup>b</sup>	3,30 ± 0,07 <sup>b</sup>	5,63 ± 0,07 <sup>b</sup>
	10	1,36 ± 0,10 <sup>c</sup>	3,77 ± 0,02 <sup>c</sup>	5,31 ± 0,07 <sup>c</sup>
	60	0,63 ± 0,29 <sup>d</sup>	2,48 ± 0,06 <sup>d</sup>	4,21 ± 0,50 <sup>d</sup>
	180	N. D. <sup>e</sup>	2,20 ± 0,04 <sup>d</sup>	3,06 ± 0,05 <sup>e</sup>
Acides organiques (originale)	0	3,00 ± 0,09 <sup>a</sup>	5,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	7,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
	5	N. D. <sup>b</sup>	3,01 ± 0,07 <sup>b</sup>	4,04 ± 0,07 <sup>b</sup>
	10	N. D. <sup>b</sup>	2,82 ± 0,07 <sup>b</sup>	4,50 ± 0,12 <sup>b</sup>
	60	N. D. <sup>b</sup>	N. D. <sup>c</sup>	N. D. <sup>c</sup>
	180	N. D. <sup>b</sup>	N. D. <sup>c</sup>	N. D. <sup>c</sup>

a, b, c, d et e : pour un même type de boisson et pour un degré de contamination identique, les lettres différentes indiquent une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre les temps. (le temps n'a pas d'effet significatif sur les dénombrements effectués dans la boisson sans acide).

N. D. : inférieure au niveau de détection (la valeur "0" a été attribuée dans l'analyse statistique)

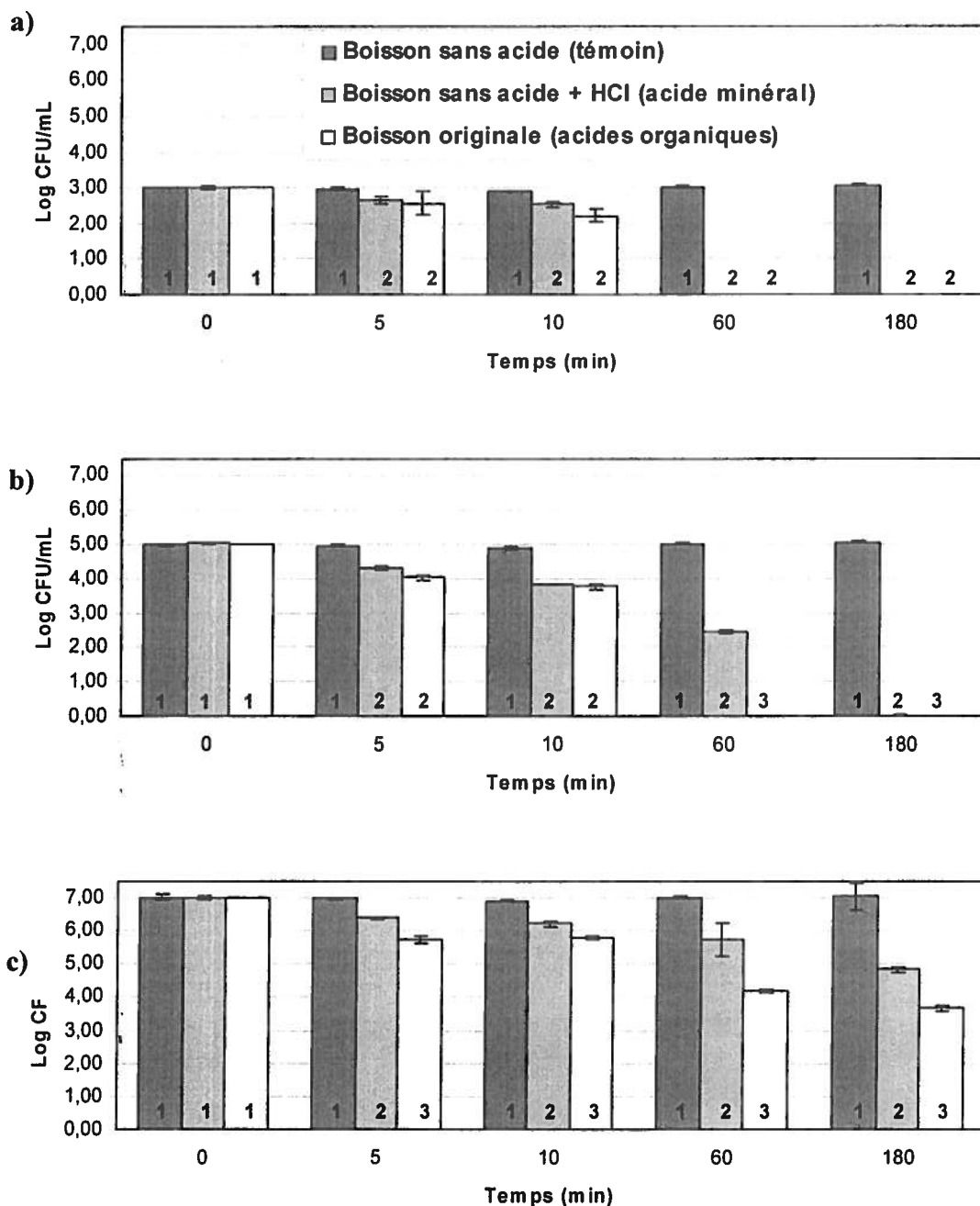
#### **1.1.4. Mélange des 3 souches**

Les effets de l'acide minéral et des acides organiques sur la croissance du mélange des trois souches bactériennes sont présentés à la figure 7 et au tableau VII correspondant. Tel qu'observé pour chaque souche individuellement, la population bactérienne de la boisson sans acide (témoin) est stable au cours de l'expérience, quelque soit le degré de contamination initiale.

À un niveau de contamination initial de  $10^3$  bactéries / mL, la croissance bactérienne est totalement inhibée après 60 min d'expérience en présence d'acides organiques et minéral. La nature des acides contenues dans la boisson affecte significativement ( $p \leq 0,05$ ) la croissance bactérienne à partir de 10 min de contact entre les acides et les bactéries. En effet, à  $t = 10$  min, les dénombrements bactériens sont de  $2,53 \pm 0,03$  log de UFC et de  $2,21 \pm 0,19$  log de UFC respectivement dans la boisson contenant l'acide minéral et celle contenant les acides organiques.

Lorsque le degré de contamination initial est de  $10^5$  bactéries / mL, l'activité antibactérienne de la boisson contenant les acides organiques est supérieure ( $p \leq 0,05$ ) à celle contenant l'acide minéral à partir de 60 min de contact. À 60 min de contact, la population bactérienne en présence des acides organiques atteint un niveau non détectable alors qu'elle est de  $2,43 \pm 0,08$  log de UFC en présence de l'acide minéral. Ce qui démontre encore la rapidité de l'action de la boisson contenant les acides organiques.

Enfin, pour un degré de contamination initiale de  $10^7$  bactéries / mL, seule une diminution partielle de la population est observée après 180 min, quelque soit la nature de l'acide présent dans la boisson. Des dénombrements bactériens en présence des acides organiques de  $3,67 \pm 0,08$  log de UFC et de  $4,83 \pm 0,09$  log de UFC en présence de l'acide minéral ont été enregistré après 180 min de contact. Malgré l'efficacité partielle de la boisson contenant les acides organiques, elle reste significativement ( $p \leq 0,05$ ) supérieure à l'efficacité de la boisson contenant l'acide minéral dès les cinq premières min de l'expérience. Les concentrations bactériennes enregistrées à cette période sont alors de  $5,74 \pm 0,09$  log de UFC en présence des acides citrique et ascorbique et de  $6,37 \pm 0,18$  log de UFC en présence de l'acide chlorhydrique.



**Figure 7 – Cinétique d'inhibition de la croissance du mélange des 3 souches selon le degré de contamination initiale : a)  $10^3$  bactéries / mL, b)  $10^5$  bactéries / mL et c)  $10^7$  bactéries / mL**

1, 2, 3 Pour un degré de contamination initiale identique et pour un temps donné, des chiffres différents indiquent une différence significative entre les types de boisson ( $p \leq 0,05$ )



Tableau VII - Dénombrements bactériens (en log de UFC) du mélange des 3 souches

Type de boisson	Temps (min.)	Degré de contamination initiale		
		10 <sup>3</sup> bact. /mL	10 <sup>5</sup> bact. /mL	10 <sup>7</sup> bact. /mL
Sans acide (témoin)	0	3,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,98 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,02 ± 0,02 <sup>a</sup>
	5	2,97 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,97 ± 0,03 <sup>a</sup>	6,99 ± 0,02 <sup>a</sup>
	10	2,89 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,90 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,92 ± 0,02 <sup>a</sup>
	60	3,03 ± 0,02 <sup>a</sup>	5,02 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,02 ± 0,01 <sup>a</sup>
	180	3,08 ± 0,02 <sup>a</sup>	5,07 ± 0,03 <sup>a</sup>	7,05 ± 0,02 <sup>a</sup>
Acide minéral (HCl)	0	3,02 ± 0,06 <sup>a</sup>	5,04 ± 0,06 <sup>a</sup>	7,00 ± 0,07 <sup>a</sup>
	5	2,66 ± 0,07 <sup>b</sup>	4,31 ± 0,04 <sup>b</sup>	6,37 ± 0,18 <sup>b</sup>
	10	2,53 ± 0,03 <sup>c</sup>	3,83 ± 0,07 <sup>c</sup>	6,21 ± 0,07 <sup>b</sup>
	60	N. D. <sup>d</sup>	2,43 ± 0,08 <sup>d</sup>	5,74 ± 0,49 <sup>c</sup>
	180	N. D. <sup>d</sup>	N. D. <sup>c</sup>	4,83 ± 0,09 <sup>d</sup>
Acides organiques (originale)	0	3,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	5,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	7,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
	5	2,56 ± 0,14 <sup>b</sup>	4,02 ± 0,09 <sup>b</sup>	5,74 ± 0,09 <sup>b</sup>
	10	2,21 ± 0,19 <sup>c</sup>	3,76 ± 0,13 <sup>c</sup>	5,79 ± 0,05 <sup>b</sup>
	60	N. D. <sup>d</sup>	N. D. <sup>d</sup>	4,20 ± 0,04 <sup>c</sup>
	180	N. D. <sup>d</sup>	N. D. <sup>d</sup>	3,67 ± 0,08 <sup>d</sup>

a, b, c, d et e : pour un même type de boisson et pour un degré de contamination identique, les lettres différentes indiquent une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre les temps. (le temps n'a pas d'effet significatif sur les dénombrements effectués dans la boisson sans acide).

N. D. : inférieure au niveau de détection (la valeur "0" a été attribuée dans l'analyse statistique)

## 1.2.Évolution du pH et taux de dissociation des acides organiques

### 1.2.1. *Escherichia coli*

Les variations du pH et de la concentration en acide organique sous forme non dissocié se sont révélées identiques, quelque soit le degré de contamination initial. La figure 8 et le tableau VIII représentent une moyenne des valeurs de pH et de la concentration des acides organiques non dissociés des trois degrés de contamination ( $10^3$ ,  $10^5$  et  $10^7$  bactéries / mL).

Le pH de la boisson sans acide (boisson témoin) est stable au cours de l'expérience. Le pH des boissons contenant l'acide minéral et les acides organiques est également stable durant l'expérience. En 180 min, ils évoluent de  $3,21 \pm 0,01$  à  $3,49 \pm 0,10$  en présence d'acide minéral et de  $3,19 \pm 0,17$  à  $3,43 \pm 0,05$  en présence d'acides organiques. La nature de l'acide contenu dans la boisson ne modifie pas ( $p > 0,05$ ) l'évolution du pH de la boisson. Or, lors du dénombrement bactérien, une inhibition plus importante a été observée en présence d'acides organiques vs. acide minéral. Le pH acide ne semble donc pas être le seul acteur de l'activité antibactérienne de la boisson.

Pour expliquer les différences d'activité antibactérienne observées entre les acides organiques et l'acide minéral, les concentrations de la forme non dissociés des deux acides organiques présents dans la boisson originale ont été déterminées. Selon la formule utilisée (voir page 36), la concentration en acide organique non dissocié diminue lorsque le pH augmente. Bien qu'elle diminue au cours de l'expérience, la concentration en acide ascorbique non dissocié reste importante (de 2,95 g / L pour  $t = 0$  à 2,12 g /L pour  $t = 180$  min). La concentration en acide citrique non dissocié est quasi stable pendant les 180 min de l'expérience : une diminution de 0,33 g / L à 0,31 g / L a été enregistrée.

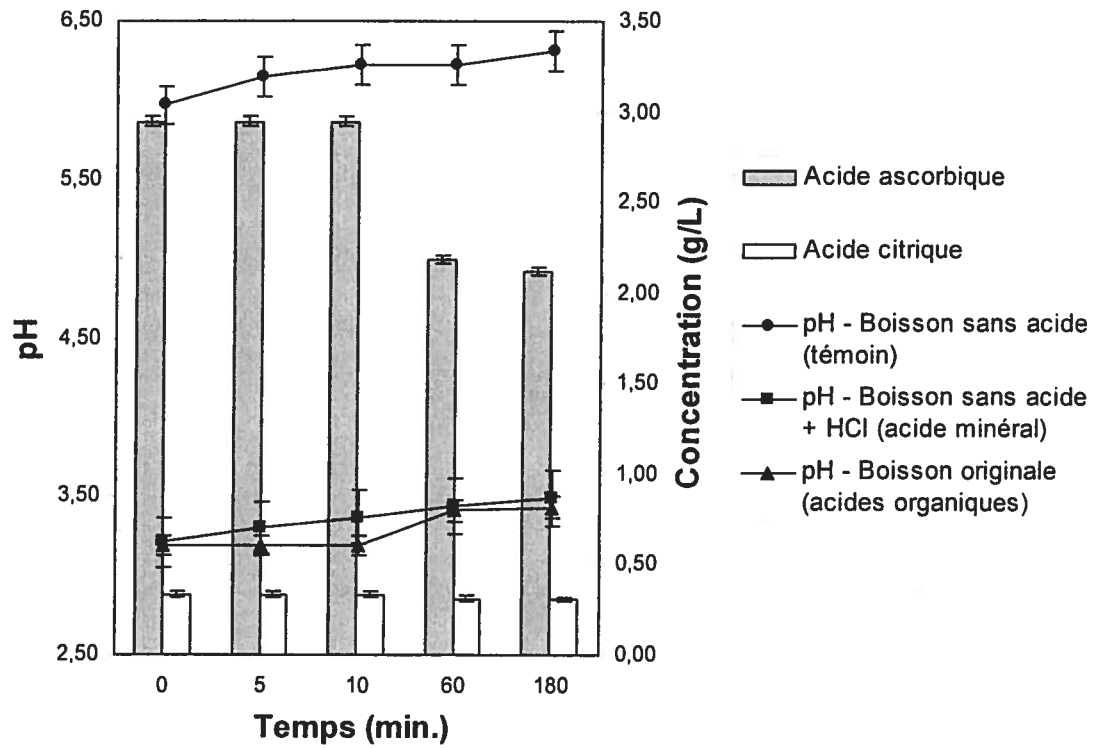


Figure 8 – Évolution du pH et de la concentration en acides organiques sous forme non dissociée pour *Escherichia coli* en fonction du temps

**Tableau VIII – pH et concentrations de la forme non dissociée des acides organiques (g / L) pour *Escherichia coli***

	Temps (min.)	pH (mesuré)	Concentration en acide citrique non dissocié (calculée) (g / L)	Concentration en acide ascorbique non dissocié (calculée) (g / L)
<b>Sans acide</b>	0	5,97 ± 0,23 <sup>a</sup>	s/o	s/o
	5	6,15 ± 0,17 <sup>a</sup>	s/o	s/o
	10	6,22 ± 0,17 <sup>a</sup>	s/o	s/o
	60	6,22 ± 0,18 <sup>a</sup>	s/o	s/o
	180	6,31 ± 0,18 <sup>a</sup>	s/o	s/o
<b>Acide miné- ral</b>	0	3,21 ± 0,01 <sup>b</sup>	s/o	s/o
	5	3,30 ± 0,06 <sup>b</sup>	s/o	s/o
	10	3,37 ± 0,09 <sup>b</sup>	s/o	s/o
	60	3,44 ± 0,11 <sup>b</sup>	s/o	s/o
	180	3,49 ± 0,10 <sup>b</sup>	s/o	s/o
<b>Acides orga- niques</b>	0	3,19 ± 0,17 <sup>b</sup>	0,33 ± 0.007 <sup>1</sup>	2,95 ± 0.32 <sup>1</sup>
	5	3,19 ± 0,17 <sup>b</sup>	0,33 ± 0.002 <sup>1</sup>	2,95 ± 0.16 <sup>1</sup>
	10	3,19 ± 0,19 <sup>b</sup>	0,33 ± 0.002 <sup>1</sup>	2,95 ± 0.0091
	60	3,41 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,31 ± 0.010 <sup>1</sup>	2,18 ± 0.017 <sup>2</sup>
	180	3,43 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,31 ± 0.001 <sup>1</sup>	2,12 ± 0.021 <sup>2</sup>

<sup>a, b</sup> Pour un temps donné, les lettres différentes indiquent une différence significative entre les types de boisson ( $p \leq 0,05$ )

<sup>1, 2</sup> L'analyse statistique a été faite dans le temps. Les temps 0, 5, 10, 60 et 180 min ont été comparé ensemble pour chaque type de boisson. Les lettres différentes indiquent une différence significative entre les types de boisson ( $p \leq 0,05$ )

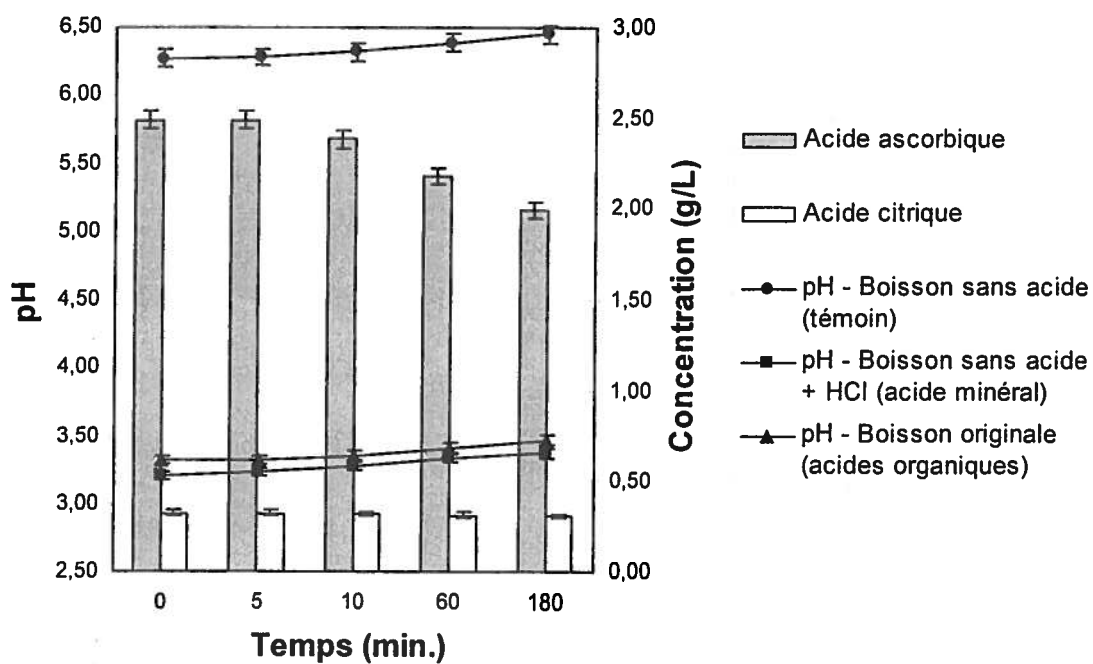
s/o : sans objet

### 1.2.2. *Salmonella Typhi*

Les moyennes des pH et des concentrations en acides organiques non dissociés enregistrés lors de l'expérience sont présentées à la figure 9 et au tableau IX.

En absence d'acide (boisson témoin), le pH est stable pendant 180 min. L'augmentation des valeurs du pH (de  $6,27 \pm 0,03$  à  $6,45 \pm 0,03$ ) observée n'est pas significative ( $p > 0,05$ ). Le pH des boissons contenant des acides croît également de manière non significative ( $p > 0,05$ ) au cours du temps. De  $3,20 \pm 0,02$ , le pH de la boisson contenant l'acide inéral augmente à  $3,37 \pm 0,01$  en 180 min. En présence d'acide organique, le pH de la boisson varie de  $3,32 \pm 0,01$  à  $3,47 \pm 0,06$  en 180 min. De plus, tel qu'observé lors de l'expérience avec *Escherichia coli*, les différences enregistrées entre les valeurs de pH en présence d'acide minéral et des acides organiques ne sont pas significatives ( $p > 0,05$ ).

La concentration en acide ascorbique non dissocié diminue légèrement de  $2,49 \text{ g / L}$  à  $1,99 \text{ g / L}$  en 180 min alors que la concentration acide citrique non dissocié passe de  $0,32 \text{ g / L}$  pour  $t = 0$  à  $0,30 \text{ g / L}$  pour la même période.



**Figure 9 – Évolution du pH et de la concentration en acides organiques sous forme non dissociée pour *Salmonella* Typhi en fonction du temps**

**Tableau IX - pH et concentrations de la forme non dissociée des acides organiques (g / L) pour *Salmonella Typhi***

	Temps (min.)	pH (mesuré)	Concentration en acide citrique non dissocié (calculée) (g / L)	Concentration en acide ascorbique non dissocié (calculée) (g / L)
<b>Sans acide</b>	0	6,27 ± 0,03 <sup>a</sup>	s/o	s/o
	5	6,28 ± 0,02 <sup>a</sup>	s/o	s/o
	10	6,32 ± 0,01 <sup>a</sup>	s/o	s/o
	60	6,39 ± 0,04 <sup>a</sup>	s/o	s/o
	180	6,45 ± 0,03 <sup>a</sup>	s/o	s/o
<b>Acide miné- ral</b>	0	3,20 ± 0,02 <sup>b</sup>	s/o	s/o
	5	3,23 ± 0,04 <sup>b</sup>	s/o	s/o
	10	3,27 ± 0,04 <sup>b</sup>	s/o	s/o
	60	3,33 ± 0,03 <sup>b</sup>	s/o	s/o
	180	3,37 ± 0,01 <sup>b</sup>	s/o	s/o
<b>Acides orga- niques</b>	0	3,32 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,32 ± 0.005 <sup>1</sup>	2,49 ± 0.25 <sup>1</sup>
	5	3,32 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,32 ± 0.003 <sup>1</sup>	2,49 ± 0.19 <sup>1</sup>
	10	3,35 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,32 ± 0.007 <sup>1</sup>	2,38 ± 0.12 <sup>1</sup>
	60	3,41 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,31 ± 0.003 <sup>1</sup>	2,18 ± 0.23 <sup>1</sup>
	180	3,47 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,30 ± 0.003 <sup>1</sup>	1,99 ± 0.26 <sup>1</sup>

<sup>a, b</sup> Pour un temps donné, les lettres différentes indiquent une différence significative entre les types de boisson ( $p \leq 0,05$ )

<sup>1, 2</sup> L'analyse statistique a été faite dans le temps. Les temps 0, 5, 10, 60 et 180 min ont été comparé ensemble pour chaque type de boisson. Les lettres différentes indiquent une différence significative entre les types de boisson ( $p \leq 0,05$ )

s/o : sans objet

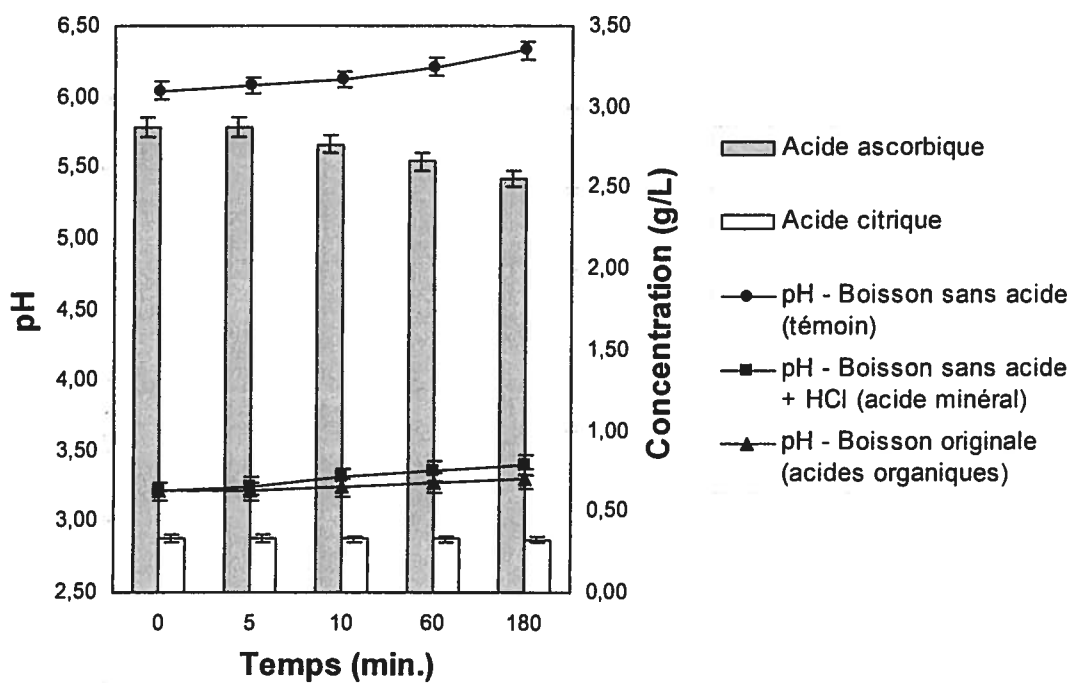
### 1.2.3. *Serratia liquefaciens*

La figure 10 et le tableau X présentent l'évolution du pH et de la concentration en acides organiques non dissociés pour *Serratia liquefaciens* au cours du temps.

Tel qu'observé pour *Escherichia coli* et *Salmonella Typhi*, le pH de la boisson sans acide (témoin) est stable durant toute l'expérience. Les valeurs du pH évoluent de  $6,04 \pm 0,03$  à  $6,33 \pm 0,04$  en 180 min. Les valeurs du pH des boissons contenant des acides n'évoluent pas non plus de manière significative ( $p > 0,05$ ) au cours de l'expérience. En 180 min le pH de la boisson en présence des acides organiques est passé de  $3,21 \pm 0,02$  à  $3,40 \pm 0,05$ . En présence de l'acide minéral, le pH de la boisson a évolué de  $3,21 \pm 0,09$  à  $3,30 \pm 0,07$ , pour la même période. Les valeurs de pH ne sont pas affectées ( $p > 0,05$ ) par la nature de l'acide (minéral ou organique) présent dans la boisson. Les différences d'activités antibactériennes observées dans l'étude de la cinétique d'inhibition bactérienne ne peuvent donc pas être imputées en totalité à l'acidité du pH.

Les concentrations de la forme non dissociée des deux acides organiques présents dans la boisson originale ont été calculées. De 0 à 180 min, la concentration en acide ascorbique sous forme non dissocié diminue légèrement (de 2,87 g / L à 2,56 g / L), comme celle de l'acide citrique non dissocié (de 0,33 g / L à 0,32 g / L).





**Figure 10 – Évolution du pH et de la concentration en acides organiques sous forme non dissociée pour *Serratia liquefaciens* en fonction du temps**

**Tableau X - pH et concentrations de la forme non dissociée des acides organiques (g / L) pour *Serratia liquefaciens***

	Temps (min.)	pH (mesuré)	Concentration en acide citrique non dissocié (calculée) (g / L)	Concentration en acide ascorbique non dissocié (calculée) (g / L)
<b>Sans acide</b>	0	6,04 ± 0,03 <sup>a</sup>	s/o	s/o
	5	6,08 ± 0,01 <sup>a</sup>	s/o	s/o
	10	6,12 ± 0,01 <sup>a</sup>	s/o	s/o
	60	6,21 ± 0,05 <sup>a</sup>	s/o	s/o
	180	6,33 ± 0,04 <sup>a</sup>	s/o	s/o
<b>Acide miné- ral</b>	0	3,21 ± 0,02 <sup>b</sup>	s/o	s/o
	5	3,25 ± 0,04 <sup>b</sup>	s/o	s/o
	10	3,31 ± 0,06 <sup>b</sup>	s/o	s/o
	60	3,36 ± 0,07 <sup>b</sup>	s/o	s/o
	180	3,40 ± 0,05 <sup>b</sup>	s/o	s/o
<b>Acides orga- niques</b>	0	3,21 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,33 ± 0.001 <sup>1</sup>	2,87 ± 0.12 <sup>1</sup>
	5	3,21 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,33 ± 0.005 <sup>1</sup>	2,87 ± 0.02 <sup>1</sup>
	10	3,24 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,33 ± 0.003 <sup>1</sup>	2,77 ± 0.10 <sup>1</sup>
	60	3,27 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,33 ± 0.001 <sup>1</sup>	2,66 ± 0.09 <sup>1</sup>
	180	3,30 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,32 ± 0.007 <sup>1</sup>	2,56 ± 0.19 <sup>1</sup>

<sup>a, b</sup> Pour un temps donné, les lettres différentes indiquent une différence significative entre les types de boisson ( $p \leq 0,05$ )

<sup>1, 2</sup> L'analyse statistique a été faite dans le temps. Les temps 0, 5, 10, 60 et 180 min ont été comparé ensemble pour chaque type de boisson. Les lettres différentes indiquent une différence significative entre les types de boisson ( $p \leq 0,05$ )

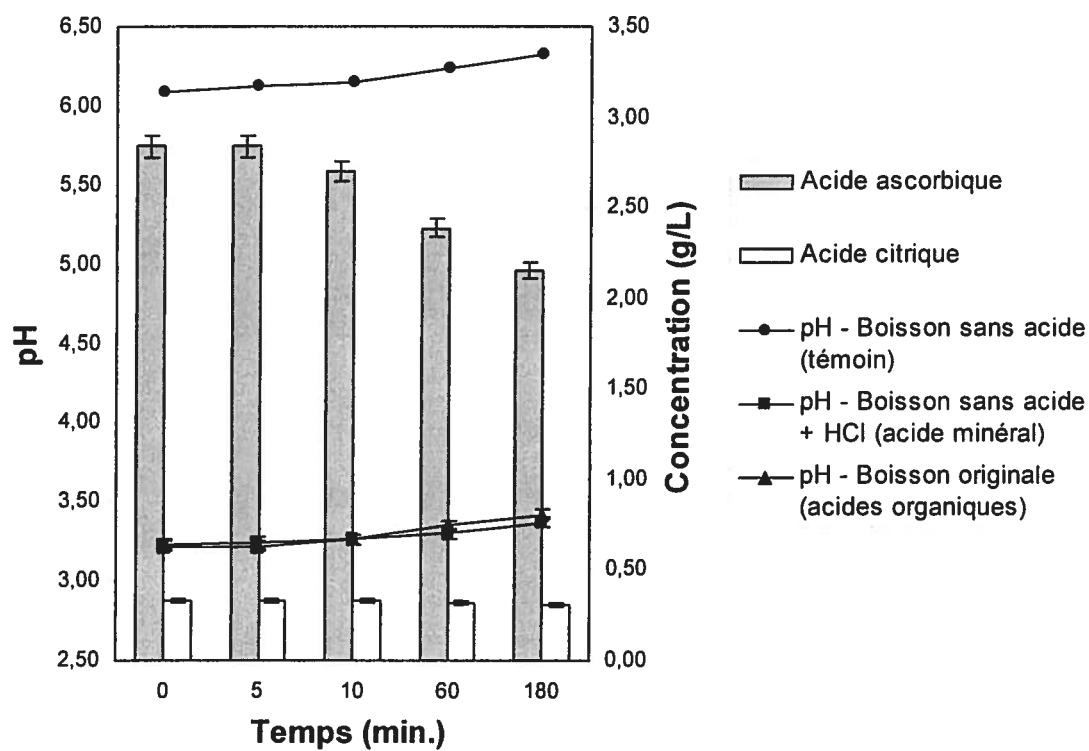
s/o : sans objet

#### *1.2.4. Mélange des 3 souches*

L'évolution du pH et de la concentration en acides organiques non dissociés sont présentés à la figure 11 et au tableau XI qui s'y rattache.

Le pH de l'expérience réalisée sur les trois souches évolue comme le pH de l'expérience menée sur chaque souche individuellement. Dans le cas de la boisson sans acide (témoin), le pH augmente légèrement pendant les 180 min de l'expérience, mais de façon non significative ( $p > 0,05$ ). Dans le cas des boissons contenant des acides, les variations de pH observées au cours du temps ne sont pas non plus significatives ( $p > 0,05$ ). Les valeurs varient respectivement de  $3,23 \pm 0,04$  à  $3,37 \pm 0,07$  pour la boisson contenant l'acide minéral et de  $3,22 \pm 0,12$  à  $3,42 \pm 0,11$  pour celle contenant les acides organiques. Tel qu'observé pour les trois souches individuellement, les différences enregistrées entre les valeurs de pH en présence de l'acide minéral et des acides organiques ne sont pas significatives ( $p > 0,05$ ) pour le mélange bactérien.

Les concentrations en acide ascorbique non dissocié ont diminuées de  $2,87 \text{ g / L}$  pour  $t = 0$  à  $2,56$  pour  $t = 180 \text{ min}$ . Celles de l'acide citrique non dissocié ont également diminuées légèrement de  $0,33 \text{ g / L}$  à  $0,32 \text{ g / L}$ .



**Figure 11 – Évolution du pH et de la concentration en acides organiques sous forme non dissociée pour le mélange des 3 souches bactériennes en fonction du temps**

**Tableau XI - pH et concentrations de la forme non dissociée des acides organiques (g / L) pour le mélange des 3 souches**

	Temps (min.)	pH (mesuré)	Concentration en acide citrique non dissocié (calculée) (g / L)	Concentration en acide ascorbique non dissocié (calculée) (g / L)
<b>Sans acide</b>	0	6,08 <sup>a</sup>	s/o	s/o
	5	6,12 <sup>a</sup>	s/o	s/o
	10	6,15 <sup>a</sup>	s/o	s/o
	60	6,24 <sup>a</sup>	s/o	s/o
	180	6,32 <sup>a</sup>	s/o	s/o
<b>Acide miné- ral</b>	0	3,23 <sup>b</sup>	s/o	s/o
	5	3,24 <sup>b</sup>	s/o	s/o
	10	3,26 <sup>b</sup>	s/o	s/o
	60	3,30 <sup>b</sup>	s/o	s/o
	180	3,37 <sup>b</sup>	s/o	s/o
<b>Acides orga- niques</b>	0	3,22 <sup>b</sup>	0,33 ± 0.005 <sup>1</sup>	2,87 ± 0.14 <sup>1</sup>
	5	3,22 <sup>b</sup>	0,33 ± 0.003 <sup>1</sup>	2,87 ± 0.09 <sup>1</sup>
	10	3,26 <sup>b</sup>	0,33 ± 0.001 <sup>1</sup>	2,77 ± 0.07 <sup>1</sup>
	60	3,35 <sup>b</sup>	0,32 ± 0.001 <sup>1</sup>	2,63 ± 0.04 <sup>2</sup>
	180	3,42 <sup>b</sup>	0,31 ± 0.007 <sup>1</sup>	2,58 ± 0.12 <sup>2</sup>

<sup>a, b</sup> Pour un temps donné, les lettres différentes indiquent une différence significative entre les types de boisson ( $p \leq 0,05$ )

<sup>1, 2</sup> L'analyse statistique a été faite dans le temps. Les temps 0, 5, 10, 60 et 180 min ont été comparé ensemble pour chaque type de boisson. Les lettres différentes indiquent une différence significative entre les types de boisson ( $p \leq 0,05$ )

s/o : sans objet

## 2. STABILITÉ DES MICRONUTRIMENTS

### 2.1. Vitamines hydrosolubles

#### 2.1.1. La vitamine B<sub>2</sub> (riboflavine)

Les figures 12 et 13 ainsi que le tableau XII montrent une importante réduction de la teneur en vitamine B<sub>2</sub> de la boisson au cours des 9 mois d'expérimentation sous toutes les différentes conditions de stockage.

Après 9 mois, des concentrations de  $20,82 \pm 1,45$  µg de vitamine B<sub>2</sub> par gramme de poudre de boisson, représentant une diminution de 13,25 %, et de  $19,66 \pm 0,39$  µg / g de poudre, représentant une diminution de 28,12 %, ont été enregistrées, pour les échantillons entreposés respectivement à des humidités relatives de 56 % et 100 % sous une température de 23°C. Pour les échantillons entreposés à 45°C, les concentrations mesurées étaient de  $17,25 \pm 1,03$  µg / g de poudre (soit une perte 18,08 %) à 56 % d'humidité relative et de  $13,94 \pm 1,12$  µg / g de poudre (soit une perte de 41,92 %) à 100 % d'humidité relative pour cette même période.

L'augmentation de la température de stockage (de 23°C à 45°C) affecte significativement ( $p \leq 0,05$ ) la concentration en vitamine B<sub>2</sub> de la boisson dès le 15<sup>ème</sup> jour de stockage, et ce, pour les 2 degrés d'humidité relative. Après 15 jours d'entreposage, des concentrations de  $23,21 \pm 0,08$  µg / g de poudre à 23°C vs.  $22,47 \pm 0,07$  µg / g de poudre à 45°C pour une humidité relative de 56 % ont été mesurées. À la même période, des concentrations de  $23,09 \pm 0,09$  µg / g de poudre à 23°C vs.  $22,39 \pm 0,12$  µg / g de poudre à 45°C ont été enregistrées dans les échantillons stockés à 100 % d'humidité relative.

Une augmentation du degré d'humidité relative de 56 % à 100 % affect également ( $p \leq 0,05$ ) la concentration en vitamine B<sub>2</sub> à partir du jour 210 pour les échantillons placés à 23°C et à partir du jour 150 pour ceux à 45°C. Après 210 jours de stockage, des concentrations de  $21,55 \pm 0,39 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 56 % H. R. vs.  $19,86 \pm 0,60 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 100 % H. R. ont été observées pour les échantillons stockés à 23°C. Pour les échantillons entreposés à 45°C, après 150 jours de stockage, des concentrations de  $18,52 \pm 0,73 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 56 % H. R. vs.  $17,35 \pm 0,61 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 100 % H. R. ont été mesurées.

### **2.1.2. La vitamine B<sub>6</sub> (pyridoxine)**

La concentration en vitamine B<sub>6</sub> a également diminuée au cours de l'expérience (figures 12 et 13, tableau XIII). Après 270 jours d'entreposage à 23°C, les concentrations de la vitamine B<sub>6</sub> étaient de  $24,13 \pm 0,68 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 56 % d'humidité relative représentant un pourcentage de perte de 13,82 % et de  $17,95 \pm 0,16 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 100 % d'humidité relative représentant 36,04 % de perte en 9 mois. Les concentrations mesurées pour les échantillons stockés à 45°C étaient de  $17,91 \pm 1,25 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre (une diminution de 35,89 %) à 56 % d'humidité relative et de  $17,34 \pm 0,47 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre (une diminution de 38,07 %) à 100 % d'humidité relative.

Les résultats montrent qu'une augmentation de la température de stockage entraîne une perte significative ( $p \leq 0,05$ ) de vitamine B<sub>6</sub> dans la boisson dès le premier jour de l'expérience pour les échantillons entreposés à 56 % et 100 % d'humidité relative. Le contenu en vitamine B<sub>6</sub> de la poudre était alors de  $27,67 \pm 0,47 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 23°C vs.  $26,15 \pm 0,07 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 45°C pour une humidité relative de 56 %. Pour les échantillons entreposés à une humidité relative de 100% et pour la même période, des concentrations de  $27,59 \pm 0,09 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre vs.  $25,89 \pm 0,22 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 45°C ont été observées.

Un changement du degré d'humidité relative affecte significativement ( $p \leq 0,05$ ) la concentration en vitamine B<sub>6</sub> des échantillons entreposés à 23°C et à partir du jour 150. Les concentrations observées étaient alors de  $25,67 \pm 0,32 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 56 % H. R. vs  $23,33 \pm 0,64 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 100 % H. R.. À 45°C, les résultats montrent que l'augmentation de l'humidité relative n'affecte pas de manière significative ( $p > 0,05$ ) sur le contenu de la boisson en vitamine B<sub>6</sub>.

### 2.1.3. La vitamine B<sub>12</sub> (cyanocobalamine)

La vitamine B<sub>12</sub> est une des trois vitamines hydrosolubles les plus sensibles à la dégradation au cours de l'expérience (figures 12 et 13; tableau XIV). Après 270 jours d'entreposage à 23°C et 56 % d'humidité relative, le pourcentage de dégradation de la vitamine B<sub>12</sub> dans les échantillons était de 18,33 % (soit  $0,098 \pm 0,005 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre) contre 49,17 % (soit  $0,061 \pm 0,003 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre) à 23°C et 100 % d'humidité relative. Durant cette même période, dans les échantillons entreposés à 45°C, les pourcentages de perte observés étaient plus importants encore : 34,17 % de perte à 56 % d'humidité relative et 59,17 % de perte à 100 % d'humidité relative (correspondant respectivement à des concentrations en vitamine B<sub>12</sub> de  $0,078 \pm 0,010$  et  $0,049 \pm 0,007 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre).

L'augmentation de la température affecte ( $p \leq 0,05$ ) la concentration en vitamine B<sub>12</sub> de la boisson dès le premier jour d'entreposage, quelque soit le degré d'humidité relative. Au jour 1, le contenu en vitamine B<sub>12</sub> était de  $0,121 \pm 0,001 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 23°C et  $0,110 \pm 0,001 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 45°C pour les échantillons entreposés à 56 % d'humidité relative. Pour ceux entreposés à 100 % d'humidité relative, les concentrations en vitamine B<sub>12</sub> étaient de  $0,120 \pm 0,001 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 23°C et de  $0,109 \pm 0,003 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 45°C.

Une augmentation du degré d'humidité relative entraîne ( $p \leq 0,05$ ) une diminution de la teneur en vitamine B<sub>12</sub> de la poudre, à partir du jour 90 pour les sachets de poudre de



boisson placés à 23°C. Au jour 90, les concentrations mesurées étaient alors de  $0,113 \pm 0,003 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 56 % H. R. vs.  $0,109 \pm 0,002 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 100 % H. R. Pour les échantillons entreposés à 45°C, l'augmentation du degré d'humidité relative affecte ( $p \leq 0,05$ ) la concentration en vitamine B<sub>12</sub> à partir du jour 60. Au jour 60, le contenu en vitamines B<sub>12</sub> était alors de  $0,099 \pm 0,002 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 56 % H. R. contre  $0,091 \pm 0,002 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 100 % H. R..

#### **2.1.4. La vitamine C (acide ascorbique)**

Des pertes drastiques de vitamine C ont été enregistrées au cours de l'expérience, surtout dans les conditions extrêmes de température et d'humidité relative. Les résultats de l'étude de stabilité et les résultats de l'analyse statistique sont présentés aux figures 12 et 13 et dans le tableau XV. Après 270 jours de stockage à 23°C, la teneur en vitamine C des échantillons a diminué de 35,56 % à 56 % d'humidité relative et de 78,58 % à 100 % d'humidité relative. Les concentrations en vitamine C étaient alors respectivement de  $1856 \pm 59 \mu\text{g}$  de vitamine C / g de poudre et  $1513 \pm 65 \mu\text{g}$  de vitamine C / g de poudre. Pour cette même période, mais à 45°C, les réductions en vitamine C observées étaient de 47,43 % à 56 % d'humidité relative avec une concentration de  $617 \pm 62 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre et de 85,66 % à 100 % d'humidité relative avec une concentration de  $413 \pm 29 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre.

Dès le premier jour d'entreposage, une augmentation de la température de stockage entraîne une diminution significative ( $p \leq 0,05$ ) de la concentration en vitamine C à 56 % et 100 % d'humidité relative. Pour les échantillons placés à 56 % d'humidité relative, des concentrations de  $2739 \pm 22 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 23°C vs.  $2516 \pm 25 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 45°C ont été enregistrées au jour 1 d'entreposage. Pour les échantillons placés à 100 % d'humidité relative, des concentrations de  $2713 \pm 62 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 23°C contre  $2424 \pm 26 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 45°C ont été mesurées dès le premier jour d'entreposage.

Une augmentation du degré d'humidité relative entraîne également une diminution significative ( $p \leq 0,05$ ) de la concentration en vitamine C après 90 jours pour les échantillons entreposés à 23°C et après 60 jours pour ceux placés à 45°C. Au jour 90, des concentrations de  $2516 \pm 33 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 56 % H. R. vs.  $2281 \pm 17 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 100 % H. R. ont été observées pour les échantillons stockés à 23°C. Pour ceux stockés à 45°C, des concentrations de  $1586 \pm 29 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 56 % H. R. vs.  $1425 \pm 46 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 100 % H. R. ont été mesurées après 60 jours

### ***2.1.5. L'acide folique***

Les résultats de l'étude sur le contenu en acide folique montrent que c'est la vitamine hydrosoluble présente dans la boisson la plus dégradée au cours de l'expérience (figures 12 et 13 et tableau XVI). Après 270 jours d'entreposage, des pertes de 62,14 % et 76,96 % ont été enregistrées, respectivement à 56 % et 100 % d'humidité relative à 23°C. De  $5,60 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre, la concentration initiale en acide folique a chuté à  $2,11 \pm 0,26 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre pour les échantillons entreposés à 56 % d'humidité relative et à  $2,04 \pm 0,15 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre pour ceux entreposés à 100 % d'humidité relative. Une dégradation plus élevée de l'acide folique a été enregistrée à 45°C. Les pourcentages de perte étaient de 63,57 % à 56 % d'humidité relative (soit une diminution de la concentration de  $5,60$  à  $1,29 \pm 0,20 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre) et 78,39 % à 100 % d'humidité relative (soit une diminution de la concentration de  $5,60$  à  $1,21 \pm 0,12 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre).

Les différences observées entre les deux températures d'entreposage sont significatives ( $p \leq 0,05$ ) à partir du premier mois de stockage pour les échantillons placés à 56 % et 100 % d'humidité relative. Durant cette période, des concentrations de  $4,94 \pm 0,12 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 23°C vs.  $4,35 \pm 0,14 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 45°C ont été enregistrées à 56 % H. R. Pour cette même période, à 100 % d'humidité relative des concentrations de  $4,85 \pm 0,05 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre vs.  $4,21 \pm 0,23 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre ont été

mesurées. L'effet du degré d'humidité relative ne semble pas être significatif sur la teneur en acide folique de la boisson en poudre.

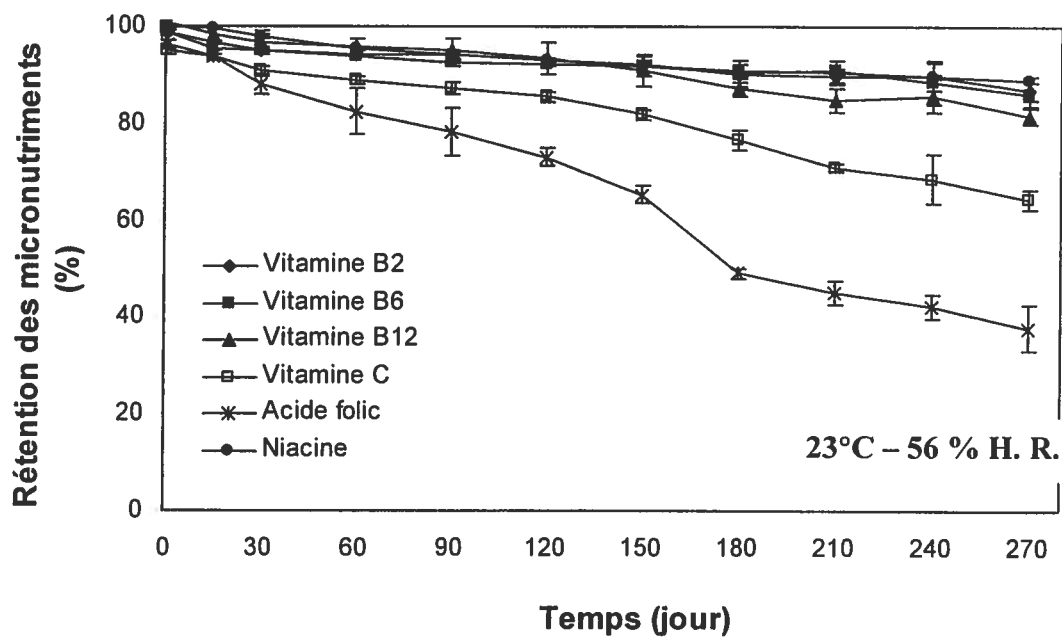
#### 2.1.6. *La niacine*

De faibles réductions de la concentration en niacine dans la boisson ont été enregistrées pendant la période expérimentale, quel que soit les conditions d'entreposage (figures 12 et 13, et tableau XVII). Après 270 jours d'entreposage à 23°C et 56 % d'humidité relative, le pourcentage de dégradation était de 10,89 % contre 15,52 % à 23°C et 100 % d'humidité relative. Les concentrations en niacine ont diminué respectivement de 205,60 µg / g de poudre à 183,17 ± 0,92 µg / g de poudre (à 56 % H. R.) et à 179,42 ± 1,58 µg / g de poudre à 100 % H. R.). Pour la même période, les pourcentages de perte observés dans les cas des échantillons stockés à 45°C étaient : 12,74 % de perte à 56 % d'humidité relative (soit une concentration de 173,72 ± 1,07 µg / g de poudre) et 17,75 % de perte à 100 % d'humidité relative (soit une concentration de 169,13 ± 1,60 µg / g de poudre).

Une augmentation de la température affecte significativement ( $p \leq 0,05$ ) la concentration en niacine de la boisson à partir du jour 90 à 56 % d'humidité relative et à partir du jour 150 à 100 % d'humidité relative. Au jour 90, des concentrations de 193,82 ± 1,34 µg / g de poudre à 23°C vs. 187,72 ± 0,94 µg / g de poudre à 45°C ont été mesurées dans les sachets de poudre stockés à 56 % d'humidité relative. Pour ceux stockés à 100% H. R des concentration de 185,43 ± 1,87 µg / g de poudre à 23°C vs. 177,45 ± 3,52 µg / g de poudre à 45°C ont été observées au jour 150.

L'augmentation de l'humidité relative affecte légèrement ( $p \leq 0,05$ ) la concentration des échantillons stockés à 23°C à partir du 30<sup>ième</sup> jour d'expérience.

a)



b)

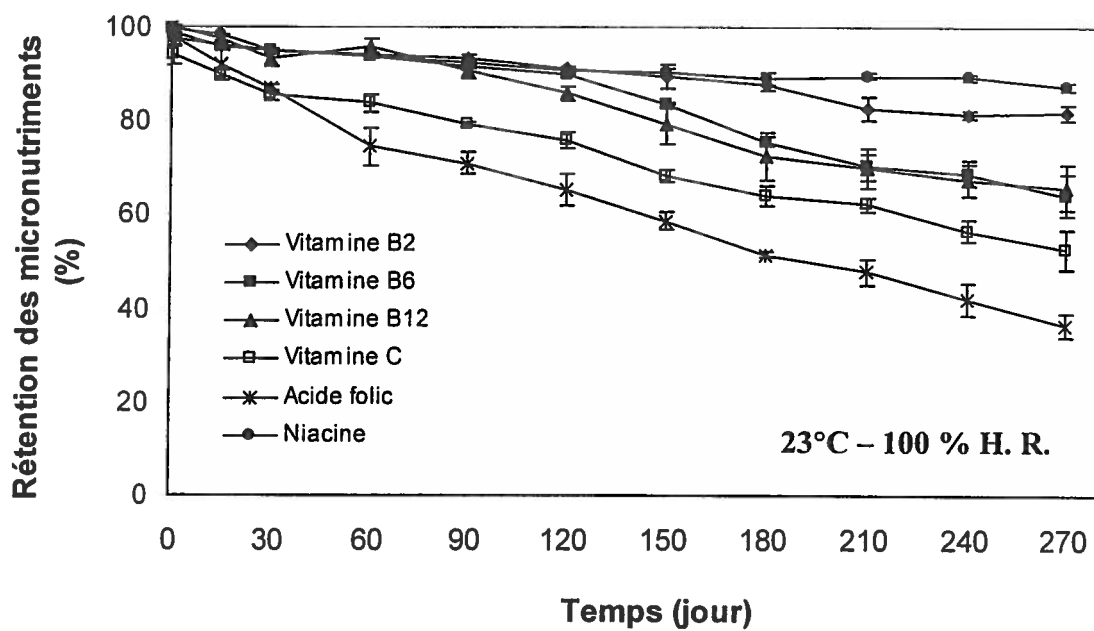
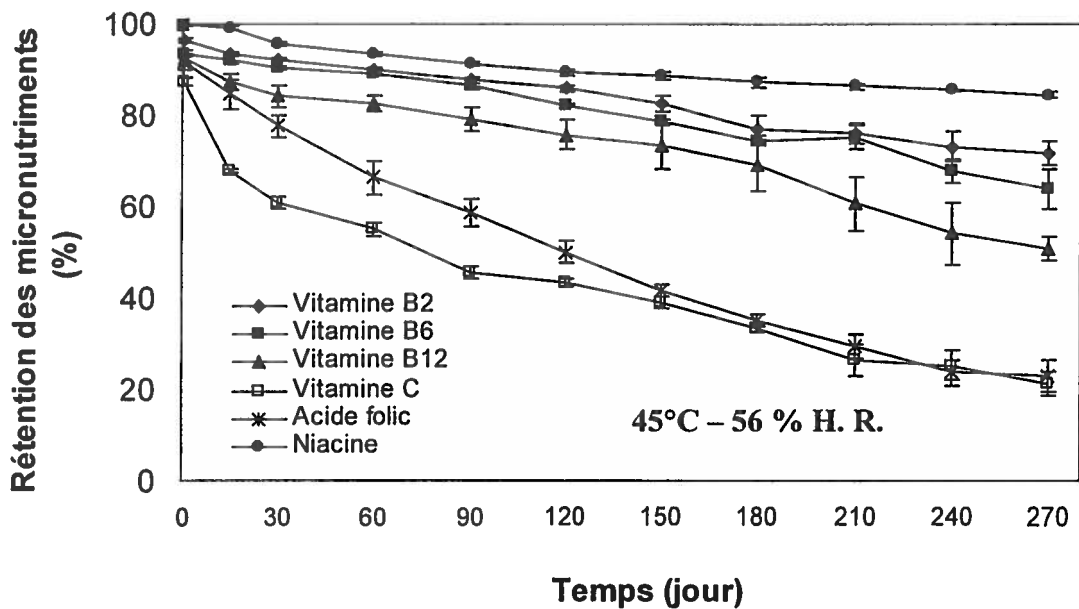


Figure 12 - Stabilité des vitamines hydrosolubles après 270 jours de stockage à 23°C : a) 56 % H. R. et b) 100 % H. R.

a)



b)

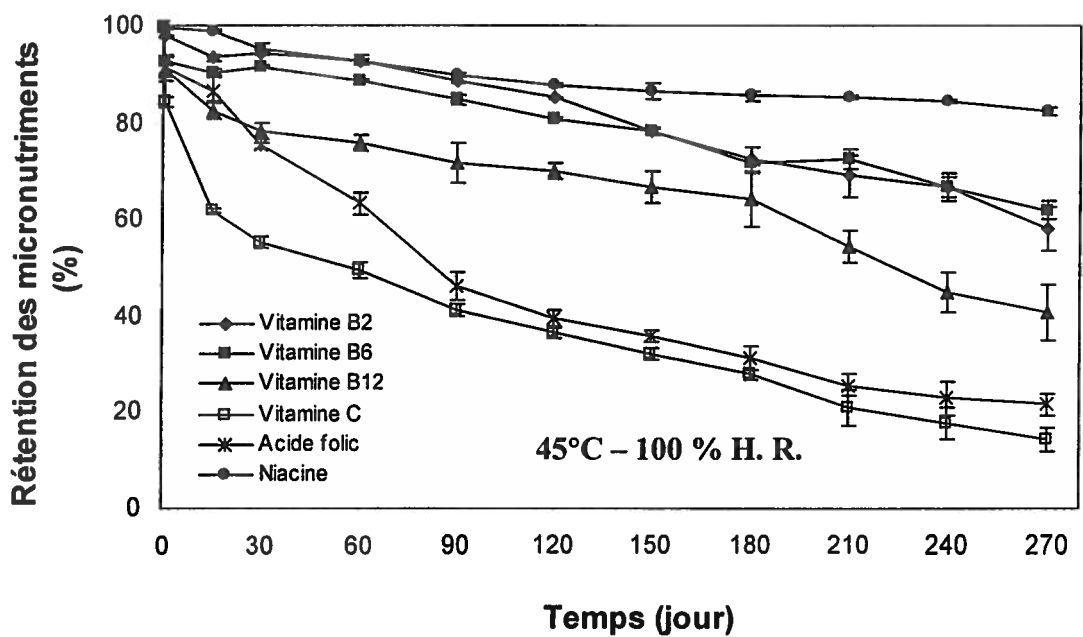


Figure 13 - Stabilité des vitamines hydrosolubles après 270 jours de stockage à 45°C : a) 56 % H. R. et b) 100 % H. R.

**Tableau XII - Concentrations en vitamine B<sub>2</sub> (µg / g de boisson en poudre) au cours des 270 jours de stockage**

Temps (jours)	Température	Humidité relative	
		56%	100%
0	-	24	24
1	23°C	23,71 ± 0,08 <sup>a</sup>	23,42 ± 0,07 <sup>a</sup>
	45°C	24,14 ± 0,09 <sup>a</sup>	23,47 ± 0,07 <sup>a</sup>
15	23°C	23,21 ± 0,08 <sup>a</sup>	23,09 ± 0,09 <sup>a</sup>
	45°C	22,47 ± 0,07 <sup>*a</sup>	22,39 ± 0,12 <sup>*a</sup>
30	23°C	22,84 ± 0,14 <sup>a</sup>	22,79 ± 0,07 <sup>a</sup>
	45°C	22,13 ± 0,05 <sup>*a</sup>	22,61 ± 0,8 <sup>a</sup>
60	23°C	22,67 ± 0,12 <sup>a</sup>	22,58 ± 0,09 <sup>a</sup>
	45°C	21,65 ± 0,06 <sup>*a</sup>	22,27 ± 0,23 <sup>a</sup>
90	23°C	22,58 ± 0,16 <sup>a</sup>	22,35 ± 0,18 <sup>a</sup>
	45°C	21,03 ± 0,12 <sup>*a</sup>	21,28 ± 0,13 <sup>*a</sup>
120	23°C	22,37 ± 0,09 <sup>a</sup>	21,90 ± 0,05 <sup>a</sup>
	45°C	20,62 ± 0,16 <sup>*a</sup>	20,40 ± 0,03 <sup>*a</sup>
150	23°C	22,17 ± 0,018 <sup>a</sup>	21,49 ± 0,60 <sup>a</sup>
	45°C	19,87 ± 1,42 <sup>*a</sup>	18,77 ± 0,21 <sup>*b</sup>
180	23°C	21,67 ± 1,65 <sup>a</sup>	21,08 ± 1,30 <sup>a</sup>
	45°C	18,52 ± 0,73 <sup>*a</sup>	17,35 ± 0,61 <sup>*b</sup>
210	23°C	21,55 ± 0,39 <sup>a</sup>	19,86 ± 0,60 <sup>b</sup>
	45°C	18,20 ± 0,48 <sup>*a</sup>	16,55 ± 1,05 <sup>*b</sup>
240	23°C	21,52 ± 0,69 <sup>a</sup>	19,53 ± 0,15 <sup>b</sup>
	45°C	17,56 ± 1,70 <sup>*a</sup>	15,97 ± 0,69 <sup>*b</sup>
270	23°C	20,82 ± 1,45 <sup>a</sup>	19,66 ± 0,39 <sup>b</sup>
	45°C	17,25 ± 1,03 <sup>*a</sup>	13,94 ± 1,12 <sup>*b</sup>

\* Pour un même niveau d'humidité relative et pour un même temps, la différence entre les températures (23°C et 45°C) est significative ( $p \leq 0,05$ )

<sup>a, b</sup> Pour une même température et pour un même temps, la différence entre les niveaux d'humidité relative (56% et 100%) est significative ( $p \leq 0,05$ )

**Tableau XIII - Concentrations en vitamine B<sub>6</sub> (µg / g de boisson en poudre) au cours des 270 jours de stockage**

Temps (jours)	Température	Humidité relative	
		56%	100%
0	-	28,00	28,00
1	23°C	27,67 ± 0,47 <sup>a</sup>	27,59 ± 0,09 <sup>a</sup>
	45°C	26,15 ± 0,07* <sup>a</sup>	25,89 ± 0,22* <sup>a</sup>
15	23°C	26,79 ± 0,16 <sup>a</sup>	26,82 ± 0,08 <sup>a</sup>
	45°C	25,80 ± 0,23* <sup>a</sup>	25,26 ± 0,15* <sup>a</sup>
30	23°C	26,57 ± 0,21 <sup>a</sup>	26,57 ± 0,20 <sup>a</sup>
	45°C	25,32 ± 0,16* <sup>a</sup>	25,63 ± 0,10* <sup>a</sup>
60	23°C	26,33 ± 0,07 <sup>a</sup>	26,17 ± 0,04 <sup>a</sup>
	45°C	24,91 ± 0,10* <sup>a</sup>	24,83 ± 0,10* <sup>a</sup>
90	23°C	25,91 ± 0,15 <sup>a</sup>	25,63 ± 0,16 <sup>a</sup>
	45°C	24,20 ± 0,16* <sup>a</sup>	23,68 ± 0,24* <sup>a</sup>
120	23°C	25,83 ± 0,18 <sup>a</sup>	25,18 ± 0,13 <sup>a</sup>
	45°C	23,03 ± 0,06* <sup>a</sup>	22,59 ± 0,07* <sup>a</sup>
150	23°C	25,67 ± 0,32 <sup>a</sup>	23,33 ± 0,64 <sup>b</sup>
	45°C	21,98 ± 0,15* <sup>a</sup>	21,87 ± 0,18* <sup>a</sup>
180	23°C	25,31 ± 0,50 <sup>a</sup>	21,17 ± 0,60 <sup>b</sup>
	45°C	20,86 ± 0,29* <sup>a</sup>	20,06 ± 0,13* <sup>a</sup>
210	23°C	25,41 ± 0,61 <sup>a</sup>	19,64 ± 0,12 <sup>b</sup>
	45°C	21,08 ± 0,79* <sup>a</sup>	20,31 ± 0,56* <sup>a</sup>
240	23°C	24,77 ± 1,27 <sup>a</sup>	19,27 ± 0,81 <sup>b</sup>
	45°C	19,03 ± 0,75* <sup>a</sup>	18,68 ± 0,62* <sup>a</sup>
270	23°C	24,13 ± 0,68 <sup>a</sup>	17,95 ± 0,16 <sup>b</sup>
	45°C	17,91 ± 1,25* <sup>a</sup>	17,34 ± 0,47* <sup>a</sup>

\* Pour un même niveau d'humidité relative et pour un même temps, la différence entre les températures (23°C et 45°C) est significative ( $p \leq 0,05$ )

<sup>a, b</sup> Pour une même température et pour un même temps, la différence entre les niveaux d'humidité relative (56% et 100%) est significative ( $p \leq 0,05$ )

**Tableau XIV - Concentrations en vitamine B<sub>12</sub> (µg / g de boisson en poudre) au cours des 270 jours de stockage**

Temps (jours)	Température	Humidité relative	
		56%	100%
0	-	0,120	0,120
1	23°C	0,121 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,120 ± 0,001 <sup>a</sup>
	45°C	0,110 ± 0,001 <sup>*a</sup>	0,109 ± 0,003 <sup>*a</sup>
15	23°C	0,118 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,116 ± 0,001 <sup>a</sup>
	45°C	0,105 ± 0,002 <sup>*a</sup>	0,099 ± 0,002 <sup>*a</sup>
30	23°C	0,116 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,112 ± 0,002 <sup>a</sup>
	45°C	0,101 ± 0,003 <sup>*a</sup>	0,094 ± 0,002 <sup>*a</sup>
60	23°C	0,114 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,114 ± 0,002 <sup>a</sup>
	45°C	0,099 ± 0,002 <sup>*a</sup>	0,091 ± 0,002 <sup>*b</sup>
90	23°C	0,113 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,109 ± 0,002 <sup>b</sup>
	45°C	0,095 ± 0,003 <sup>*a</sup>	0,086 ± 0,005 <sup>*b</sup>
120	23°C	0,111 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,103 ± 0,001 <sup>b</sup>
	45°C	0,091 ± 0,004 <sup>*a</sup>	0,084 ± 0,002 <sup>*b</sup>
150	23°C	0,109 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,094 ± 0,005 <sup>b</sup>
	45°C	0,087 ± 0,005 <sup>*a</sup>	0,080 ± 0,004 <sup>*b</sup>
180	23°C	0,105 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,087 ± 0,006 <sup>b</sup>
	45°C	0,083 ± 0,006 <sup>*a</sup>	0,077 ± 0,007 <sup>*b</sup>
210	23°C	0,102 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,084 ± 0,012 <sup>b</sup>
	45°C	0,073 ± 0,007 <sup>*a</sup>	0,064 ± 0,004 <sup>*b</sup>
240	23°C	0,102 ± 0,008 <sup>a</sup>	0,081 ± 0,010 <sup>b</sup>
	45°C	0,065 ± 0,012 <sup>*a</sup>	0,053 ± 0,005 <sup>*b</sup>
270	23°C	0,098 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,078 ± 0,010 <sup>b</sup>
	45°C	0,061 ± 0,003 <sup>*a</sup>	0,049 ± 0,007 <sup>*b</sup>

\* Pour un même niveau d'humidité relative et pour un même temps, la différence entre les températures (23°C et 45°C) est significative ( $p \leq 0,05$ )

<sup>a, b</sup> Pour une même température et pour un même temps, la différence entre les niveaux d'humidité relative (56% et 100%) est significative ( $p \leq 0,05$ )



**Tableau XV - Concentrations en vitamine C ( $\mu\text{g} / \text{g}$  de boisson en poudre) au cours des 270 jours de stockage**

Temps (jours)	Température	Humidité relative	
		56%	100%
0	-	2880	2880
1	23°C	2739 $\pm$ 22 <sup>a</sup>	2713 $\pm$ 62 <sup>a</sup>
	45°C	2516 $\pm$ 25 <sup>*a</sup>	2424 $\pm$ 26 <sup>*a</sup>
15	23°C	2701 $\pm$ 17 <sup>a</sup>	2590 $\pm$ 19 <sup>a</sup>
	45°C	1955 $\pm$ 40 <sup>*a</sup>	1776 $\pm$ 10 <sup>*a</sup>
30	23°C	2616 $\pm$ 32 <sup>a</sup>	2462 $\pm$ 29 <sup>a</sup>
	45°C	1748 $\pm$ 22 <sup>*a</sup>	1588 $\pm$ 38 <sup>*a</sup>
60	23°C	2562 $\pm$ 24 <sup>a</sup>	2414 $\pm$ 55 <sup>a</sup>
	45°C	1586 $\pm$ 29 <sup>*a</sup>	1425 $\pm$ 46 <sup>*b</sup>
90	23°C	2516 $\pm$ 33 <sup>a</sup>	2281 $\pm$ 17 <sup>b</sup>
	45°C	1313 $\pm$ 52 <sup>*a</sup>	1184 $\pm$ 38 <sup>*b</sup>
120	23°C	2460 $\pm$ 33 <sup>a</sup>	2188 $\pm$ 49 <sup>b</sup>
	45°C	1251 $\pm$ 36 <sup>*a</sup>	1054 $\pm$ 30 <sup>*b</sup>
150	23°C	2358 $\pm$ 32 <sup>a</sup>	1963 $\pm$ 39 <sup>b</sup>
	45°C	1131 $\pm$ 29 <sup>*a</sup>	925 $\pm$ 37 <sup>*b</sup>
180	23°C	2211 $\pm$ 59 <sup>a</sup>	1843 $\pm$ 63 <sup>b</sup>
	45°C	960 $\pm$ 56 <sup>*a</sup>	802 $\pm$ 28 <sup>*b</sup>
210	23°C	2043 $\pm$ 28 <sup>a</sup>	1788 $\pm$ 47 <sup>b</sup>
	45°C	765 $\pm$ 30 <sup>*a</sup>	606 $\pm$ 42 <sup>*a</sup>
240	23°C	1977 $\pm$ 43 <sup>a</sup>	1628 $\pm$ 63 <sup>b</sup>
	45°C	728 $\pm$ 37 <sup>*a</sup>	510 $\pm$ 38 <sup>*b</sup>
270	23°C	1856 $\pm$ 59 <sup>a</sup>	1513 $\pm$ 65 <sup>b</sup>
	45°C	617 $\pm$ 62 <sup>*a</sup>	413 $\pm$ 29 <sup>*b</sup>

\* Pour un même niveau d'humidité relative et pour un même temps, la différence entre les températures (23°C et 45°C) est significative ( $p \leq 0,05$ )

<sup>a, b</sup> Pour une même température et pour un même temps, la différence entre les niveaux d'humidité relative (56% et 100%) est significative ( $p \leq 0,05$ )

**Tableau XVI - Concentrations en acide folique ( $\mu\text{g}$  / g de boisson en poudre) au cours des 270 jours de stockage**

Temps (jours)	Température	Humidité relative	
		56%	100%
0	-	5,60	5,60
1	23°C	5,39 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	5,49 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>
	45°C	5,13 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	5,12 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>
15	23°C	5,26 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	5,14 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>
	45°C	4,74 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	4,84 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
30	23°C	4,94 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	4,85 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
	45°C	4,35 $\pm$ 0,14 <sup>*a</sup>	4,21 $\pm$ 0,03 <sup>*a</sup>
60	23°C	4,62 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	4,16 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
	45°C	3,72 $\pm$ 0,21 <sup>*a</sup>	3,54 $\pm$ 0,13 <sup>*a</sup>
90	23°C	4,37 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	3,94 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>
	45°C	3,29 $\pm$ 0,17 <sup>*a</sup>	2,57 $\pm$ 0,16 <sup>*a</sup>
120	23°C	4,09 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	3,66 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>
	45°C	2,80 $\pm$ 0,14 <sup>*a</sup>	2,21 $\pm$ 0,09 <sup>*a</sup>
150	23°C	3,65 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	3,28 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
	45°C	2,33 $\pm$ 0,07 <sup>*a</sup>	2,00 $\pm$ 0,07 <sup>*a</sup>
180	23°C	2,75 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	2,88 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>
	45°C	1,96 $\pm$ 0,07 <sup>*a</sup>	1,76 $\pm$ 0,14 <sup>*a</sup>
210	23°C	2,52 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	2,67 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
	45°C	1,65 $\pm$ 0,14 <sup>*a</sup>	1,44 $\pm$ 0,12 <sup>*a</sup>
240	23°C	2,37 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	2,36 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>
	45°C	1,96 $\pm$ 0,07 <sup>*a</sup>	1,28 $\pm$ 0,19 <sup>*a</sup>
270	23°C	2,11 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	2,04 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
	45°C	1,29 $\pm$ 0,20 <sup>*a</sup>	1,21 $\pm$ 0,12 <sup>*a</sup>

\* Pour un même niveau d'humidité relative et pour un même temps, la différence entre les températures (23°C et 45°C) est significative ( $p \leq 0,05$ )

<sup>a, b</sup> Pour une même température et pour un même temps, la différence entre les niveaux d'humidité relative (56% et 100%) est significative ( $p \leq 0,05$ )

**Tableau I XVII- Concentrations en niacine ( $\mu\text{g} / \text{g}$  de boisson en poudre) au cours des 270 jours de stockage**

Temps (jours)	Température	Humidité relative	
		56%	100%
0	-	205,60	205,60
1	23°C	205,63 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	204,93 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>
	45°C	205,15 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>	204,37 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>
15	23°C	204,87 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	201,73 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>
	45°C	203,92 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>	203,38 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>
30	23°C	201,18 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>	194,80 $\pm$ 1,30 <sup>b</sup>
	45°C	196,65 $\pm$ 1,15 <sup>a</sup>	195,71 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>
60	23°C	196,42 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	192,88 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup>
	45°C	192,22 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>	190,37 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>
90	23°C	193,82 $\pm$ 1,34 <sup>a</sup>	189,63 $\pm$ 1,28 <sup>b</sup>
	45°C	187,72 $\pm$ 0,94 <sup>*a</sup>	184,08 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>
120	23°C	191,55 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>	186,78 $\pm$ 1,22 <sup>b</sup>
	45°C	183,65 $\pm$ 1,15 <sup>*a</sup>	180,28 $\pm$ 1,08 <sup>a</sup>
150	23°C	188,77 $\pm$ 4,25 <sup>a</sup>	185,43 $\pm$ 1,87 <sup>b</sup>
	45°C	182,28 $\pm$ 1,92 <sup>*a</sup>	177,45 $\pm$ 3,52 <sup>*a</sup>
180	23°C	186,78 $\pm$ 2,50 <sup>a</sup>	183,33 $\pm$ 2,67 <sup>b</sup>
	45°C	179,33 $\pm$ 2,14 <sup>*a</sup>	175,90 $\pm$ 2,11 <sup>*a</sup>
210	23°C	185,92 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>	184,2 $\pm$ 0,96 <sup>b</sup>
	45°C	177,62 $\pm$ 1,54 <sup>*a</sup>	175,32 $\pm$ 0,83 <sup>*a</sup>
240	23°C	184,75 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>	183,6 $\pm$ 1,10 <sup>b</sup>
	45°C	175,9 $\pm$ 0,57 <sup>*a</sup>	173,58 $\pm$ 0,72 <sup>*a</sup>
270	23°C	183,17 $\pm$ 0,92 <sup>a</sup>	179,42 $\pm$ 1,58 <sup>b</sup>
	45°C	173,72 $\pm$ 1,07 <sup>*a</sup>	169,13 $\pm$ 1,60 <sup>*a</sup>

\* Pour un même niveau d'humidité relative et pour un même temps, la différence entre les températures (23°C et 45°C) est significative ( $p \leq 0,05$ )

<sup>a, b</sup> Pour une même température et pour un même temps, la différence entre les niveaux d'humidité relative (56% et 100%) est significative ( $p \leq 0,05$ )

## 2.2. Vitamines liposolubles

### 2.2.1. La vitamine E (acétate d' $\alpha$ -tocophérol)

Le contenu en vitamine E de la boisson a diminué tout au long de l'expérience (figures 14 et 15, et tableau XVIII). Du jour 1 au 9<sup>ième</sup> mois, pour les échantillons entreposés à 23°C, des réductions de 13,00 % et 21,59 % de la teneur en vitamine E ont été enregistrées, respectivement à 56 % et 100 % d'humidité relative. De 420,00  $\mu\text{g} / \text{g}$  de poudre, les concentrations en vitamine E ont diminuée à  $365,39 \pm 1,00 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre pour les échantillons entreposés à 56 % d'humidité relative. Pour ceux entreposés à 100 % d'humidité relative et pour la même période, les concentrations ont diminuées de 420,00  $\mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à  $359,87 \pm 2,24 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre. Durant cette période, les pourcentages de perte en vitamine E, dans les échantillons entreposés à 45°C, étaient de 14,32 % à 56 % d'humidité relative, représentant une concentration de  $329,32 \pm 1,61 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre. Pour la même période, à 45°C et 100 % d'humidité relative une perte de 26,27 % a été enregistrée, correspondant à une concentration de  $309,03 \pm 2,38 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre.

Une augmentation de la température de stockage de 23°C à 45°C entraîne une diminution significative ( $p \leq 0,05$ ) de la concentration en vitamine E des échantillons placés à 56 % d'humidité relative à partir du jour 180. Des concentrations de  $374,25 \pm 12,50 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 23°C vs.  $349,30 \pm 15,22 \mu\text{g} / \text{g}$  de poudre à 45°C ont été enregistrées. L'augmentation de la température pour les échantillons placés à 100 % d'humidité relative n'affecte pas de manière significative ( $p > 0,05$ ) la concentration en vitamine E de la boisson et ce, durant toute la période d'entreposage.

Le degré d'humidité relative n'affecte pas ( $p > 0,05$ ) la teneur en vitamine E dosée quelque soit la température d'entreposage.

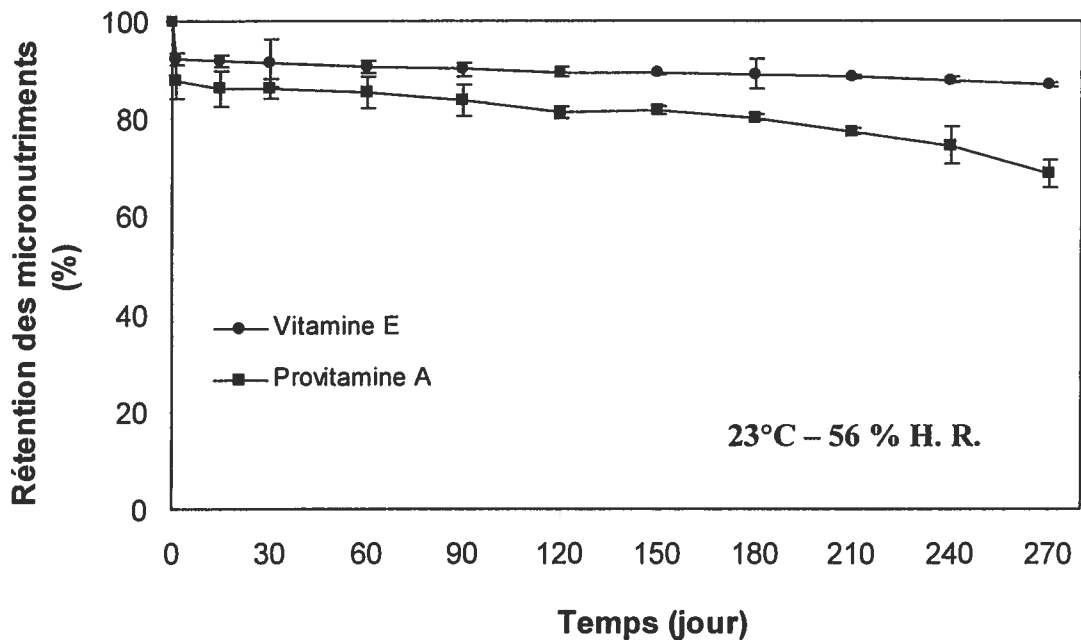
### 2.2.2. *La provitamine A*

Des pertes drastiques de provitamine A ont été enregistrées au cours de l'expérience, surtout dans les conditions de température (45°C) et d'humidité relative (100%) élevées (figures 14 et 15). Après 270 jours de stockage à 23°C, la teneur en provitamine A des échantillons a diminué de 31,33 % à 56 % d'humidité relative et de 69,48 % à 100 % d'humidité relative. Les contenus en provitamine A des sachets de boisson en poudre étaient alors de  $7,03 \pm 0,34 \mu\text{g/g}$  de poudre et  $4,61 \pm 0,48 \mu\text{g/g}$  de poudre (la teneur initiale des échantillons en provitamine A était de  $21,00 \mu\text{g/g}$  de poudre). Pour cette même période, lorsque les échantillons ont été entreposés à 45°C, les réductions observées étaient 30,48 % à 56 % d'humidité relative et 81,29 % à 100 % d'humidité relative. Les teneurs en provitamine A étaient de  $6,41 \pm 0,35 \mu\text{g/g}$  de poudre et de  $3,93 \pm 0,8 \mu\text{g/g}$  de poudre respectivement, pour les échantillons entreposés à 56 % et 100 % d'humidité relative.

Une augmentation de la température de stockage affecte ( $p \leq 0,05$ ) la concentration en provitamine A après 150 jours pour les échantillons placés à 56 % d'humidité relative et après 15 jours seulement pour ceux placés à 100 % d'humidité relative. Au jour 150, des concentrations de  $17,13 \pm 0,18 \mu\text{g/g}$  de poudre à 23°C vs.  $11,05 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$  de poudre à 45°C ont été observées pour les échantillons entreposés à 56 % d'humidité relative. Au jour 60, des concentrations en provitamine A de  $18,21 \pm 0,97 \mu\text{g/g}$  de poudre à 23°C vs.  $12,88 \pm 1,12 \mu\text{g/g}$  de poudre à 45°C ont été enregistrées pour les échantillons entreposés à 100 % d'humidité relative.

L'augmentation du degré d'humidité relative entraîne une diminution significative ( $p \leq 0,05$ ) de la teneur de la boisson en provitamine A seulement pour les échantillons stockés à 45°C à partir du jour 60. Pour ces échantillons, des concentrations de  $17,56 \pm 0,74 \mu\text{g/g}$  de poudre à 56 % H. R. vs.  $12,88 \pm 1,12 \mu\text{g/g}$  de poudre à 100 % H. R. ont été mesurées au jour 60.

a)



b)

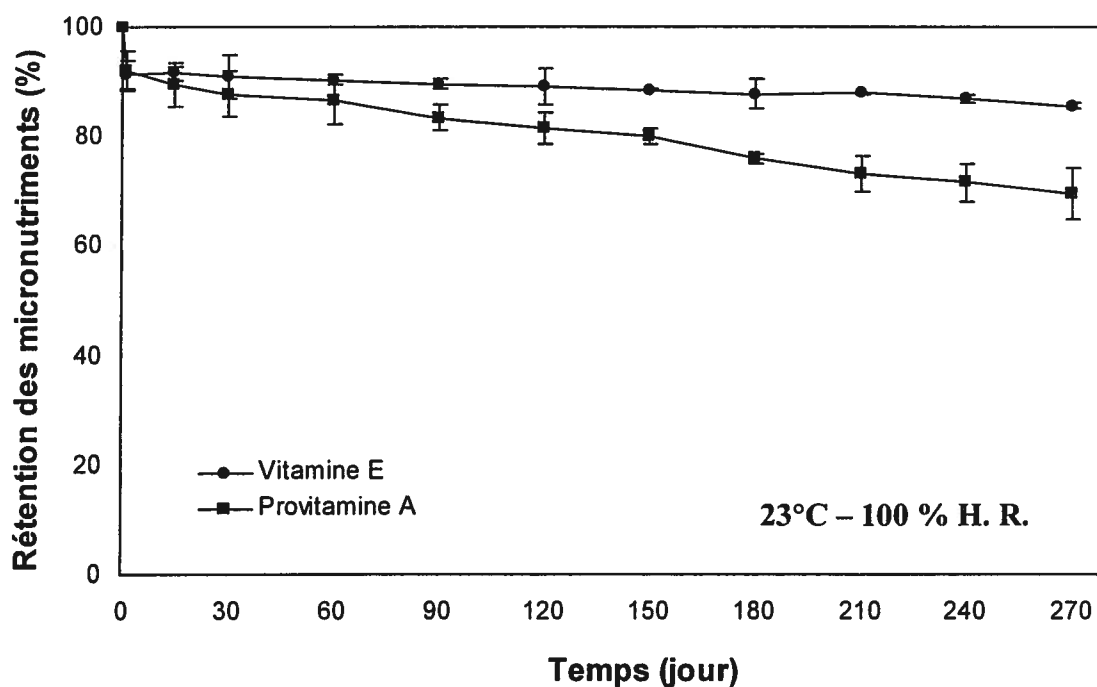
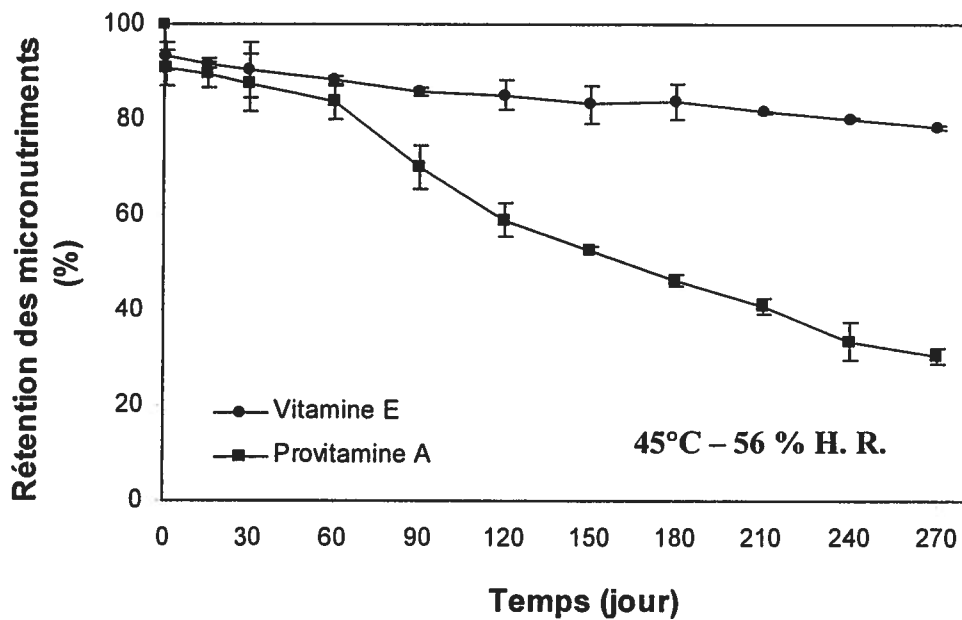


Figure 14 - Stabilité des vitamines liposolubles après 270 jours de stockage à 23°C :

a) 56 % H. R. et b) 100 % H. R.

a)



b)

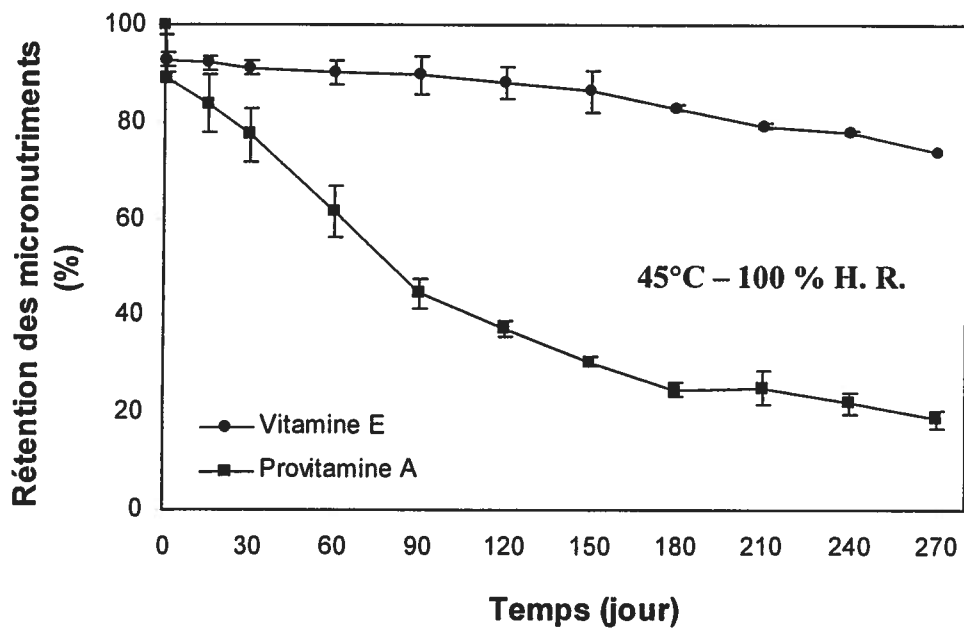


Figure 15 - Stabilité des vitamines liposolubles après 270 jours de stockage à 45°C :

a) 56 % H. R. et b) 100 % H. R.

**Tableau XVIII - Concentrations en vitamine E ( $\mu\text{g}$  / g de boisson en poudre) au cours des 270 jours de stockage**

Temps (jours)	Température	Humidité relative	
		56%	100%
0	-	420	420
1	23°C	387,1 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	384,0 $\pm$ 9 <sup>a</sup>
	45°C	392,6 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	389,5 $\pm$ 9 <sup>a</sup>
15	23°C	386,33 $\pm$ 5,39 <sup>a</sup>	384,36 $\pm$ 5,12 <sup>a</sup>
	45°C	385,51 $\pm$ 4,72 <sup>a</sup>	386,58 $\pm$ 6,24 <sup>a</sup>
30	23°C	384,04 $\pm$ 19,93 <sup>a</sup>	382,34 $\pm$ 17,05 <sup>a</sup>
	45°C	380,16 $\pm$ 24,15 <sup>a</sup>	382,91 $\pm$ 5,82 <sup>a</sup>
60	23°C	380,78 $\pm$ 5,70 <sup>a</sup>	379,03 $\pm$ 3,70 <sup>a</sup>
	45°C	371,30 $\pm$ 35,74 <sup>a</sup>	379,10 $\pm$ 5,99 <sup>a</sup>
90	23°C	378,30 $\pm$ 6,34 <sup>a</sup>	376,54 $\pm$ 4,19 <sup>a</sup>
	45°C	359,95 $\pm$ 34,20 <sup>a</sup>	376,67 $\pm$ 10,71 <sup>a</sup>
120	23°C	375,89 $\pm$ 34,53 <sup>a</sup>	374,37 $\pm$ 23,31 <sup>a</sup>
	45°C	357,63 $\pm$ 33,50 <sup>a</sup>	373,07 $\pm$ 16,49 <sup>a</sup>
150	23°C	374,99 $\pm$ 7,04 <sup>a</sup>	371,98 $\pm$ 18,00 <sup>a</sup>
	45°C	352,1 $\pm$ 16,36 <sup>a</sup>	362,37 $\pm$ 13,51 <sup>a</sup>
180	23°C	374,25 $\pm$ 12,50 <sup>a</sup>	368,89 $\pm$ 21,91 <sup>a</sup>
	45°C	349,3 $\pm$ 15,22 <sup>*a</sup>	348,45 $\pm$ 18,67 <sup>a</sup>
210	23°C	372,35 $\pm$ 1,46 <sup>a</sup>	369,30 $\pm$ 1,10 <sup>a</sup>
	45°C	342,26 $\pm$ 1,22 <sup>*a</sup>	332,82 $\pm$ 1,96 <sup>a</sup>
240	23°C	369,37 $\pm$ 2,32 <sup>a</sup>	364,74 $\pm$ 3,11 <sup>a</sup>
	45°C	336,62 $\pm$ 1,26 <sup>*a</sup>	326,98 $\pm$ 2,10 <sup>a</sup>
270	23°C	365,39 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	359,87 $\pm$ 2,24 <sup>a</sup>
	45°C	329,32 $\pm$ 1,61 <sup>*a</sup>	309,03 $\pm$ 2,38 <sup>a</sup>

\* Pour un même niveau d'humidité relative et pour un même temps, la différence entre les températures (23°C et 45°C) est significative ( $p \leq 0,05$ )

<sup>a, b</sup> Pour une même température et pour un même temps, la différence entre les niveaux d'humidité relative (56% et 100%) est significative ( $p \leq 0,05$ )



**Tableau XIX - Concentrations en provitamine A ( $\mu\text{g}$  / g de boisson en poudre) au cours des 270 jours de stockage**

Temps (jours)	Température	Humidité relative	
		56%	100%
0	-	21	21
1	23°C	18,4 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	19,3 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
	45°C	19,1 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	18,7 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
15	23°C	18,11 $\pm$ 2,29 <sup>a</sup>	18,81 $\pm$ 0,83 <sup>a</sup>
	45°C	18,77 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	17,59 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>
30	23°C	18,40 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>	18,44 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup>
	45°C	18,41 $\pm$ 1,28 <sup>a</sup>	16,24 $\pm$ 1,15 <sup>b</sup>
60	23°C	17,93 $\pm$ 0,72 <sup>a</sup>	18,21 $\pm$ 0,97 <sup>a</sup>
	45°C	17,56 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>	12,88 $\pm$ 1,12 <sup>*b</sup>
90	23°C	17,60 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	17,52 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>
	45°C	14,73 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>	9,36 $\pm$ 0,63 <sup>*b</sup>
120	23°C	17,08 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	17,12 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>
	45°C	12,36 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>	7,85 $\pm$ 0,34 <sup>*b</sup>
150	23°C	17,13 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	16,8 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>
	45°C	11,05 $\pm$ 0,11 <sup>*a</sup>	6,41 $\pm$ 0,25 <sup>*b</sup>
180	23°C	16,83 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	15,96 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>
	45°C	9,75 $\pm$ 0,26 <sup>*a</sup>	5,19 $\pm$ 0,29 <sup>*b</sup>
210	23°C	16,24 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	15,37 $\pm$ 0,72 <sup>a</sup>
	45°C	8,59 $\pm$ 0,33 <sup>*a</sup>	5,29 $\pm$ 0,73 <sup>*b</sup>
240	23°C	15,66 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	15,03 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>
	45°C	7,03 $\pm$ 0,34 <sup>*a</sup>	4,61 $\pm$ 0,48 <sup>*b</sup>
270	23°C	14,42 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	15,46 $\pm$ 0,99 <sup>a</sup>
	45°C	6,41 $\pm$ 0,35 <sup>*a</sup>	3,93 $\pm$ 0,38 <sup>*b</sup>

\* Pour un même niveau d'humidité relative et pour un même temps, la différence entre les températures (23°C et 45°C) est significative ( $p \leq 0,05$ )

<sup>a, b</sup> Pour une même température et pour un même temps, la différence entre les niveaux d'humidité relative (56% et 100%) est significative ( $p \leq 0,05$ )

## 2.3. Minéraux

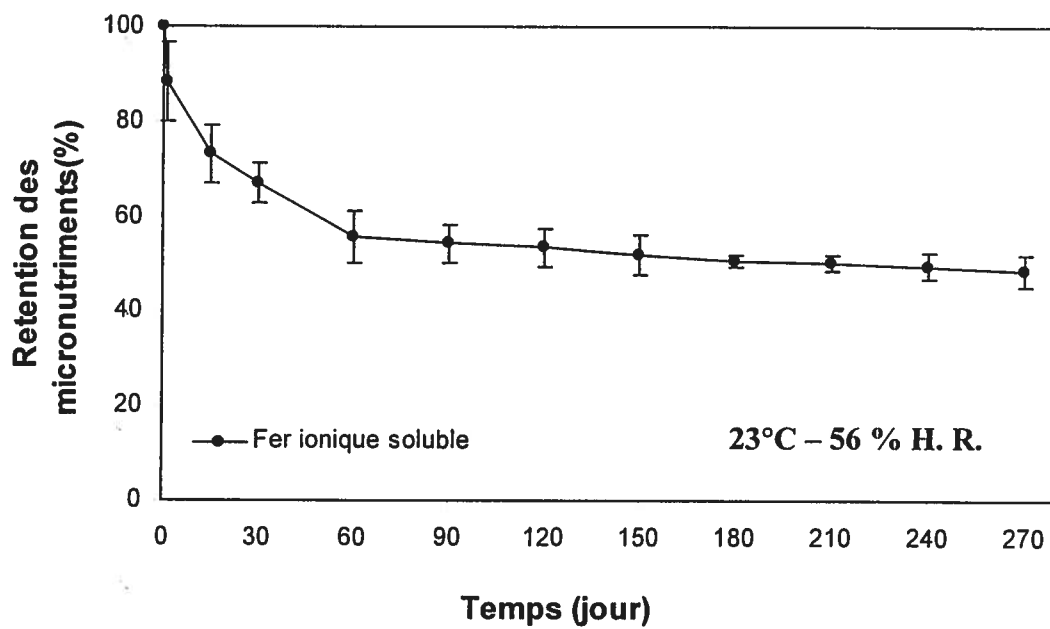
### 2.3.1. Le fer (*citrate d'ammonium ferrique*)

La concentration en fer soluble a diminuée régulièrement au cours des 270 jours de stockage, surtout dans les conditions élevées de température et d'humidité relative (figures 16 et 17). Du jour 1 au jour 270, des pourcentages de perte en fer soluble de 51,42 % et 69,26 % ont été mesurés, respectivement à 56 % et 100 % d'humidité relative pour les échantillons stockés à 23°C. De 216,00 µg / g de poudre, la concentration en fer soluble a chuté à  $104,93 \pm 7,15$  µg / g de poudre à 56 % d'humidité relative et à  $80,57 \pm 8,67$  µg / g de poudre à 100 % d'humidité relative. Durant cette même période et pour les sachets stockés à 45°C, les pourcentages de perte enregistrés étaient 62,70 % à 56 % H. R. et de 75,90 % à 100 % H. R. représentant des concentrations de  $66,39 \pm 6,09$  µg / g de poudre et de  $52,05 \pm 9,64$  µg / g de poudre, respectivement.

Les analyses statistiques, présentées dans le tableau XX, démontrent que la température affecte ( $p \leq 0,05$ ) la concentration en fer soluble à partir du jour 15 pour les échantillons entreposés à 56 % d'humidité relative. Au jour 15, des concentrations de  $157,87 \pm 13,14$  µg / g de poudre à 23°C vs.  $149,08 \pm 15,82$  µg / g de poudre à 45°C ont été mesurées à 56 % H. R. La température affecte ( $p \leq 0,05$ ) la concentration en fer soluble à partir du jour 30 pour les échantillons entreposés à 100 % d'humidité relative. Les concentrations observées étaient alors de  $102,04 \pm 13,50$  µg / g de poudre à 23°C vs.  $100,41 \pm 12,69$  µg / g de poudre à 45°C.

Les différences de concentrations en fer soluble observées pour une même température et à des degrés d'humidité relative différents sont significatives ( $p \leq 0,05$ ) à partir du jour 15 pour les échantillons entreposés à 23°C et à partir du jour 30 pour ceux entreposés à 45°C. Au jour 15, des concentrations en fer de  $157,87 \pm 13,14$  µg / g de poudre à 56 % H. R. vs.  $136,19 \pm 6,81$  µg / g de poudre à 100 % H. R. ont été observées pour les échantillons stockés à 23°C. Pour ceux stockés à 45°C, des concentrations de  $149,08 \pm 15,82$  µg / g de poudre à 56 % H. R. vs.  $134,76 \pm 14,00$  µg / g de poudre à 100 % H. R. ont été mesurées après 30 jours d'entreposage.

a)



b)

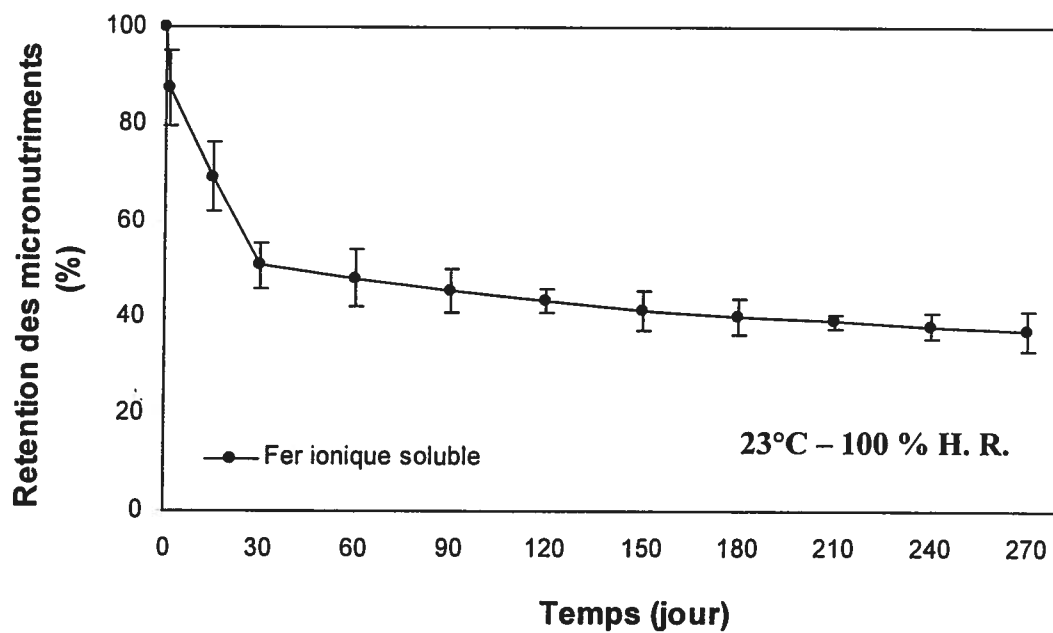
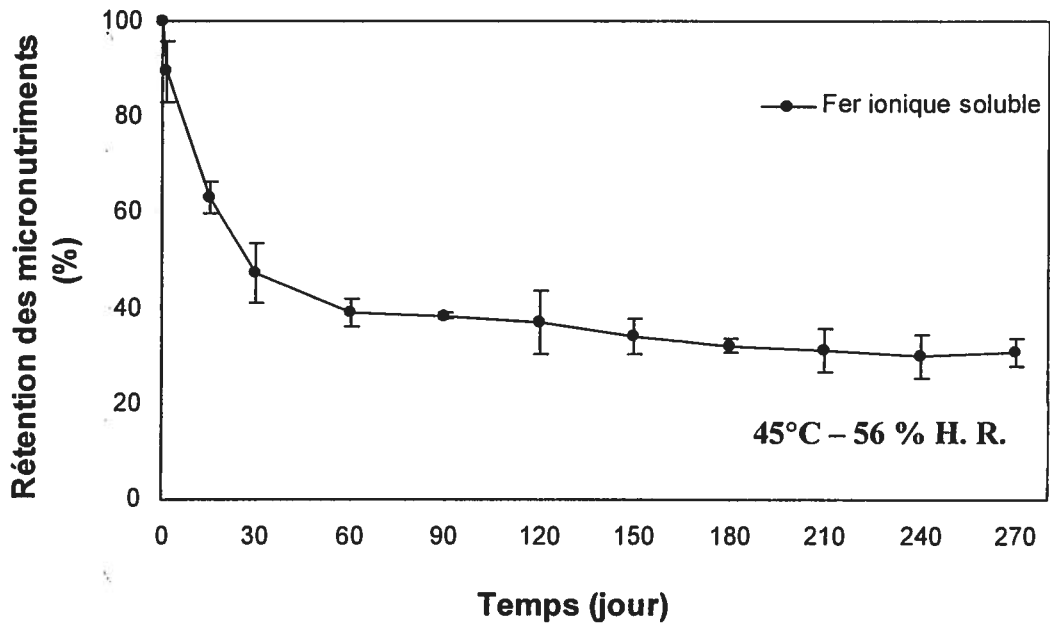


Figure 16 - Stabilité des minéraux après 270 jours de stockage à 23°C : a) 56 % H. R. et b) 100 % H. R.

a)



b)

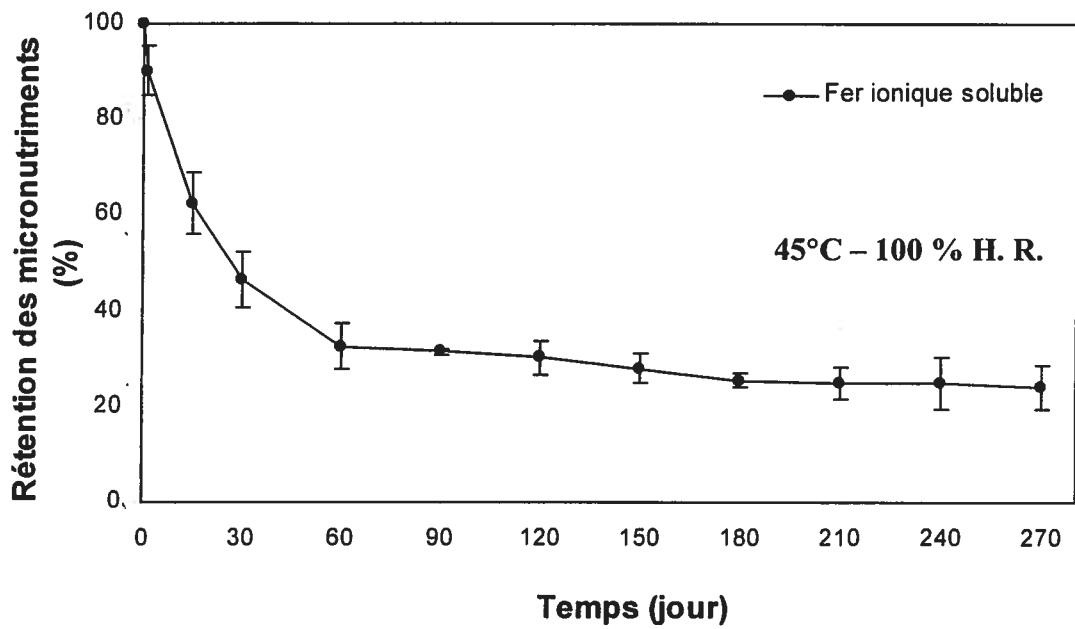


Figure 17 - Stabilité des minéraux après 270 jours de stockage à 45°C : a) 56 % H. R. et b) 100 % H. R.

### 3. ENCAPSULATION DES MICRONUTRIMENTS

#### 3.1. Caractérisation des billes

Quatre types de billes ont été préparés (tel que décrit page 41). Les billes sont de forme sphérique. Elles ont un aspect gélatineux et mesurent environ 2 mm de diamètre. Une photographie des billes est présentée à la figure 18. Au cours du séchage, les billes deviennent relativement rigides. Le nom des billes a été donné en fonction de la substance du cœur de la bille. Différentes propriétés physico-chimiques des billes ont été mesurées et les propriétés du cœur des billes ont été comparées deux à deux pour étudier l'effet de la nature du polymère (alginate, recette n° 1 vs. chitosane recette n° 3 et alginate fonctionnalisé, recette n° 2 vs. chitosane fonctionnalisé, recette n° 4).

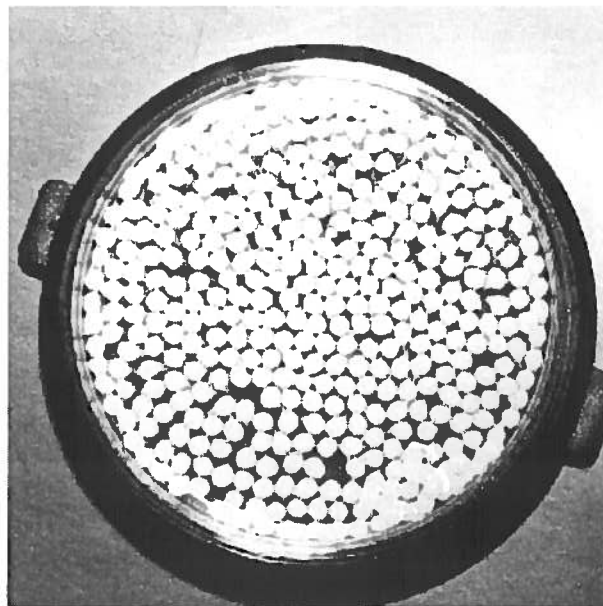
##### 3.1.1. Force à la rupture

La force à la rupture correspond à la force qu'il faut appliquer pour casser la bille. La force à la rupture permet donc de déterminer la résistance mécanique de la bille: plus la bille est résistante, plus la force est élevée. Les résultats de l'étude de la force à la rupture sur les quatre types de billes sont présentés à la figure 19 et au tableau XXII correspondant.

Les résultats montrent que les billes à base de chitosane présentent une force à la rupture plus élevée, donc une meilleure résistance mécanique, que les billes à base d'alginate. En effet, les forces à la rupture mesurées pour les billes de chitosane étaient de  $4561 \pm 191 \text{ N} \times \text{m}^{-2}$  et  $4589 \pm 164 \text{ N} \times \text{m}^{-2}$ , respectivement pour le chitosane non fonctionnalisé et fonctionnalisé. Les forces à la rupture enregistrées pour les billes à base d'alginate étaient de  $2058 \pm 156 \text{ N} \times \text{m}^{-2}$  et  $2062 \pm 200 \text{ N} \times \text{m}^{-2}$ , respectivement pour l'alginate non fonctionnalisé et fonctionnalisé. La nature du polymère (alginate ou chitosane) affecte significativement ( $p \leq 0,05$ ) les valeurs de la force à la rupture observées.

La fonctionnalisation des polymères n'entraîne pas d'amélioration significative ( $p > 0,05$ ) de la force à la rupture. Les billes à base d'alginate ont des valeurs de force à la

rupture de  $2058 \pm 156 \text{ N} \times \text{m}^{-2}$  (pour les billes non fonctionnalisées) et  $2062 \pm 200 \text{ N} \times \text{m}^{-2}$  (pour les billes fonctionnalisées). Dans les cas des billes à base de chitosane, les valeurs étaient de  $4561 \pm 191 \text{ N} \times \text{m}^{-2}$  (pour les billes non fonctionnalisées) et  $4589 \pm 164 \text{ N} \times \text{m}^{-2}$  (pour les billes fonctionnalisées)



—  
1 cm

**Figure 18 – Photographie des billes**

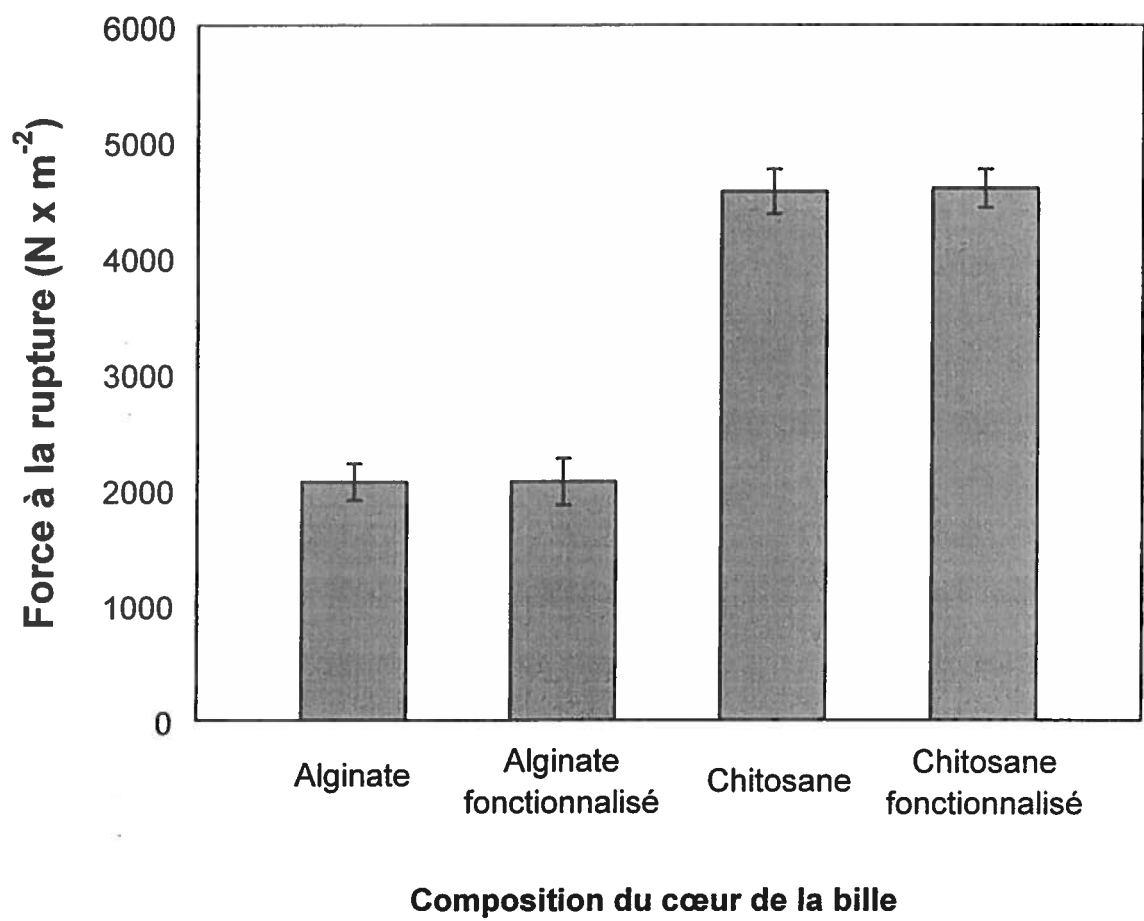


Figure 19 – Force à la rupture des billes

**Tableau XXII - Force à la rupture des billes**

Recette n°	Composition du cœur de la bille	Force à la rupture (N x m <sup>-2</sup> )
1	Alginate	2058 ± 156 <sup>a</sup>
3	Chitosane	4561 ± 191 <sup>b</sup>
2	Alginate fonctionnalisé	2062 ± 200 <sup>a</sup>
4	Chitosane fonctionnalisé	4589 ± 164 <sup>b</sup>

<sup>a et b</sup>. Une moyenne suivie d'une lettre différente est significativement différente ( $p \leq 0,05$ )



### 3.1.2. *Déformation à la rupture*

La déformation à la rupture représente la déformation maximale que peut subir la bille avant de se rompre. C'est donc, comme la force à la rupture, une mesure de la résistance mécanique de la bille. Les propriétés de déformation à la rupture des quatre types de bille sont résumées dans la figure 20 et le tableau XXIII.

Les résultats montrent que les billes à base d'alginate non fonctionnalisées et fonctionnalisées ont des valeurs de déformation à la rupture respectives de  $1,64 \pm 0,01$  mm et  $1,59 \pm 0,02$  mm. Dans les cas des billes à base de chitosane, les valeurs étaient de  $1,64 \pm 0,02$  mm et  $1,55 \pm 0,01$  mm respectivement pour les billes non fonctionnalisées et fonctionnalisées. La nature du polymère n'influe pas de manière significative ( $p > 0,05$ ) sur les valeurs de déformation à la rupture.

La fonctionnalisation des polymères affecte très significativement ( $p \leq 0,05$ ) les valeurs de déformation à la rupture enregistrées. En effet, la fonctionnalisation des polymères a engendré une diminution de la déformation à la rupture de 0,5 mm dans le cas des billes à base d'alginate et de 0,9 mm dans le cas des billes à base de chitosane.

### 3.1.3. *Viscoélasticité (coefficient de relaxation)*

La viscoélasticité de la bille est la réponse mécanique de la bille face à une pression mécanique. Plus la valeur est proche de 0 et plus la bille est souple. Les résultats de l'étude de la viscoélasticité des quatre types de billes sont présentés dans la figure 21 et le tableau XXIV.

Les résultats présentent une meilleure viscoélasticité des billes à base de chitosane que celles à base d'alginate. Des coefficients de relaxation de  $0,56 \pm 0,05$  et  $0,62 \pm 0,03$  ont été enregistrés pour le chitosane contre  $0,78 \pm 0,03$  et  $0,85 \pm 0,03$  pour l'alginate. La

nature du polymère utilisé dans la fabrication des billes affecte significativement la viscoélasticité de celles-ci.

Les billes à base d'alginate fonctionnalisées ont une plus grande viscoélasticité que celles à base d'alginate non fonctionnalisées. Les coefficients de relaxation mesurés sont respectivement de  $0,85 \pm 0,03$  et  $0,78 \pm 0,03$ . La fonctionnalisation des polymères a donc apporté une amélioration significative ( $p \leq 0,05$ ) sur la viscoélasticité des billes à base d'alginate. Pour les billes à base de chitosane, les écarts type élevés ne permettent pas de mettre en évidence l'importance de la fonctionnalisation des polymères sur la viscoélasticité des billes.

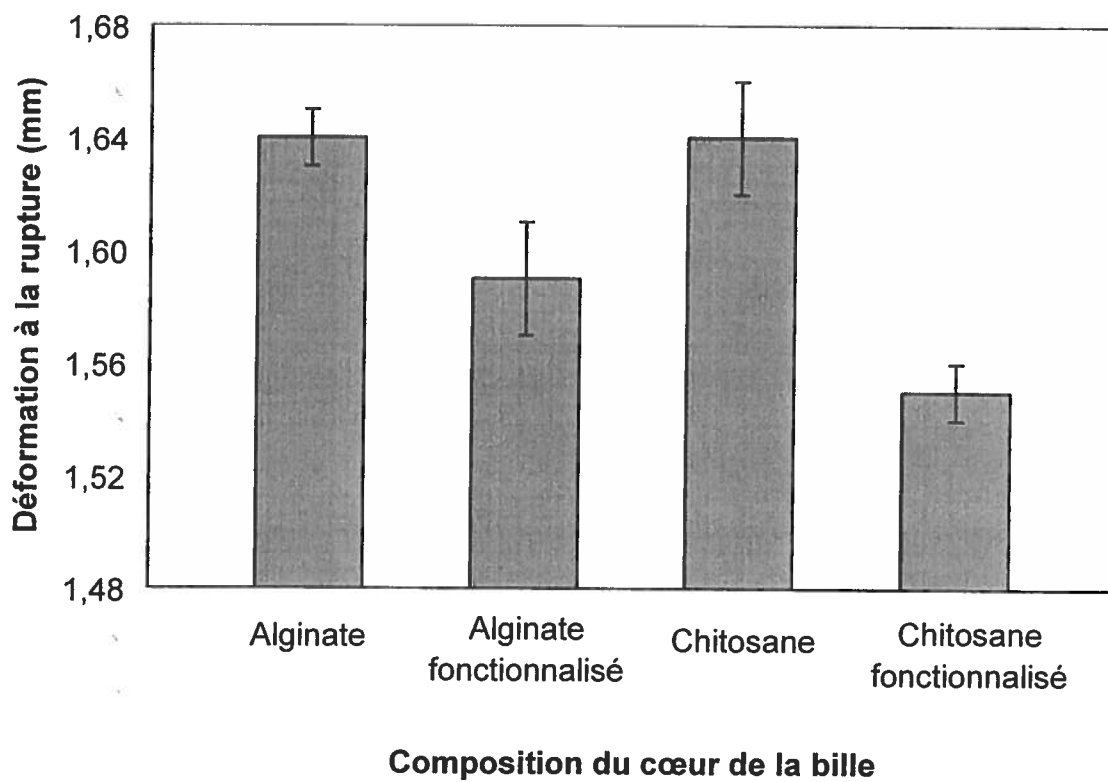


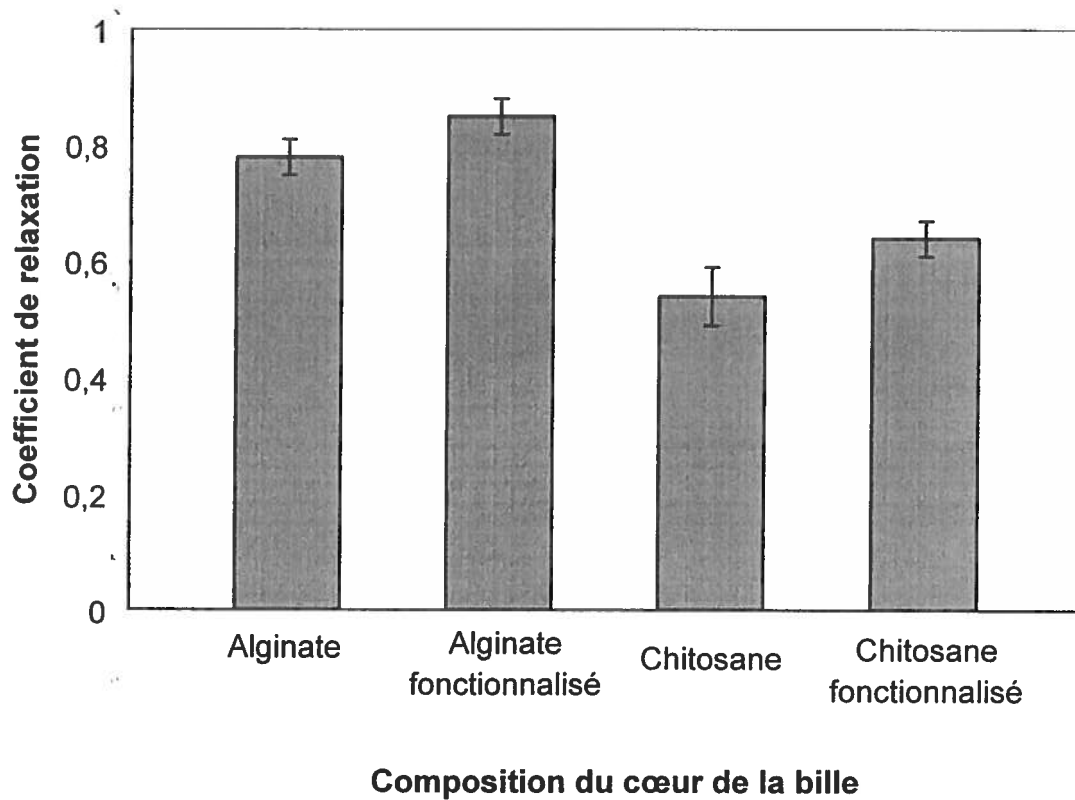
Figure 20- Déformation à la rupture des billes

**Tableau XXIII - Déformation à la rupture des billes**

Recette n°	Composition du cœur de la bille	Déformation à la rupture (mm)
1	Alginate	1,64 ± 0,01 <sup>a</sup>
3	Chitosane	1,64 ± 0,02 <sup>a</sup>
2	Alginate fonctionnalisé	1,59 ± 0,02 <sup>a*</sup>
4	Chitosane fonctionnalisé	1,55 ± 0,01 <sup>a*</sup>

<sup>a et b.</sup> Une moyenne suivie d'une lettre différente est significativement différente ( $p \leq 0,05$ )

\* Pour un même type de polymère, l'astérisque indique un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la fonctionnalisation.



**Figure 21 – Viscoélasticité (coefficient de relaxation) des billes**

**Tableau XXIV - Viscoélasticité (coefficient de relaxation) des billes**

<b>Recette n°</b>	<b>Composition du cœur de la bille</b>	<b>Viscoélasticité</b>
1	Alginate	$0,78 \pm 0,03^a$
3	Chitosane	$0,56 \pm 0,05^b$
2	Alginate fonctionnalisé	$0,85 \pm 0,03^{a*}$
4	Chitosane fonctionnalisé	$0,62 \pm 0,03^b$

<sup>a et b.</sup> Une moyenne suivie d'une lettre différente est significativement différente ( $p \leq 0,05$ )

\* Pour un même type de polymère, l'astérisque indique un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la fonctionnalisation.

### **3.1.4. Perméabilité à la vapeur d'eau**

La figure 22 et le tableau XXV représentent les résultats de l'étude de la perméabilité à la vapeur d'eau sur les films correspondant aux quatre types de billes.

Les résultats montrent que les films à base de chitosane présentent une moins grande perméabilité à la vapeur d'eau que les films à base d'alginate. La perméabilité des films d'alginate est de  $25,18 \pm 1,85 \text{ g} \times \text{mm} \times \text{m}^2/\text{mmHg}$  comparativement à  $9,31 \pm 0,96 \text{ g} \times \text{mm} \times \text{m}^2/\text{mmHg}$  pour les films de chitosane. La nature du polymère influence donc de manière significative les valeurs de la perméabilité des films à la vapeur d'eau.

La fonctionnalisation des polymères permet de diminuer significativement ( $p \leq 0,05$ ) la perméabilité des films à la vapeur d'eau. Dans le cas des films à base d'alginate, la perméabilité à la vapeur d'eau après 24 heures est de  $25,18 \pm 1,85 \text{ g} \times \text{mm} \times \text{m}^2/\text{mmHg}$  lorsque le polymère n'est pas fonctionnalisé contre  $21,13 \pm 1,63 \text{ g} \times \text{mm} \times \text{m}^2/\text{mmHg}$  lorsqu'il est fonctionnalisé. Pour les films à base de chitosane, la perméabilité à la vapeur d'eau après 24 heures diminue de  $9,31 \pm 0,96 \text{ g} \times \text{mm} \times \text{m}^2/\text{mmHg}$  à  $7,61 \pm 0,56 \text{ g} \times \text{mm} \times \text{m}^2/\text{mmHg}$  lorsque le polymère est fonctionnalisé.

### **3.1.5. Gonflement**

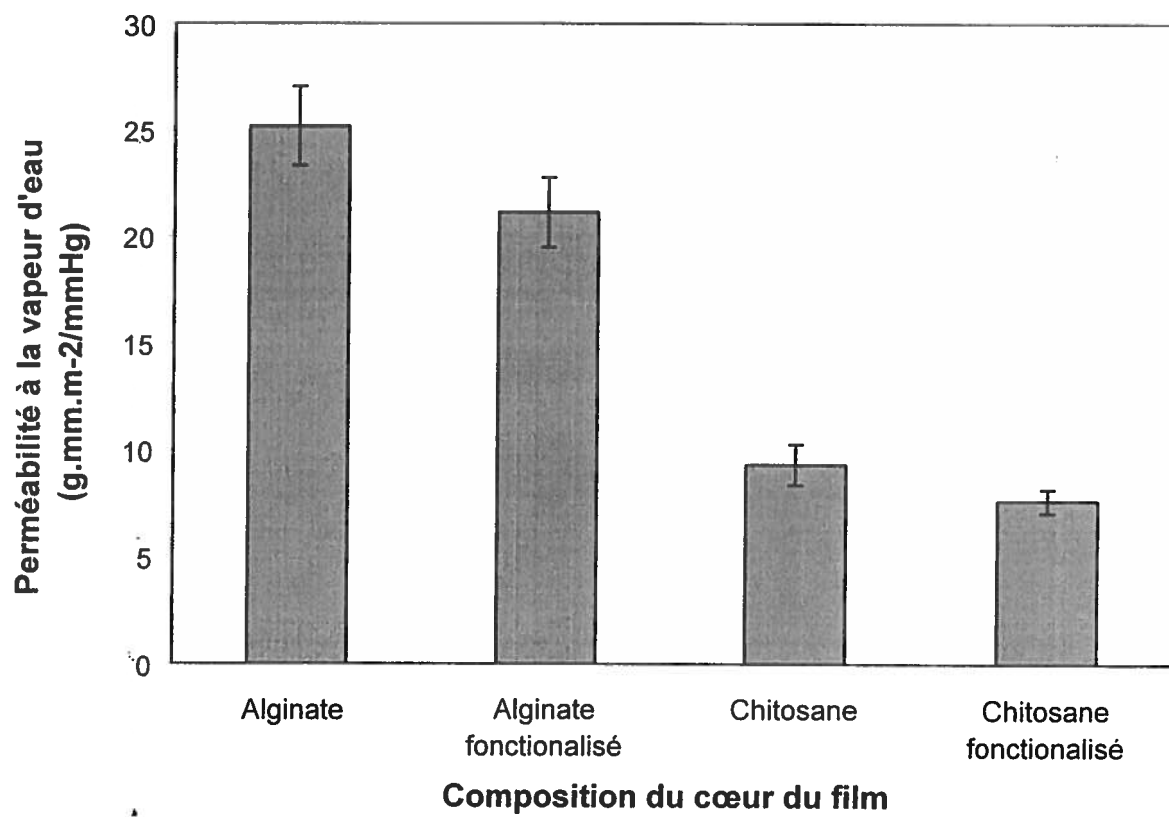
Le test de gonflement permet d'évaluer la cinétique d'absorption de l'eau par les billes (le gonflement) et ces résultats sont présentés à la figure 23 et au tableau XXVI. Un gonflement de 100 % correspond à un doublement de volume de la bille.

Les résultats obtenus montrent que les billes à base d'alginate ont absorbés moins d'eau que celles à base de chitosane. En effet, après 48 heures, le pourcentage de gonflement des billes à base d'alginate était respectivement de  $76.57 \pm 5.77 \%$  comparativement à  $126.67 \pm 5.77 \%$ , donc le volume de la bille a plus que doublé. La

figure 23 montre également que les billes à base d'alginate atteignent plus vite leur valeur quasi maximale de gonflement (après environ 3 heures de trempage) que celles à base de chitosane (après environ 6 heures de trempage). Les résultats démontrent que la nature du polymère influence donc significativement ( $p \leq 0.05$ ) le gonflement des billes.

Comme observé sur les certaines autres propriétés rhéologiques des billes, la fonctionnalisation permet d'améliorer de manière significative ( $p \leq 0.05$ ) la cinétique d'absorption de l'eau par les billes. La fonctionnalisation a permis de réduire de 76,67 % à 60 % le taux d'absorption d'eau des billes à base d'alginate en 48 heures. Dans le cas des billes à base de chitosane, l'amélioration est plus importante : une augmentation du volume de 126,67 % a été enregistrée pour le polymère non fonctionnalisé (recette n°3), contre 96.67 % pour le polymère fonctionnalisé (recette n°4) en 24 heures. L'évolution du gonflement des billes au cours du temps est constant.





**Figure 22 – Perméabilité à la vapeur d'eau après 24 heures**

**Tableau XXV - Perméabilité à la vapeur d'eau après 24 heures**

Type de bille	Perméabilité à la vapeur d'eau (g.mm.m- 2/mmHg)
Alginate	25.18 ± 1.85 <sup>a</sup>
Alginate fonctionnalisé	21.13 ± 1.63 <sup>a*</sup>
Chitosane	9.31 ± 0.96 <sup>b</sup>
Chitosane fonctionnalisé	7.61 ± 0.56 <sup>b*</sup>

<sup>a</sup> et <sup>b</sup>. Pour un même type de traitement (non fonctionnalisé ou fonctionnalisé), les lettres différentes indiquent un effet significatif ( $p \leq 0.05$ ) de la nature du polymère.

\* Pour un même type de polymère, l'astérisque indique un effet significatif ( $p \leq 0.05$ ) de la fonctionnalisation.

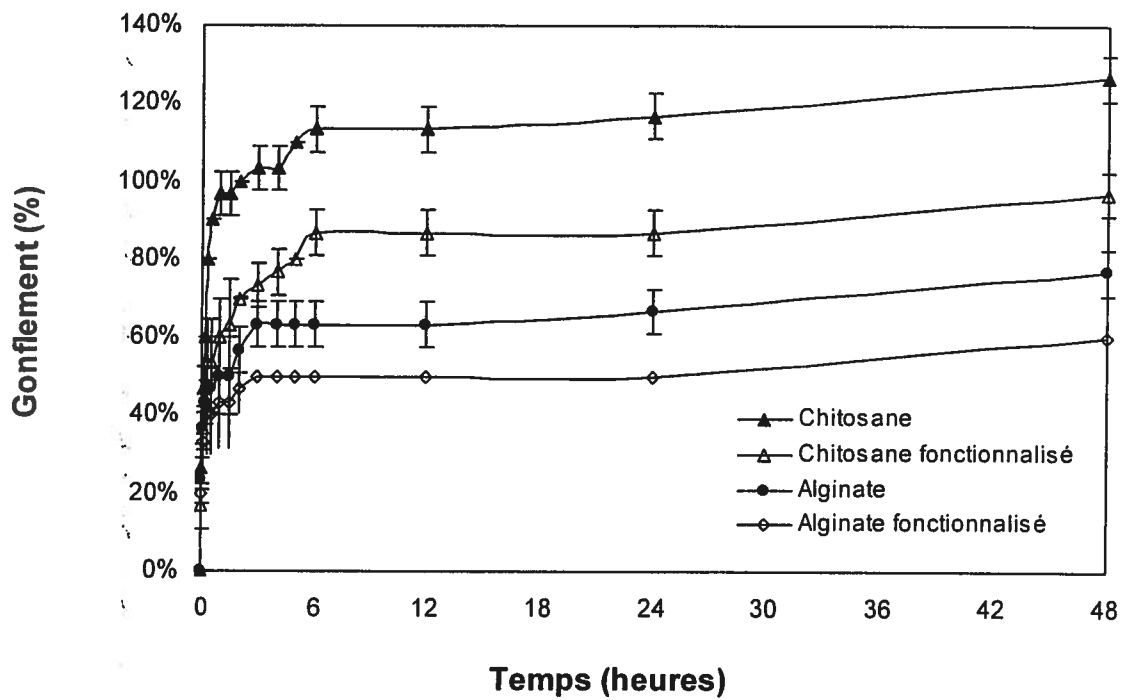


Figure 23 – Cinétique d'absorption de l'eau par les billes

**Tableau XXVI – Étude du gonflement : augmentation du volume des billes en fonction du temps (en %)**

Temps	Type de billes			
	Alginate	Alginate fonctionnalisé	Chitosane	Chitosane fonctionnalisé
0	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
1 min.	23,33 ± 5,77 <sup>a</sup>	20,00 ± 10,00 <sup>a</sup>	26,67 ± 5,77 <sup>a</sup>	16,67 ± 5,77 <sup>a</sup>
5 min.	36,67 ± 5,77 <sup>a</sup>	33,33 ± 5,77 <sup>a</sup>	46,67 ± 5,77 <sup>a</sup>	36,67 ± 5,77 <sup>a</sup>
10 min.	43,33 ± 5,77 <sup>a</sup>	43,33 ± 5,77 <sup>a</sup>	60,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	46,67 ± 5,77 <sup>a*</sup>
20 min.	46,67 ± 5,77 <sup>a</sup>	40,00 ± 10,00 <sup>a</sup>	80,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	53,33 ± 11,55 <sup>a*</sup>
30 min.	46,67 ± 5,77 <sup>a</sup>	40,00 ± 10,00 <sup>a</sup>	90,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	53,33 ± 11,55 <sup>a*</sup>
1 heure	50,00 ± 10,00 <sup>a</sup>	43,33 ± 11,55 <sup>a</sup>	96,67 ± 5,77 <sup>b</sup>	60,00 ± 10,00 <sup>a*</sup>
1 heure 30	50,00 ± 10,00 <sup>a</sup>	43,33 ± 11,55 <sup>a</sup>	96,67 ± 5,77 <sup>b</sup>	63,33 ± 11,55 <sup>a*</sup>
2 heures	56,67 ± 5,77 <sup>a</sup>	46,67 ± 5,77 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	70,00 ± 0,00 <sup>b*</sup>
3 heures	63,33 ± 5,77 <sup>a</sup>	50,00 ± 0,00 <sup>a*</sup>	103,33 ± 5,77 <sup>b</sup>	73,33 ± 5,77 <sup>b*</sup>
4 heures	63,33 ± 5,77 <sup>a</sup>	50,00 ± 0,00 <sup>a*</sup>	103,33 ± 5,77 <sup>b</sup>	76,67 ± 5,77 <sup>b*</sup>
5 heures	63,33 ± 5,77 <sup>a</sup>	50,00 ± 0,00 <sup>a*</sup>	110,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	80,00 ± 0,00 <sup>b*</sup>
6 heures	63,33 ± 5,77 <sup>a</sup>	50,00 ± 0,00 <sup>a*</sup>	113,33 ± 5,77 <sup>b</sup>	86,67 ± 5,77 <sup>b*</sup>
12 heures	63,33 ± 5,77 <sup>a</sup>	50,00 ± 0,00 <sup>a*</sup>	113,33 ± 5,77 <sup>b</sup>	86,67 ± 5,77 <sup>b*</sup>
24 heures	66,67 ± 5,77 <sup>a</sup>	50,00 ± 0,00 <sup>a*</sup>	116,67 ± 5,77 <sup>b</sup>	86,67 ± 5,77 <sup>b*</sup>
48 heures	76,67 ± 5,77 <sup>a</sup>	60,00 ± 0,00 <sup>a*</sup>	126,67 ± 5,77 <sup>b</sup>	96,67 ± 5,77 <sup>b*</sup>

<sup>a</sup> et <sup>b</sup>. Pour un même type de modification (non fonctionnalisé ou fonctionnalisé), les lettres différentes indiquent un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la nature du polymère.

\* Pour un même type de polymère, l'astérisque indique un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la fonctionnalisation.

## 3.2. Stabilité des micronutriments encapsulés

### 3.2.1. Vitamine C

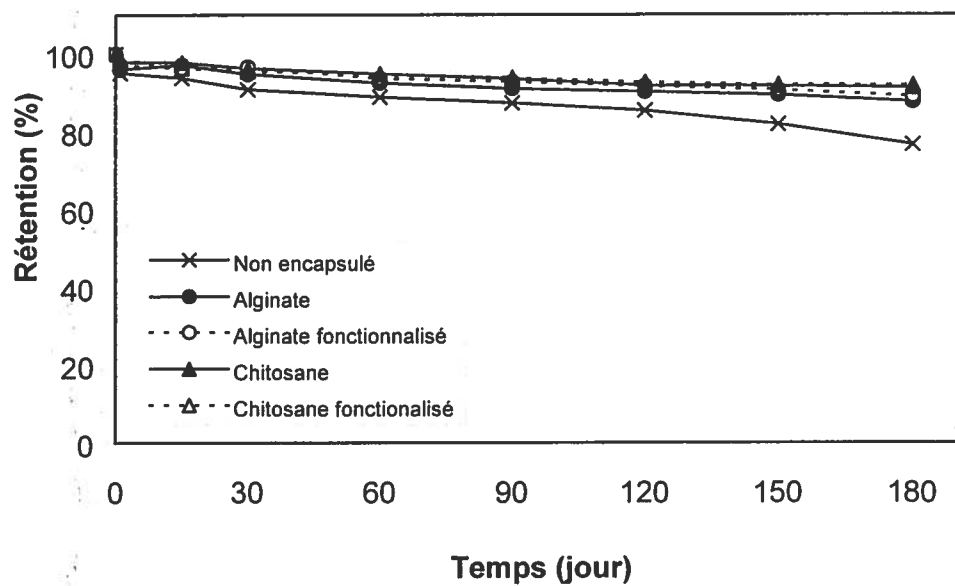
Les figures 24 et 25 (ainsi que les tableaux XXVII et XXVIII correspondant) montrent la stabilité de la vitamine C encapsulée après 6 mois de stockage à 23°C et 45°C respectivement.

La rétention de la vitamine C encapsulée est toujours supérieure à la rétention de la vitamine C libre au terme de l'expérience (soit 180 jours), quel que soit la température (23°C ou 45°C), l'humidité relative (56 % ou 100 %) et la nature du polymère (alginate, alginate fonctionnalisé, chitosane ou chitosane fonctionnalisé).

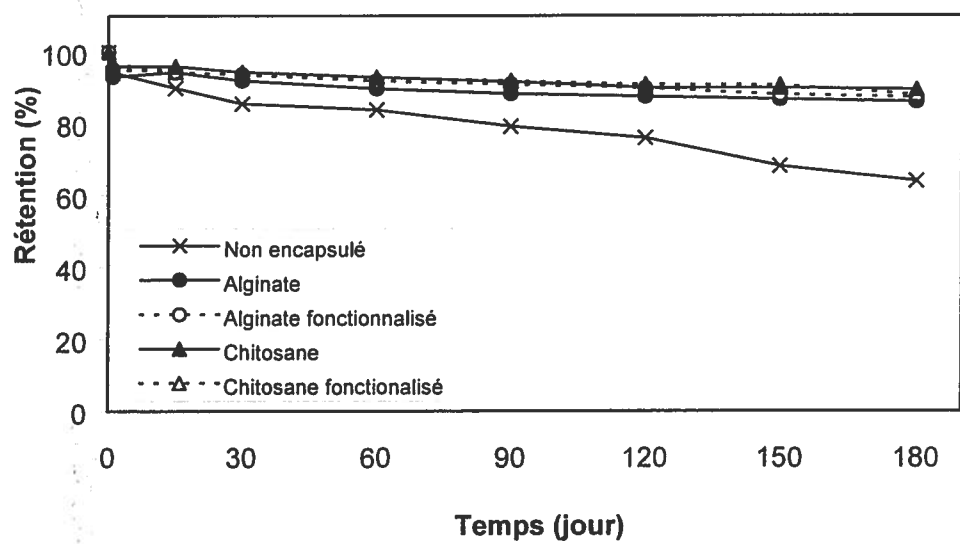
La température affecte ( $p \leq 0,05$ ) la rétention de la vitamine C dans les billes, mais dans une moindre mesure que dans le cas de la vitamine C non encapsulée. Par exemple, une diminution de la rétention en vitamine C de 87,69 % et 84,97 % a été enregistrée pour les billes d'alginate entreposées respectivement à 23°C et 45 °C, après 6 mois et à 56 % d'humidité relative. À titre de comparaison, des valeurs de 76,77 % et 33,34 % ont été mesurées, dans les mêmes conditions de stockage pour la vitamine C non encapsulées.

À 23°C, l'humidité relative n'affecte pas ( $p > 0,05$ ) le pourcentage de rétention de la vitamine C encapsulée contrairement à ce qui a été observé lors de l'étude de la stabilité de la vitamine C non encapsulée. En effet, après 6 mois d'entreposage à 23°C, une augmentation du degré d'humidité relative de 56 % à 100 %, entraîne une diminution de rétention de la vitamine C de 87,69 % à 86,06 % pour les billes à bases d'alginate. À 45°C, l'humidité relative affecte ( $p \leq 0,05$ ) le pourcentage de rétention de la vitamine C encapsulée. Par exemple, la rétention de la vitamine C dans les billes à base de chitosane diminue de 88,23 % à 84,89 % (à respectivement 56 % et 100 % d'humidité relative) après 6 mois d'entreposage et à 45°C.

a)



b)



**Figure 24 - Stabilité de la vitamine C encapsulée après 6 mois de stockage à 23°C : a) 56 % H. R. et b) 100 % H. R.**

**Tableau XXVII - Rétention de la vitamine C encapsulée dans les billes après 6 mois de stockage à 23°C**

<b>56 % H. R.</b>				
<b>Temps (jours)</b>	<b>Alginate</b>	<b>Alginate fonctionnalisé</b>	<b>Chitosane</b>	<b>Chitosane fonctionnalisé</b>
<b>0</b>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>1</b>	96,02 ± 0,69 <sup>a</sup>	97,15 ± 0,37 <sup>a</sup>	98,02 ± 1,51 <sup>a</sup>	98,70 ± 1,20 <sup>a</sup>
<b>15</b>	97,19 ± 0,98 <sup>a</sup>	96,33 ± 1,27 <sup>a</sup>	97,86 ± 1,38 <sup>a</sup>	96,34 ± 1,44 <sup>a</sup>
<b>30</b>	94,77 ± 0,57 <sup>a</sup>	96,58 ± 0,35 <sup>a</sup>	96,32 ± 0,83 <sup>b</sup>	95,61 ± 0,79 <sup>a</sup>
<b>60</b>	92,50 ± 0,77 <sup>a</sup>	93,74 ± 0,81 <sup>a</sup>	94,87 ± 0,54 <sup>b</sup>	94,76 ± 1,03 <sup>a</sup>
<b>90</b>	91,07 ± 0,61 <sup>a</sup>	92,84 ± 0,89 <sup>a</sup>	93,61 ± 0,71 <sup>b</sup>	93,85 ± 0,97 <sup>a</sup>
<b>120</b>	90,24 ± 0,38 <sup>a</sup>	91,69 ± 1,07 <sup>a</sup>	91,84 ± 0,90 <sup>b</sup>	92,66 ± 0,54 <sup>a</sup>
<b>150</b>	89,39 ± 0,62 <sup>a</sup>	90,71 ± 0,83 <sup>a</sup>	91,74 ± 0,95 <sup>b</sup>	92,01 ± 0,67 <sup>a</sup>
<b>180</b>	87,69 ± 1,04 <sup>a</sup>	89,08 ± 0,86 <sup>a</sup>	91,33 ± 0,57 <sup>b</sup>	91,95 ± 1,12 <sup>b</sup>
<b>100 % H. R.</b>				
<b>Temps (jours)</b>	<b>Alginate</b>	<b>Alginate fonctionnalisé</b>	<b>Chitosane</b>	<b>Chitosane fonctionnalisé</b>
<b>0</b>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>1</b>	93,14 ± 0,80 <sup>a</sup>	95,21 ± 1,02 <sup>a*</sup>	96,06 ± 0,79 <sup>b</sup>	96,72 ± 0,15 <sup>a</sup>
<b>15</b>	94,27 ± 0,58 <sup>a</sup>	94,40 ± 0,21 <sup>a</sup>	95,90 ± 0,67 <sup>a</sup>	94,41 ± 0,95 <sup>a</sup>
<b>30</b>	91,92 ± 0,48 <sup>a</sup>	93,64 ± 0,23 <sup>a*</sup>	94,39 ± 0,97 <sup>b</sup>	93,70 ± 0,78 <sup>a</sup>
<b>60</b>	89,72 ± 1,22 <sup>a</sup>	91,86 ± 0,47 <sup>a*</sup>	92,97 ± 1,04 <sup>b</sup>	92,87 ± 0,80 <sup>a</sup>
<b>90</b>	88,34 ± 0,43 <sup>a</sup>	90,98 ± 0,56 <sup>a*</sup>	91,74 ± 0,89 <sup>b</sup>	91,97 ± 0,77 <sup>a</sup>
<b>120</b>	87,53 ± 0,45 <sup>a</sup>	89,85 ± 0,76 <sup>a*</sup>	90,01 ± 0,78 <sup>b</sup>	90,91 ± 0,39 <sup>a</sup>
<b>150</b>	86,71 ± 0,94 <sup>a</sup>	88,09 ± 0,88 <sup>a</sup>	89,91 ± 0,56 <sup>b</sup>	90,71 ± 0,82 <sup>b</sup>
<b>180</b>	86,06 ± 0,61 <sup>a</sup>	87,30 ± 0,22 <sup>a</sup>	89,50 ± 0,90 <sup>b</sup>	88,11 ± 0,29 <sup>b*</sup>

<sup>a</sup> et <sup>b</sup>. Pour un même type de modification (non fonctionnalisé ou fonctionnalisé) et pour un temps donné, les lettres différentes indiquent un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la nature du polymère.

\* Pour un même type de polymère et pour un temps donné, l'astérisque indique un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la fonctionnalisation.

### 3.2.2. *Provitamine A*

Les figures 26 et 27 (ainsi que les tableaux XXIX et XXX correspondant) montrent la stabilité de la provitamine A encapsulée après 6 mois de stockage à 23°C et 45°C respectivement.

La rétention de la provitamine A encapsulée est toujours supérieure à la rétention de la provitamine A libre au terme de l'expérience (soit 180 jours), quelques soient la température (23°C ou 45°C), l'humidité relative (56 % ou 100 %) et la nature du polymère (alginate, alginate fonctionnalisé, chitosane ou chitosane fonctionnalisé).

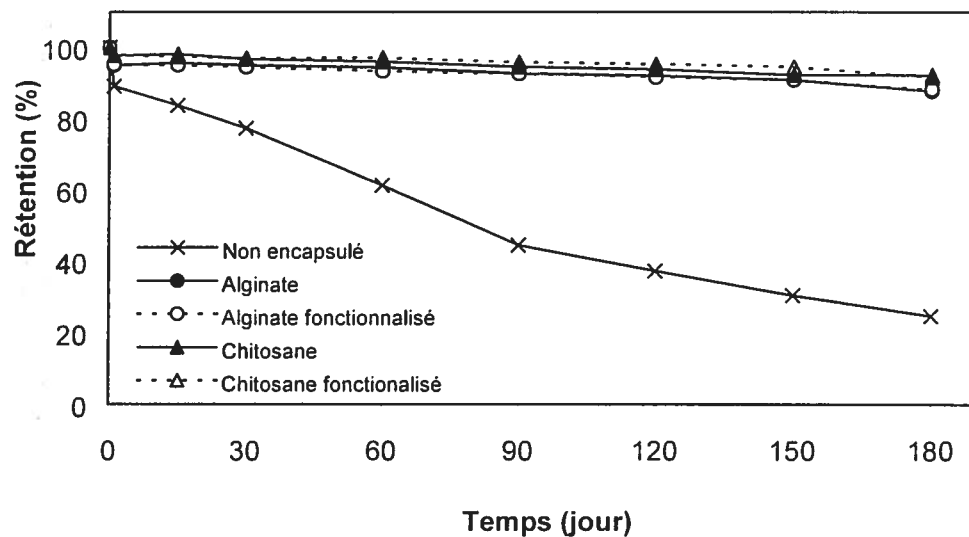
La température n'affecte pas ( $p > 0,05$ ) la rétention de la provitamine A dans les billes. Après 6 mois d'entreposage, des valeurs de rétention en provitamine A de 92,46 % et 92,50 % ont été enregistrées pour les billes de chitosane entreposées respectivement à 23°C et 45 °C, après 6 mois et à 56 % d'humidité relative.

Les résultats montrent qu'à 23°C, l'humidité relative affecte ( $p \leq 0,05$ ) le pourcentage de rétention de la provitamine A encapsulée. En effet, après 6 mois d'entreposage à 23°C, une augmentation du degré d'humidité relative de 56 % à 100 %, entraîne une diminution de rétention de la provitamine A de 92,07 % à 90,29 % pour les billes à bases de chitosane fonctionnalisé. À 45°C, l'humidité relative affecte également ( $p \leq 0,05$ ) le pourcentage de rétention de la provitamine A encapsulée. Par exemple, la rétention de la provitamine A dans les billes à base d'alginate diminue de 91,22 % à 87,72 % (à respectivement 56 % et 100 % d'humidité relative) après 6 mois d'entreposage et à 45°C.

La nature du polymère au cœur des billes (alginate ou chitosane) affecte ( $p \leq 0,05$ ) le pourcentage de rétention de la provitamine A au cours de l'entreposage, quelques soient les conditions de température, d'humidité relative et la fonctionnalisation ou non du polymère. En effet, les valeurs de rétention de la provitamine A obtenues pour les billes à base de chitosane sont supérieures à celles obtenues pour les billes à base



a)



b)

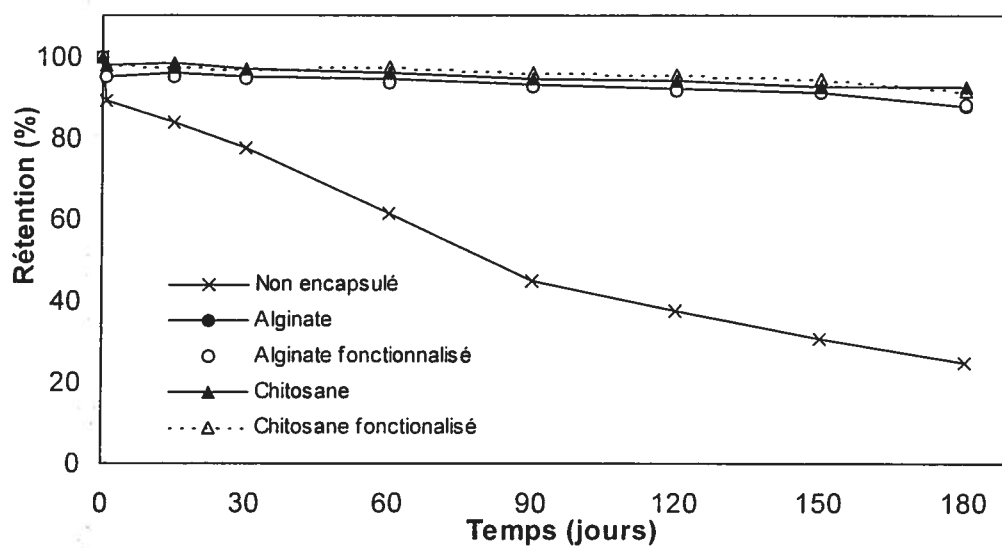


Figure 27 - Stabilité de la provitamine A encapsulée après 6 mois de stockage à 45°C : a) 56 % H. R. et b) 100 % H. R.

**Tableau XXIX - Rétention de la provitamine A encapsulée dans les billes au cours des 6 mois de stockage à 23°C**

<b>56 % H. R.</b>				
<b>Temps (jours)</b>	<b>Alginate</b>	<b>Alginate fonctionnalisé</b>	<b>Chitosane</b>	<b>Chitosane fonctionnalisé</b>
<b>0</b>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>1</b>	96,02 ± 0,68 <sup>a</sup>	96,21 ± 0,87 <sup>a</sup>	98,61 ± 0,55 <sup>b</sup>	97,67 ± 0,49 <sup>a*</sup>
<b>15</b>	95,97 ± 0,71 <sup>a</sup>	96,39 ± 0,67 <sup>a</sup>	98,25 ± 0,22 <sup>b</sup>	96,38 ± 0,91 <sup>a*</sup>
<b>30</b>	94,61 ± 0,30 <sup>a</sup>	95,08 ± 0,65 <sup>a</sup>	97,73 ± 0,54 <sup>b</sup>	96,81 ± 0,25 <sup>b*</sup>
<b>60</b>	94,27 ± 0,30 <sup>a</sup>	94,31 ± 0,47 <sup>a</sup>	96,15 ± 0,77 <sup>b</sup>	94,73 ± 0,26 <sup>a*</sup>
<b>90</b>	93,02 ± 1,89 <sup>a</sup>	92,86 ± 0,68 <sup>a</sup>	95,84 ± 0,03 <sup>b</sup>	93,55 ± 0,77 <sup>a*</sup>
<b>120</b>	91,67 ± 0,67 <sup>a</sup>	91,22 ± 0,96 <sup>a</sup>	94,99 ± 0,61 <sup>b</sup>	94,06 ± 0,20 <sup>b</sup>
<b>150</b>	91,82 ± 1,27 <sup>a</sup>	89,61 ± 0,63 <sup>a</sup>	93,28 ± 0,47 <sup>b</sup>	92,01 ± 0,88 <sup>b</sup>
<b>180</b>	89,36 ± 0,67 <sup>a</sup>	87,39 ± 0,62 <sup>a*</sup>	92,46 ± 0,88 <sup>b</sup>	90,29 ± 0,12 <sup>b*</sup>
<b>100 % H. R.</b>				
<b>Temps (jours)</b>	<b>Alginate</b>	<b>Alginate fonctionnalisé</b>	<b>Chitosane</b>	<b>Chitosane fonctionnalisé</b>
<b>0</b>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>1</b>	94,37 ± 0,92 <sup>a</sup>	94,53 ± 0,33 <sup>a</sup>	97,09 ± 0,96 <sup>b</sup>	97,21 ± 0,92 <sup>b</sup>
<b>15</b>	95,06 ± 0,28 <sup>a</sup>	94,41 ± 0,68 <sup>a</sup>	97,54 ± 0,87 <sup>b</sup>	96,87 ± 0,77 <sup>b</sup>
<b>30</b>	94,44 ± 0,62 <sup>a</sup>	93,88 ± 0,92 <sup>a</sup>	96,22 ± 0,47 <sup>b</sup>	96,46 ± 0,79 <sup>b</sup>
<b>60</b>	93,82 ± 1,05 <sup>a</sup>	92,76 ± 0,97 <sup>a</sup>	95,44 ± 0,72 <sup>b</sup>	96,57 ± 0,84 <sup>b</sup>
<b>90</b>	92,18 ± 1,37 <sup>a</sup>	92,10 ± 0,66 <sup>a</sup>	93,97 ± 0,09 <sup>b</sup>	95,33 ± 1,05 <sup>b*</sup>
<b>120</b>	91,57 ± 0,43 <sup>a</sup>	91,09 ± 0,63 <sup>a</sup>	92,31 ± 0,47 <sup>b</sup>	94,81 ± 0,36 <sup>b*</sup>
<b>150</b>	90,31 ± 0,49 <sup>a</sup>	90,30 ± 0,60 <sup>a</sup>	90,68 ± 0,62 <sup>a</sup>	93,99 ± 0,80 <sup>b*</sup>
<b>180</b>	90,16 ± 1,16 <sup>a</sup>	88,47 ± 0,62 <sup>a</sup>	91,43 ± 0,56 <sup>a</sup>	92,07 ± 0,43 <sup>b*</sup>

<sup>a</sup> et <sup>b</sup>. Pour un même type de modification (non fonctionnalisé ou fonctionnalisé), les lettres différentes indiquent un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la nature du polymère.

\* Pour un même type de polymère, l'astérisque indique un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la fonctionnalisation.

### 3.2.3. Fer ionique (fumarate de fer)

Les figures 28 et 29 (ainsi que les tableaux XXXI et XXXII correspondant) montrent la stabilité du fumarate de fer encapsulé après 6 mois de stockage à 23°C et 45°C respectivement.

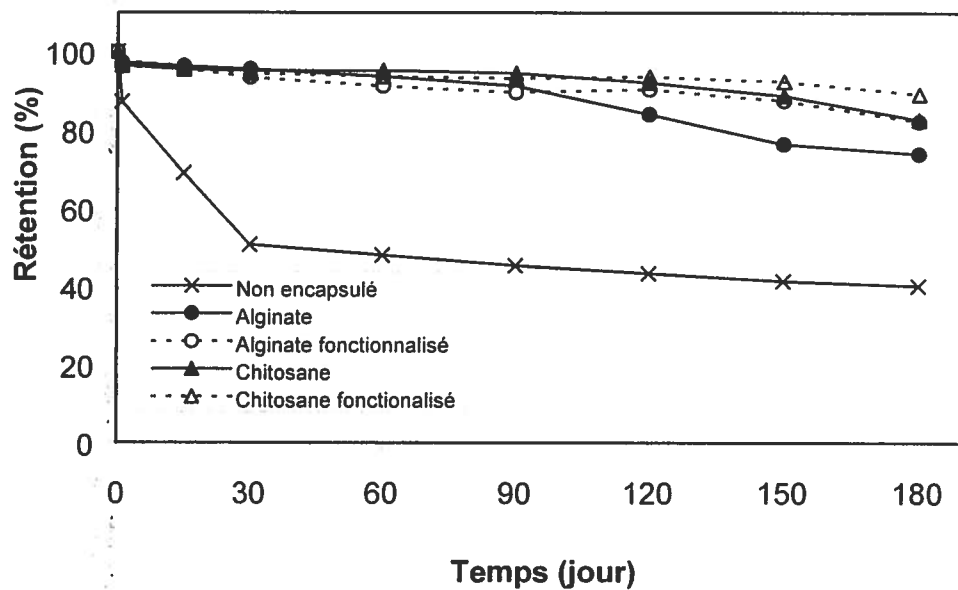
La rétention du fumarate de fer encapsulé est toujours supérieure à la rétention du fumarate de fer non encapsulé au terme de l'expérience (soit 180 jours), quel que soit la température (23°C ou 45°C), l'humidité relative (56 % ou 100 %) et la nature du polymère (alginate, alginate fonctionnalisé, chitosane ou chitosane fonctionnalisé).

Les résultats démontrent que la température affecte ( $p \leq 0,05$ ) la rétention du fumarate de fer dans les billes, mais dans une moindre mesure que pour le fumarate de fer non encapsulé. Une diminution de la rétention en fumarate de fer de 82,62 % à 71,04 % a été enregistrée pour les billes de chitosane pour une augmentation de la température de 23°C à 45 °C, après 6 mois et à 100 % d'humidité relative.

À 23°C, l'humidité relative affecte ( $p \leq 0,05$ ) le pourcentage de rétention de fumarate de fer encapsulé. En effet, après 6 mois d'entreposage à 23°C, une augmentation du degré d'humidité relative de 56 % à 100 %, entraîne une diminution de rétention du fumarate de fer de 91,83 % à 90,29 % pour les billes à bases de chitosane fonctionnalisé. À 45°C, l'humidité relative affecte également ( $p \leq 0,05$ ) le pourcentage de rétention du fumarate de fer encapsulé. Par exemple, la rétention du fumarate de fer dans les billes à base de chitosane diminue de 89,94 % à 71,04 % (à respectivement 56 % et 100 % d'humidité relative) après 6 mois d'entreposage et à 45°C.

Les valeurs de rétention du fumarate de fer obtenues pour les billes à base de chitosane sont supérieures à celles obtenues pour les billes à base d'alginate. Par exemple, les billes de chitosane permettent une rétention de 91,83 % du fumarate de fer, comparativement à 80,85 % pour les billes d'alginate, après 6 mois d'entreposage dans des conditions de température de 23°C et d'humidité relative de 56 %. Les résultats

a)



b)

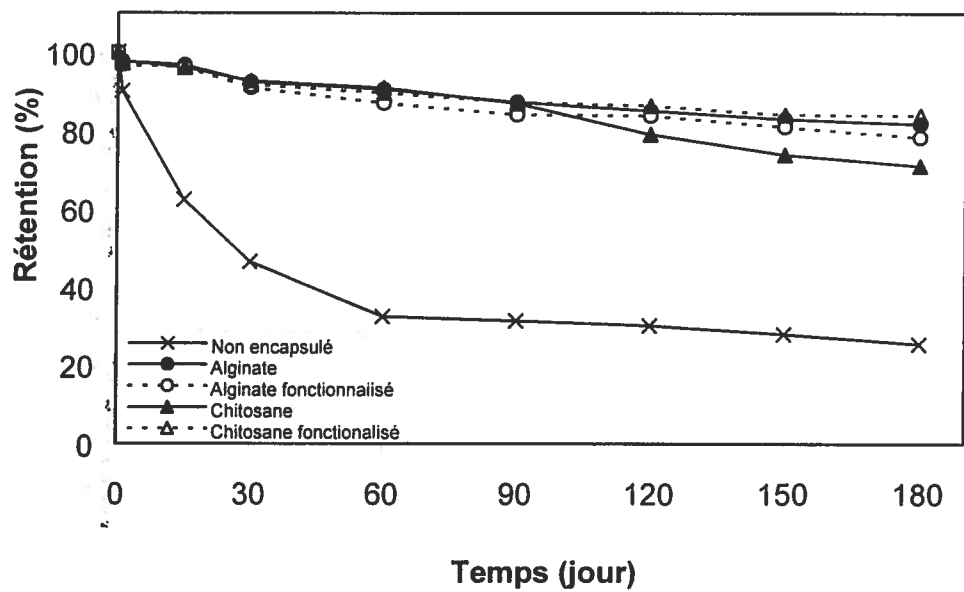


Figure 29 - Stabilité du fer ionique encapsulé après 6 mois de stockage à 45°C : a) 56 % H. R. et b) 100 % H. R.

**Tableau XXXI - Rétention du fer ionique encapsulé dans les billes au cours des 6 mois de stockage à 23°C**

<b>56 % H. R.</b>				
<b>Temps (jours)</b>	<b>Alginate</b>	<b>Alginate fonctionnalisé</b>	<b>Chitosane</b>	<b>Chitosane fonctionnalisé</b>
0	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
1	97,78 ± 0,69 <sup>a</sup>	100,93 ± 0,77 <sup>a*</sup>	98,94 ± 0,94 <sup>a</sup>	93,73 ± 0,58 <sup>b*</sup>
15	96,76 ± 0,47 <sup>a</sup>	100,43 ± 0,34 <sup>a*</sup>	98,89 ± 0,97 <sup>b</sup>	91,81 ± 0,29 <sup>b*</sup>
30	95,21 ± 0,91 <sup>a</sup>	99,97 ± 0,78 <sup>a*</sup>	98,17 ± 0,23 <sup>b</sup>	90,34 ± 0,11 <sup>b*</sup>
60	92,36 ± 0,96 <sup>a</sup>	97,02 ± 0,17 <sup>a*</sup>	97,06 ± 0,98 <sup>b</sup>	90,12 ± 0,62 <sup>b*</sup>
90	88,24 ± 0,47 <sup>a</sup>	92,79 ± 0,52 <sup>a*</sup>	95,61 ± 0,20 <sup>b</sup>	87,43 ± 0,38 <sup>b*</sup>
120	83,91 ± 0,61 <sup>a</sup>	87,86 ± 0,90 <sup>a*</sup>	94,81 ± 1,00 <sup>b</sup>	87,17 ± 0,29 <sup>a*</sup>
150	82,40 ± 0,65 <sup>a</sup>	84,66 ± 0,31 <sup>a*</sup>	94,01 ± 0,81 <sup>b</sup>	87,24 ± 0,78 <sup>b*</sup>
180	80,85 ± 0,23 <sup>a</sup>	81,91 ± 0,49 <sup>a*</sup>	91,83 ± 0,56 <sup>b</sup>	86,80 ± 0,81 <sup>b*</sup>
<b>100 % H. R.</b>				
<b>Temps (jours)</b>	<b>Alginate</b>	<b>Alginate fonctionnalisé</b>	<b>Chitosane</b>	<b>Chitosane fonctionnalisé</b>
0	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
1	97,29 ± 0,97 <sup>a</sup>	96,23 ± 0,05 <sup>a*</sup>	96,43 ± 0,23 <sup>a</sup>	97,68 ± 0,96 <sup>a</sup>
15	96,30 ± 0,06 <sup>a</sup>	95,67 ± 0,69 <sup>a</sup>	95,46 ± 0,47 <sup>a</sup>	96,39 ± 0,61 <sup>a</sup>
30	95,53 ± 0,57 <sup>a</sup>	93,45 ± 0,67 <sup>a*</sup>	95,15 ± 0,11 <sup>a</sup>	94,40 ± 1,02 <sup>a</sup>
60	93,66 ± 0,95 <sup>a</sup>	91,27 ± 0,79 <sup>a*</sup>	95,26 ± 0,32 <sup>b</sup>	93,67 ± 0,96 <sup>a*</sup>
90	91,24 ± 0,16 <sup>a</sup>	89,66 ± 0,97 <sup>a*</sup>	94,47 ± 0,66 <sup>b</sup>	93,22 ± 0,06 <sup>b</sup>
120	84,01 ± 0,25 <sup>a</sup>	90,34 ± 0,62 <sup>a*</sup>	92,07 ± 0,77 <sup>b</sup>	93,62 ± 0,46 <sup>b*</sup>
150	76,39 ± 0,96 <sup>a</sup>	87,50 ± 0,25 <sup>a*</sup>	88,70 ± 0,11 <sup>b</sup>	92,39 ± 0,47 <sup>b*</sup>
180	73,88 ± 1,14 <sup>a</sup>	82,16 ± 0,44 <sup>a*</sup>	82,62 ± 0,32 <sup>b</sup>	89,14 ± 0,61 <sup>b*</sup>

<sup>a</sup> et <sup>b</sup>. Pour un même type de modification (non fonctionnalisé ou fonctionnalisé), les lettres différentes indiquent un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la nature du polymère.

\* Pour un même type de polymère, l'astérisque indique un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la fonctionnalisation.

**Tableau XXXII - Rétention du fer ionique encapsulé dans les billes au cours des 6 mois de stockage à 45°C**

<b>56 % H. R.</b>				
<b>Temps (jours)</b>	<b>Alginate</b>	<b>Alginate fonctionnalisé</b>	<b>Chitosane</b>	<b>Chitosane fonctionnalisé</b>
<b>0</b>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>1</b>	96,94 ± 0,17 <sup>a</sup>	94,11 ± 0,24 <sup>a*</sup>	98,77 ± 0,66 <sup>a</sup>	99,37 ± 0,95 <sup>b</sup>
<b>15</b>	95,81 ± 0,61 <sup>a</sup>	93,65 ± 0,68 <sup>a*</sup>	96,80 ± 0,07 <sup>a</sup>	98,93 ± 0,99 <sup>b*</sup>
<b>30</b>	92,68 ± 0,94 <sup>a</sup>	89,98 ± 0,45 <sup>a*</sup>	94,04 ± 0,34 <sup>b</sup>	95,39 ± 0,86 <sup>ba</sup>
<b>60</b>	91,09 ± 0,92 <sup>a</sup>	90,77 ± 0,91 <sup>a</sup>	91,84 ± 0,96 <sup>a</sup>	94,05 ± 0,05 <sup>b*</sup>
<b>90</b>	86,94 ± 0,37 <sup>a</sup>	86,35 ± 0,28 <sup>a</sup>	91,02 ± 0,10 <sup>b</sup>	93,47 ± 0,70 <sup>b*</sup>
<b>120</b>	84,37 ± 0,09 <sup>a</sup>	84,09 ± 0,54 <sup>a</sup>	91,75 ± 0,70 <sup>b</sup>	93,17 ± 0,82 <sup>b*</sup>
<b>150</b>	83,79 ± 0,98 <sup>a</sup>	83,61 ± 0,51 <sup>a</sup>	90,51 ± 0,79 <sup>b</sup>	91,78 ± 0,40 <sup>b</sup>
<b>180</b>	82,51 ± 0,75 <sup>a</sup>	80,06 ± 0,68 <sup>a</sup>	89,94 ± 0,23 <sup>b</sup>	89,07 ± 0,89 <sup>b</sup>
<b>100 % H. R.</b>				
<b>Temps (jours)</b>	<b>Alginate</b>	<b>Alginate fonctionnalisé</b>	<b>Chitosane</b>	<b>Chitosane fonctionnalisé</b>
<b>0</b>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>1</b>	97,68 ± 0,20 <sup>a</sup>	96,79 ± 0,61 <sup>a</sup>	97,75 ± 0,76 <sup>a</sup>	97,20 ± 0,93 <sup>a</sup>
<b>15</b>	96,69 ± 0,74 <sup>a</sup>	96,13 ± 0,95 <sup>a</sup>	96,03 ± 0,30 <sup>a</sup>	96,28 ± 0,63 <sup>a</sup>
<b>30</b>	92,40 ± 0,53 <sup>a</sup>	92,67 ± 0,20 <sup>a</sup>	91,74 ± 0,75 <sup>a</sup>	90,51 ± 0,62 <sup>b</sup>
<b>60</b>	90,51 ± 1,13 <sup>a</sup>	87,03 ± 0,72 <sup>a*</sup>	90,90 ± 0,90 <sup>a</sup>	89,66 ± 0,62 <sup>b</sup>
<b>90</b>	87,29 ± 0,29 <sup>a</sup>	84,16 ± 0,04 <sup>a*</sup>	86,99 ± 0,96 <sup>a</sup>	87,26 ± 0,13 <sup>b</sup>
<b>120</b>	85,11 ± 0,31 <sup>a</sup>	83,88 ± 0,48 <sup>a*</sup>	79,06 ± 0,81 <sup>b</sup>	86,39 ± 0,26 <sup>b*</sup>
<b>150</b>	82,97 ± 0,97 <sup>a</sup>	81,04 ± 0,19 <sup>a*</sup>	73,87 ± 0,07 <sup>b</sup>	84,15 ± 0,46 <sup>b*</sup>
<b>180</b>	81,73 ± 0,67 <sup>a</sup>	78,38 ± 0,02 <sup>a*</sup>	71,04 ± 0,21 <sup>b</sup>	83,96 ± 0,75 <sup>b*</sup>

<sup>a</sup> et <sup>b</sup>. Pour un même type de modification (non fonctionnalisé ou fonctionnalisé), les lettres différentes indiquent un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la nature du polymère.

\* Pour un même type de polymère, l'astérisque indique un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la fonctionnalisation.

**Tableau XXXIII – Libération de la vitamine C au cours du temps**

Type de solution	Temps	Type de billes			
		Alginate	Alginate fonctionnalisé	Chitosane	Chitosane fonctionnalisé
stomacale	10 min	6,21 ± 0,09 <sup>a</sup>	9,36 ± 0,35 <sup>a*</sup>	11,45 ± 1,34 <sup>b</sup>	14,64 ± 0,38 <sup>b*</sup>
	20 min	13,68 ± 0,12 <sup>a</sup>	10,32 ± 0,16 <sup>a*</sup>	12,59 ± 0,97 <sup>b</sup>	16,00 ± 0,17 <sup>b*</sup>
	30 min	13,82 ± 0,24 <sup>a</sup>	12,73 ± 1,07 <sup>a*</sup>	13,50 ± 0,56 <sup>b</sup>	20,09 ± 0,12 <sup>b*</sup>
intestinale	1 h 00	57,33 ± 0,10 <sup>a</sup>	57,95 ± 0,04 <sup>a*</sup>	57,28 ± 0,81 <sup>b</sup>	53,15 ± 0,10 <sup>b*</sup>
	1 h 30	69,91 ± 0,09 <sup>a</sup>	72,41 ± 0,12 <sup>a*</sup>	63,36 ± 1,05 <sup>b</sup>	65,27 ± 0,56 <sup>b*</sup>
	2 h 00	73,92 ± 0,07 <sup>a</sup>	78,06 ± 0,12 <sup>a*</sup>	64,22 ± 1,06 <sup>b</sup>	69,64 ± 0,44 <sup>b*</sup>
	2 h 30	73,55 ± 0,07 <sup>a</sup>	79,77 ± 0,09 <sup>a*</sup>	65,77 ± 0,54 <sup>b</sup>	71,41 ± 1,32 <sup>b*</sup>
	3 h 30	75,06 ± 0,05 <sup>a</sup>	81,95 ± 1,25 <sup>a*</sup>	71,29 ± 2,31 <sup>b</sup>	75,68 ± 0,78 <sup>b*</sup>
	4 h 30	78,64 ± 0,16 <sup>a</sup>	84,73 ± 0,22 <sup>a*</sup>	78,43 ± 1,44 <sup>a</sup>	75,82 ± 0,94 <sup>b*</sup>
	5 h 30	89,37 ± 0,31 <sup>a</sup>	91,45 ± 0,18 <sup>a*</sup>	83,95 ± 0,12 <sup>b</sup>	84,59 ± 1,28 <sup>b</sup>
	6 h 30	93,14 ± 0,87 <sup>a</sup>	93,99 ± 0,57 <sup>a*</sup>	86,27 ± 1,22 <sup>b</sup>	88,18 ± 0,10 <sup>b</sup>

<sup>a et b</sup>. Pour un même type de modification (non fonctionnalisé ou fonctionnalisé), les lettres différentes indiquent un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la nature du polymère.

\* Pour un même type de polymère, l'astérisque indique un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la fonctionnalisation.

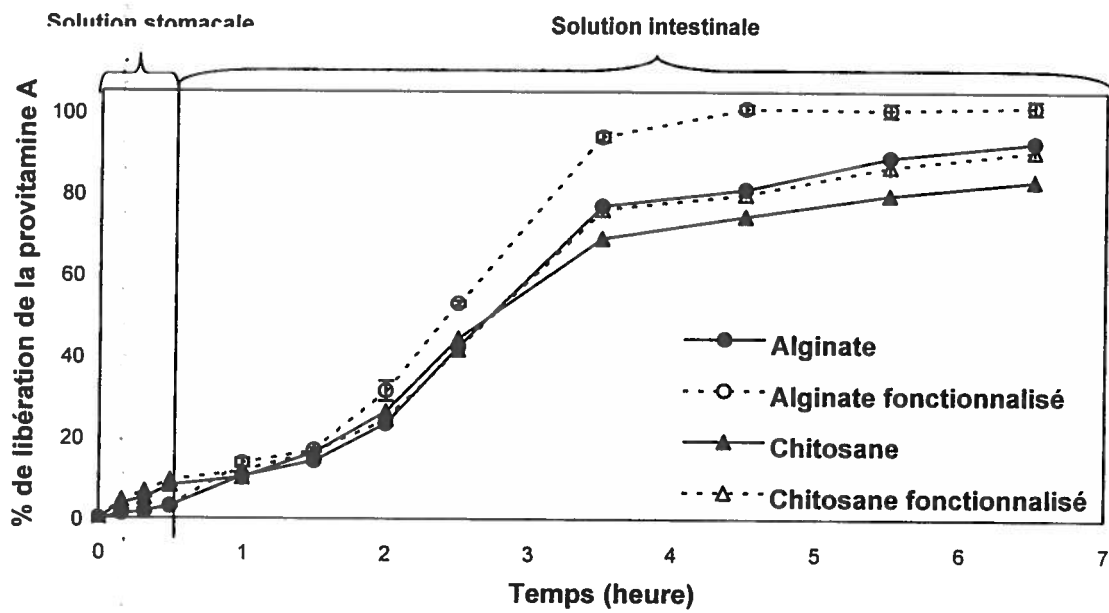


Figure 31 - Libération contrôlée de la provitamine A encapsulée



Tableau XXXIV - Libération de la provitamine A au cours du temps

Type de solution	Temps	Type de billes			
		Alginate	Alginate fonctionnalisé	Chitosane	Chitosane fonctionnalisé
stomacale	10 min	1,09 ± 1,06 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,25 <sup>a</sup>	3,73 ± 0,24 <sup>b</sup>	4,59 ± 0,48 <sup>b*</sup>
	20 min	1,77 ± 0,51 <sup>a</sup>	1,64 ± 0,26 <sup>a</sup>	5,09 ± 0,56 <sup>b</sup>	6,75 ± 1,33 <sup>b</sup>
	30 min	3,14 ± 0,21 <sup>a</sup>	3,05 ± 0,21 <sup>a</sup>	8,22 ± 1,65 <sup>b</sup>	9,41 ± 1,49 <sup>b</sup>
intestinale	1 h 00	10,50 ± 0,25 <sup>a</sup>	13,69 ± 1,06 <sup>a*</sup>	10,14 ± 1,74 <sup>a</sup>	11,73 ± 1,04 <sup>b</sup>
	1 h 30	14,23 ± 0,24 <sup>a</sup>	16,8 ± 0,58 <sup>a*</sup>	16,21 ± 0,79 <sup>b</sup>	16,37 ± 0,12 <sup>a</sup>
	2 h 00	23,36 ± 1,69 <sup>a</sup>	31,45 ± 2,47 <sup>a*</sup>	26,32 ± 0,44 <sup>b</sup>	24,36 ± 0,14 <sup>b*</sup>
	2 h 30	42,14 ± 1,44 <sup>a</sup>	52,82 ± 0,67 <sup>a*</sup>	44,27 ± 1,65 <sup>a</sup>	41,55 ± 0,15 <sup>b*</sup>
	3 h 30	76,89 ± 0,57 <sup>a</sup>	93,91 ± 1,14 <sup>a*</sup>	68,95 ± 1,07 <sup>b</sup>	76,02 ± 1,07 <sup>b*</sup>
	4 h 30	81,06 ± 0,50 <sup>a</sup>	100,95 ± 1,02 <sup>a*</sup>	74,37 ± 0,48 <sup>b</sup>	79,82 ± 0,57 <sup>b</sup>
	5 h 30	88,94 ± 0,47 <sup>a</sup>	100,59 ± 1,68 <sup>a*</sup>	79,59 ± 0,35 <sup>b</sup>	86,68 ± 2,04 <sup>b*</sup>
	6 h 30	92,57 ± 1,67 <sup>a</sup>	101,36 ± 1,64 <sup>a*</sup>	83,18 ± 1,78 <sup>b</sup>	90,47 ± 0,78 <sup>b*</sup>

<sup>a</sup> et <sup>b</sup>. Pour un même type de modification (non fonctionnalisé ou fonctionnalisé), les lettres différentes indiquent un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la nature du polymère.

\* Pour un même type de polymère, l'astérisque indique un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la fonctionnalisation.

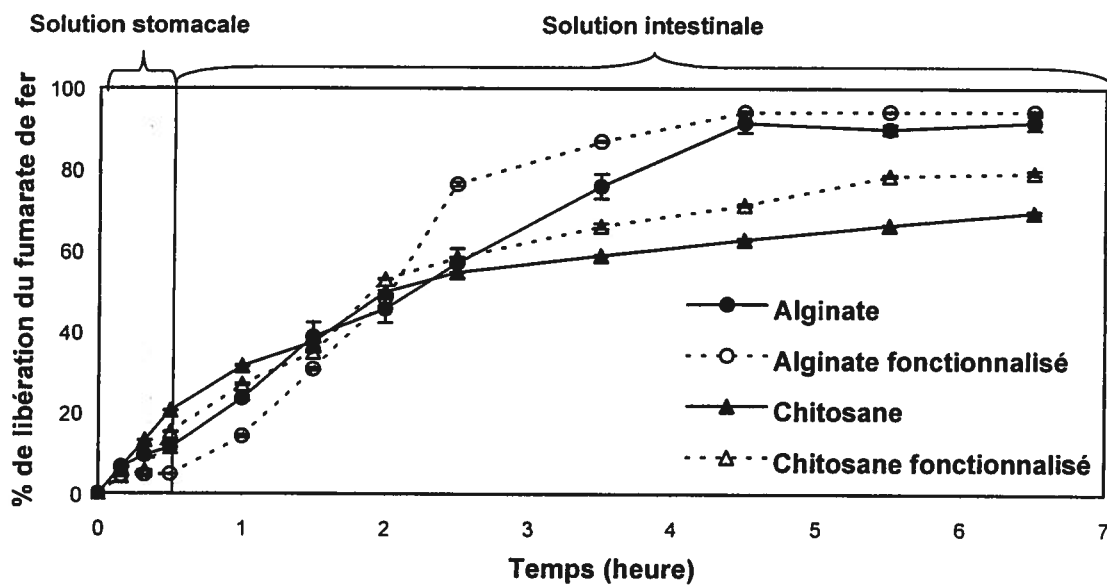


Figure 32 - Libération contrôlée du fer ionique encapsulé

Tableau XXXV - Libération du fer ionique au cours du temps

Solution de digestion	Temps	Type de billes			
		Alginate	Alginate fonctionnalisé	Chitosane	Chitosane fonctionnalisé
stomacale	10 min	6,67 ± 0,21 <sup>a</sup>	4,48 ± 0,08 <sup>a</sup>	6,58 ± 0,19 <sup>a</sup>	4,32 ± 0,12 <sup>a</sup>
	20 min	9,54 ± 0,53 <sup>a</sup>	4,66 ± 0,10 <sup>b*</sup>	13,21 ± 0,04 <sup>a</sup>	5,71 ± 0,12 <sup>b*</sup>
	30 min	11,45 ± 1,51 <sup>a</sup>	4,86 ± 0,07 <sup>b*</sup>	20,46 ± 0,07 <sup>a</sup>	15,19 ± 0,13 <sup>b*</sup>
	1 h 00	23,53 ± 0,66 <sup>a</sup>	14,20 ± 0,35 <sup>b*</sup>	31,54 ± 0,21 <sup>a</sup>	26,95 ± 0,26 <sup>b*</sup>
	1 h 30	38,73 ± 3,53 <sup>a</sup>	30,74 ± 0,31 <sup>b*</sup>	37,37 ± 0,14 <sup>a</sup>	34,84 ± 0,07 <sup>b*</sup>
	2 h 00	45,59 ± 3,35 <sup>a</sup>	48,27 ± 0,38 <sup>b*</sup>	49,83 ± 0,38 <sup>a</sup>	52,96 ± 0,12 <sup>b*</sup>
intestinale	2 h 30	56,89 ± 3,65 <sup>a</sup>	76,34 ± 0,49 <sup>b*</sup>	54,66 ± 0,10 <sup>a</sup>	58,24 ± 0,16 <sup>b*</sup>
	3 h 30	75,83 ± 3,07 <sup>a</sup>	86,95 ± 0,20 <sup>b*</sup>	58,77 ± 0,15 <sup>a</sup>	66,02 ± 0,66 <sup>b*</sup>
	4 h 30	91,54 ± 2,31 <sup>a</sup>	94,24 ± 0,27 <sup>b*</sup>	62,70 ± 0,34 <sup>a</sup>	71,21 ± 0,31 <sup>b*</sup>
	5 h 30	89,96 ± 1,19 <sup>a</sup>	94,30 ± 0,18 <sup>b*</sup>	66,33 ± 0,15 <sup>a</sup>	78,43 ± 0,28 <sup>b*</sup>
	6 h 30	91,68 ± 1,77 <sup>a</sup>	94,37 ± 0,31 <sup>b*</sup>	69,44 ± 0,35 <sup>a</sup>	79,22 ± 0,50 <sup>b*</sup>

<sup>a</sup> et <sup>b</sup>. Pour un même type de modification (non fonctionnalisé ou fonctionnalisé), les lettres différentes indiquent un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la nature du polymère.

\* Pour un même type de polymère, l'astérisque indique un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) de la fonctionnalisation.

## DISCUSSION

## 1. Activité antibactérienne de la boisson

L'objectif global de l'étude microbiologique était d'évaluer l'activité antibactérienne de la boisson en poudre après reconstitution avec de l'eau contaminée. Les expériences ont été réalisées sur trois souches ainsi que sur le mélange et ont permis l'étude de trois paramètres : la concentration bactérienne initiale, le temps de contact entre la boisson et les bactéries ainsi que la nature des acides présents dans la boisson. Les résultats montrent un effet inhibiteur de la boisson en poudre sur la croissance d'*Escherichia coli*, de *Salmonella* Typhi, de *Serratia liquefaciens* et du mélange des trois souches bactériennes. Il apparaît également que l'effet inhibiteur observé dépend de trois facteurs : la nature de la contamination, le niveau de contamination initiale et le temps de contact entre la boisson reconstituée et les bactéries.

Tout d'abord, la nature de la contamination de l'eau influence directement la rapidité et l'intensité de l'inhibition de la croissance bactérienne. Les meilleurs résultats pour un même degré de contamination initiale et pour un même temps de contact ont été obtenus avec *Serratia liquefaciens*. En effet, en présence d'acides organiques, lorsque la concentration bactérienne de départ était de  $10^3$  bactéries / mL, l'activité antibactérienne de la boisson reconstituée est totale (effet bactéricide) dès les cinq premières min de contact avec les bactéries. Pour des concentrations initiales de  $10^5$  et  $10^7$  bactéries / mL, l'effet bactéricide est observé après 10 min de contact avec la boisson originale reconstituée. Le deuxième organisme le plus sensible est *Salmonella* Typhi. L'effet bactéricide a lieu après 10 min de contact en présence d'acides organiques pour une contamination initiale de  $10^3$  et  $10^5$  bactéries / mL. Bien que l'activité antibactérienne ne soit pas totale pour une concentration initiale de  $10^7$  bactéries / mL, un effet bactériostatique de la boisson originale reconstituée a été observé au terme de l'expérience, représentant une réduction de 61,25 % de la concentration bactérienne. Enfin, *Escherichia coli* s'est montrée la bactérie la moins sensible au cours de cette expérience. Toutefois une activité antibactérienne totale a été observée à la fin de

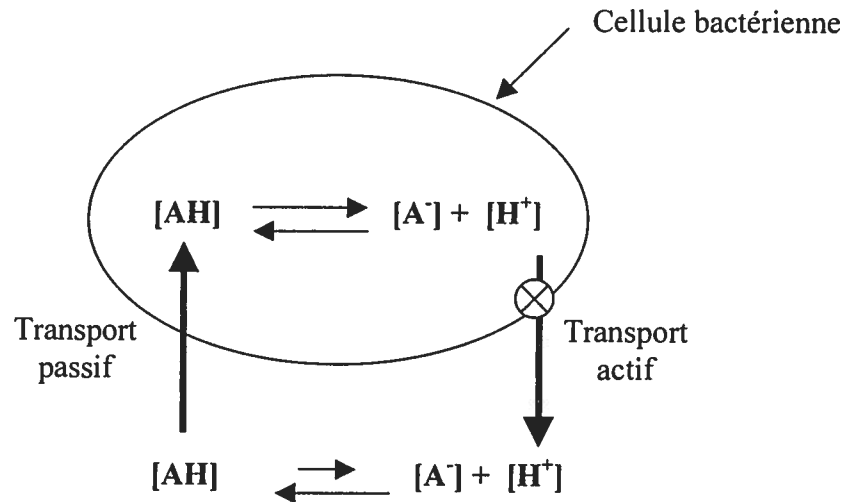
l'expérience pour la plus faible concentration bactérienne de départ. Des réductions importantes des populations bactériennes de 50,00 % (pour une concentration initiale de  $10^5$  bactéries / mL) et de 20,86 % (pour une concentration initiale de  $10^7$  bactéries / mL) ont également été mesurées après 180 min de contact. Ces résultats concordent avec les connaissances actuelles sur la sensibilité des Entérobactéries aux conditions acides. En effet, la forte sensibilité de *Serratia liquefaciens* aux conditions acides a été rapportée par Ouattara et al. (1997). Les bactéries appartenant au genre *Salmonella* semblent un peu plus résistantes puisque Govered et al. (1979) ont mis en évidence la survie des bactéries dans le jus de pomme à un pH de 3,6. Enfin, l'étude de Simango et Rukure (1992) démontre la présence d'*Escherichia coli* après 24 heures à pH 2,7.

L'activité antibactérienne de la boisson dépend également du degré de contamination initiale de l'eau servant à la reconstitution de la boisson. En effet, l'activité antibactérienne la plus forte (un effet bactéricide total) a été observé en présence de la plus faible concentration bactérienne utilisée soit  $10^3$  bactéries / mL, et ce pour toutes les souches bactériennes ainsi que pour le mélange des trois souches. Pour des degrés de contamination supérieurs ( $10^5$  et  $10^7$  bactéries / mL), des effets bactériostatiques importants ont été observés pour les expériences réalisées en présence d'*Escherichia coli*. Pour les expériences réalisées sur *Serratia liquefaciens* et *Salmonella* Typhi, en présence de  $10^5$  bactéries / mL, des inhibitions complètes de la population ont été enregistrées. Dans le contexte de l'étude, c'est-à-dire la décontamination de l'eau pour les pays en voie de développement, ces résultats suggèrent que la qualité microbiologique de l'eau utilisée doit être la moins mauvaise possible pour un plus grand effet antibactérien.

Le temps de contact entre la boisson et les populations bactériennes influe aussi sur l'intensité de l'effet inhibiteur de la boisson reconstituée. En effet, pour une concentration initiale en bactéries, l'étude de la cinétique d'inhibition de la croissance bactérienne démontre que plus le temps de contact entre la boisson et les bactéries est long, plus l'inhibition de la croissance bactérienne est forte.

L'étude met également en évidence que l'inhibition de la croissance bactérienne n'est pas seulement due à l'acidité de la boisson reconstituée, même si le pH mesuré au cours de l'expérience (pH moyen de 3.2) soit inférieur au pH optimal de croissance des Entérobactéries (pH optimal compris entre 4.5 et 8). Bien que le pH joue un rôle important dans le développement bactérien puisqu'il influence directement l'activité enzymatique (Regnault, 1998), les résultats de l'étude montrent que, pour un même pH, l'inhibition de la croissance bactérienne est plus forte en présence des acides organiques qu'en présence de l'acide minéral. Les acides organiques sont connus et utilisés dans l'industrie alimentaire car ils permettent de limiter la croissance bactérienne (ICMSF, 1980). Les expériences réalisées au cours du présent projet démontrent également un effet bactéricide des acides organiques. Leur mécanisme d'action est présenté à la figure 33. Les acides organiques non dissociés pénètrent dans la cellule bactérienne via un système de transport passif, expliquant ainsi la diminution de la concentration d'acides organiques sous forme non dissocié dans la boisson au cours de l'expérience. Le pH élevé du cytoplasme de la cellule bactérienne entraîne la dissociation des acides organiques. Cette dissociation génère un excès de protons que la cellule doit éliminer pour conserver l'intégrité physique et fonctionnelle de son système enzymatique. L'inhibition de la croissance est due à l'excrétion énergivore de ce surplus protonique, alors que l'effet bactéricide survient lorsque les systèmes d'excrétions des protons sont saturés conduisant à une acidification fatale du cytoplasme ( Mortimore et Wallace, 1996). Ce mécanisme n'a pas lieu en présence d'acide minéral car ce sont des acides forts qui ne se dissocient pas dans la cellule bactérienne.

Le résultat des calculs du taux de dissociation des acides organiques concorde avec l'étude de Mortimore et Wallace (1996) démontrant qu'une concentration de 1 g / L d'acide citrique sous forme non dissocié est suffisante pour produire une inhibition significative de la croissance des Entérobactéries.



[ AH ] = Acides organiques non dissociée

[ A- ] = Acides organiques dissociés

[ H<sup>+</sup> ] = proton

**Figure 33 – Mécanismes d'action des acides organiques dans la cellule bactérienne**

(adaptée de Mortimore et Wallace, 1996).

Les acides organiques non dissociés pénètrent dans la cellule bactérienne via un système de transport passif. Le pH élevé du cytoplasme de la cellule bactérienne entraîne la dissociation des acides organiques. Cette dissociation génère un excès de protons que la cellule doit éliminer pour conserver l'intégrité physique et fonctionnelle de son système enzymatique. L'inhibition de la croissance est due à l'excrétion énergivore de ce surplus protonique, alors que l'effet bactéricide survient lorsque les systèmes d'excrétions des protons sont saturés conduisant à une acidification fatale du cytoplasme.



## 2. Stabilité des micronutriments

Le but de l'étude de la stabilité des micronutriments était de déterminer précisément l'évolution de la concentration en vitamines et minéraux présents dans la boisson, en fonction de la température, de l'humidité relative et de la durée d'entreposage.

La stabilité des huit vitamines et du fer a d'abord été évaluée dans des conditions standard de température (23°C) et d'humidité relative (56 %). Dans ces conditions, les résultats montrent une grande stabilité des vitamines B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, E et de la niacine. En effet, au terme des 270 jours d'expérience, les concentrations de ces vitamines dans la boisson en poudre correspondent à plus de 80 % de leurs concentrations initiales. Les pertes en vitamines B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, E et en niacine s'expliquent par la faible instabilité de ces micronutriments à des degrés de température et d'humidité relative peu élevés (Machlin, 1991). Ces deux facteurs combinés avec la longue période d'entreposage (9 mois) entraînent une légère dégradation des vitamines. Au contraire, les concentrations en acide folique et en fer ionique ont fortement diminuées dans la boisson au cours de l'expérience. Après 270 jours de stockage dans les conditions standard de température et d'humidité relative, les pertes en acide folique et fer ionique sont respectivement de 61 % et 51 %. Les pertes en acide folique enregistrées sont en accord avec les connaissances actuelles sur cette vitamine hydrosoluble. Machlin (1991) rapporte la dégradation rapide de l'acide folique en présence d'humidité relative et est son importante sensibilité à la chaleur. L'observation de fines particules noires lors de la reconstitution de la boisson précédant l'analyse, laisse supposer que les diminutions des concentrations en fer ionique seraient dues à la précipitation du fer dans le mélange. En effet, la présence d'acides organiques dans la boisson (acide citrique et acide ascorbique) entraîne un pH acide voisin de 3.2. A long terme, cette acidité provoque un déplacement de l'équilibre chimique qui se traduit par la précipitation du fer en petites particules de couleur rouille (fer oxydé), le rendant ainsi indétectable. Toutefois, ces observations ne viennent pas remettre en cause l'intérêt et la validité des méthodes de dosage des micronutriments solubles utilisées ici (spectrométrie par absorption atomique). En effet, seul le fer soluble est intéressant car mieux absorbés par l'organisme (Scheider, 1985). Dans l'objectif de ce

projet, soit la fortification en micronutriments des populations des pays en voie de développement, les résultats démontrent qu'au terme de l'expérience, l'apport en fer est très faible.

Finalement, la vitamine C et la provitamine A ont été moyennement dégradées au cours des 270 jours de stockage à 23°C et 56 % d'humidité relative. À la fin de la période expérimentale, respectivement 64 % et 69 % des concentrations initiales en vitamine C et en provitamine A étaient encore présents dans la boisson.

L'étude a également mis en évidence les effets d'une augmentation de la température, de 23°C (représentatif des climats continentaux) à 45°C (représentatif des climats tropicaux), sur la stabilité du mélange des huit vitamines et des deux minéraux au cours de son entreposage à un niveau d'humidité relative donné (56 % et 100 %). Dans le groupe des vitamines hydrosolubles, la concentration en niacine est très peu affectée puisqu'une augmentation de la température se traduit par des pertes d'environ 5 % (à 56 % et 100 % d'humidité relative) après 270 jours de stockage. À l'opposé, une augmentation de température de 23°C à 45°C affecte de manière significative les concentrations en vitamines B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C et acide folique dans la boisson. À 56 % d'humidité relative, des pertes de 15 % en vitamine B<sub>2</sub>, 17 % en vitamine B<sub>6</sub>, 31 % en vitamine B<sub>12</sub>, 43 % en vitamine C et 23 % en acide folique ont été enregistrées au terme des 270 jours d'entreposage. À 100 % d'humidité relative, les diminutions des concentrations en vitamine B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C et en acide folique étaient respectivement de 23 %, 2 %, 24 %, 38 % et 15 % pour la même période. La forte instabilité de la vitamine C et de l'acide folique lors d'une augmentation de température a déjà été observée (Harris, 1988 et Scheider, 1985). Pour les vitamines du groupe B (vitamines B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> et B<sub>12</sub>), Harris (1988) fait part de leur relative stabilité face à la température. Les dégradations notables de ces trois vitamines au cours de notre étude, sont dues à la combinaison des deux facteurs soient la température et l'humidité relative. Dans le groupe des vitamines liposolubles, la stabilité de la provitamine A est affectée de manière significative par l'augmentation de la température. Au terme de l'expérience, des pertes en provitamine A de 38 % et 55 % ont été enregistrées pour les échantillons placés à 56 % et 100 % d'humidité relative. Ces résultats corroborent avec ceux de Harris (1988), faisant état

d'une grande instabilité de la provitamine A face à l'augmentation de température. Lors de cette même augmentation de température, de faibles pertes de 8 % et 12 % en vitamine E ont été observées après 270 jours pour les échantillons entreposés à 56 % et 100 % d'humidité relative. Des diminutions des concentrations en fer ionique soluble ont également été observées pour les deux températures. À 56 % d'humidité relative, une perte de 18 % en fer ionique a été enregistrée au terme de l'expérience. À 100 % d'humidité relative, les pertes sont de 13 % pour le fer. Ces diminutions de concentrations sont dues au phénomène de précipitation des minéraux expliqués ci haut. Cette étude de stabilité des micronutriments de la boisson selon la température d'entreposage a permis de mettre en évidence une importante dégradation de ceux-ci au cours du temps, limitant considérablement l'impact de l'apport vitaminique prévu initialement.

Finalement, l'étude a mis en évidence l'effet de 2 degrés d'humidité relative sur la stabilité du mélange des huit vitamines et des deux minéraux au cours de son entreposage pour une température donnée. Des humidités relatives de 56 % et 100 % ont été testées afin de mimer respectivement l'humidité relative des climats continentaux et celle des climats tropicaux. Dans le groupe des vitamines hydrosolubles, la concentration en niacine est très peu affectée puisqu'une augmentation de l'humidité relative se traduit par des pertes d'environ 2 % (à 56 % et 100 % d'humidité relative) après 270 jours de stockage. Les stabilités de l'acide folique et de la vitamine C ne semblent pas être affectées par l'augmentation de l'humidité relative. En fait, on peut penser que les pertes de ces vitamines étant déjà tellement importantes à 56 % d'humidité relative (de 40 % à 80 % de pertes), il est difficile d'observer une différence due à une augmentation d'humidité relative. Tel que décrit par Harris (1988), les vitamines B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> et B<sub>12</sub> sont instables en présence d'humidité. Des pertes de 10 % à 20 % ont été enregistrées au cours de l'expérience. Dans le groupe des vitamines liposolubles, la vitamine E n'est pas affectée par l'augmentation de l'humidité relative, quelque soit la température. En effet des pertes de 1 % et 5 % ont été observées à 23 C et à 45 C. La concentration en provitamine A dans la boisson n'est pas directement affectée par l'humidité relative. À 23 C l'augmentation de l'humidité relative se traduit par une perte en provitamine A de 5 %. C'est la combinaison d'une température élevée avec une augmentation du degré

d'humidité relative qui se révèle désastreux sur la concentration en provitamine A. Après 270 jours d'entreposage à 45 C et 100 % d'humidité relative, 82 % de la provitamine A contenue dans la boisson ont été dégradés. Tel qu'observé pour la vitamine C et l'acide folique, les pertes en minéraux étant déjà tellement importantes à 56 % d'humidité relative (de 40 % à 75 % de pertes), il est difficile d'observer une différence due à une augmentation d'humidité relative. Après 270 jours de stockage à 45 C et 100 % d'humidité relative, des diminutions des concentrations en fer ionique de 75 % ont été enregistrées.

### 3. Encapsulation des micronutriments

Le développement d'une méthode d'encapsulation des micronutriments s'est imposé de lui-même après l'observation de la grande instabilité des micronutriments. L'objectif de l'encapsulation des micronutriments était de les protéger des conditions de température et d'humidité relative élevées au cours de leur entreposage et d'éviter qu'ils interagissent entre eux.

Quatre matrices ont été développées (à base d'alginate, d'alginate fonctionnalisé, de chitosane et de chitosane fonctionnalisé) et leurs propriétés physico-chimiques ont été évaluées. La force à la rupture et la déformation à la rupture mettent en évidence la résistance mécanique des billes. Les billes à base de chitosane sont plus résistantes que celles à base d'alginate. Le coefficient de relaxation des billes montre également une plus grande souplesse des billes à base de chitosane que celles à base d'alginate. Les résultats ne permettent pas de conclure avec certitude sur l'effet de la fonctionnalisation des polymères sur la résistance et la viscoélasticité des billes. En effet les écarts-types obtenus au cours de l'analyse des données sont trop élevés pour être significatifs. Un plus grand nombre d'échantillons pourraient être mesurés pour finaliser cette étude.

L'étude de la stabilité des micronutriments non encapsulés ayant démontrée une importante instabilité de ceux-ci face à l'humidité relative, une étude a été réalisée sur la perméabilité à la vapeur d'eau des films de même composition que les billes. Les films permettent de mimer les échanges d'eau ayant lieu à la surface des billes. Les films à base de chitosane se sont révélés plus imperméable à l'eau que ceux à base d'alginate. La fonctionnalisation des polymères a amélioré de façon significative l'imperméabilité des films à la vapeur d'eau. En effet, la fonctionnalisation consiste en une acylation. Lors de la gélification, les acides gras se regroupent pour former un réseau hydrophobe, difficilement pénétrable par les molécules d'eau.

Le gonflement des billes, qui correspond à la cinétique d'absorption d'eau par les billes, a également été déterminé. Au cours de l'étude, les billes à base d'alginate ont

absorbées moins d'eau que celles à base de chitosane représentant des augmentations de volume de 76 % et 127 % respectivement. La fonctionnalisation des polymères permet de diminuer significativement le gonflement des billes. La cinétique d'absorption d'eau par les billes est un paramètre important pour évaluer le comportement de celles-ci ainsi que la libération de leur contenu dans un milieu aqueux. En effet, plus la cinétique d'absorption est rapide, plus la bille sera désintégrée rapidement, libérant ainsi les substances encapsulées. Les substances qui étaient encapsulées ne sont donc plus protégées.

L'étude de la libération contrôlée de trois micronutriments encapsulés a également été réalisée dans deux solutions mimant le passage dans le tractus gastro-intestinal. Les résultats montrent une bonne stabilité des billes, la libération des micronutriments n'ayant lieu qu'après 4h30. En effet, Takka et Acarturk (1999) rapportent la libération totale d'un composé médicamenteux après seulement 3h30, pour une matrice semblable à base de chitosane et d'alginate non gélifiés. Dans cette expérience, la fonctionnalisation ne semble pas apporter d'amélioration notable.

Finalement l'étude de la stabilité de trois micronutriments encapsulés a permis de mettre en évidence l'efficacité de la méthode d'encapsulation développée au cours de ce projet. Après 6 mois d'entreposage à des conditions élevées de température (45°C) et d'humidité relative (100 %), la rétention minimale en vitamine C encapsulée était de 79 % comparativement à 30 % pour la vitamine C non encapsulée. Pour la même période d'entreposage, à 45°C et 56 % d'humidité relative, la rétention minimale de la provitamine A encapsulée était de 87 % contre 30 % pour la provitamine A non encapsulée. Enfin, la rétention minimale du fer ionique encapsulée était de 71 % contre 25 % pour le fer ionique non encapsulé après 6 mois d'entreposage à 45°C et 100 % d'humidité relative. De plus, une récente étude a démontré que l'absorption du fer (fumarate ou citrate) par l'organisme était augmentée en présence de vitamine C (Fidler *et al*, 2003)

## **CONCLUSION**

L'objectif premier de ce projet était de déterminer la stabilité des micronutriments dans une boisson fortifiée destinée aux pays en voie de développement. Dans le contexte de cette étude, les intérêts pour la stabilité des micronutriments sous des conditions d'entreposage tropicales et pour l'activité antibactérienne de la boisson reconstituée se sont imposés.

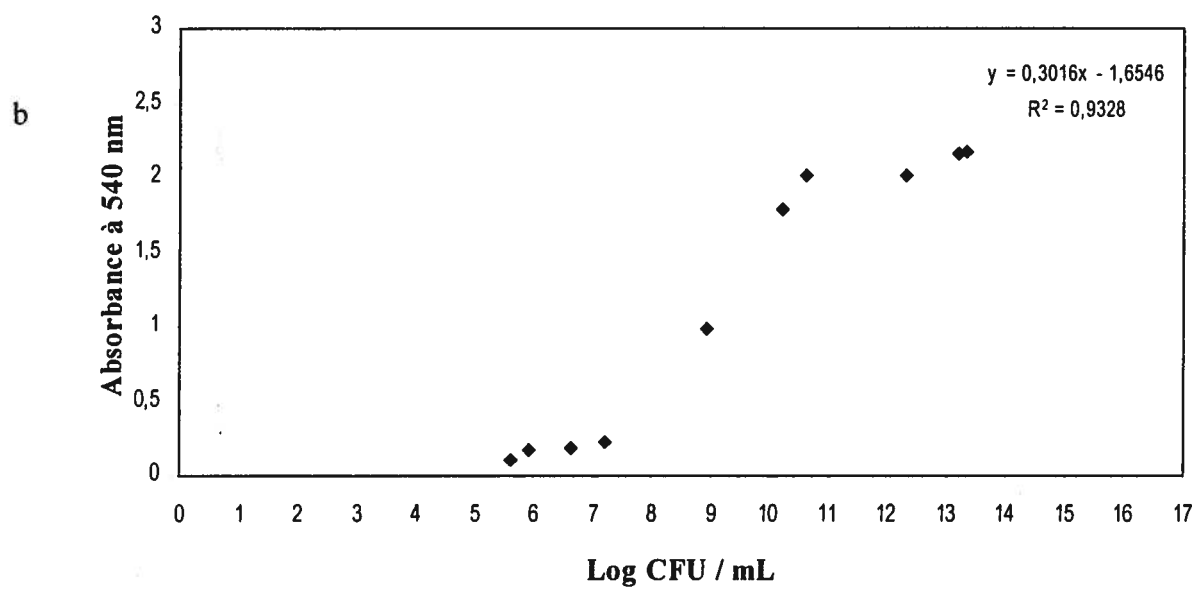
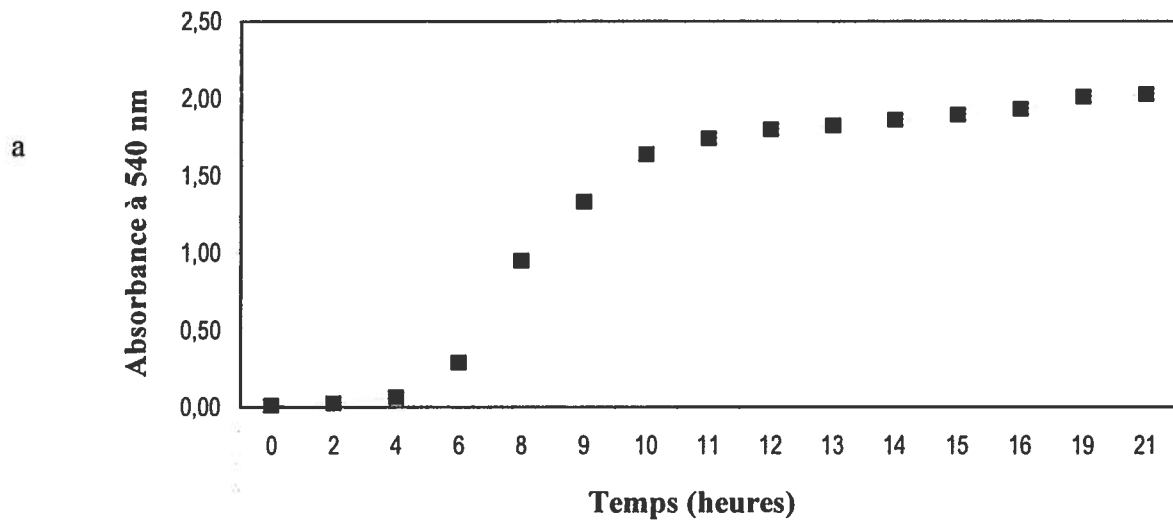
Concitant l'activité antibactérienne de la boisson reconstituée, les résultats obtenus ont indiqué que la présence des acides ascorbique et citrique a permis de diminuer considérablement voir même de supprimer toute présence bactérienne viable dans la boisson reconstituée. Afin d'assurer une efficacité complète de la boisson, la qualité initiale de l'eau servant à la reconstitution doit être la meilleure possible. Une modification de la composition de la boisson en poudre, comme par exemple une augmentation de la concentration en acides organiques pourrait être envisageable.

L'étude la stabilité des micronutriments a mis en évidence une important dégradation de la majorité des vitamines et minéraux contenus dans la boisson en poudre, face à des conditions élevées de température et d'humidité relative proches de celles rencontrées dans les pays tropicaux. Des interactions entre les micronutriments ont également été montrées. La composition elle-même du mélange a entraînée la dégradation de certains micronutriments ou leur indisponibilité biologique.

Les résultats de l'étude sur la stabilité des micronutriments ont entraînés le développement d'une méthode d'encapsulation. Différentes matrices ont été développées au laboratoire. Les bonnes propriétés physicochimiques des billes obtenues se sont traduites pas une remarquable amélioration de la stabilité des micronutriments face aux conditions élevées de température e t d'humidité relative.

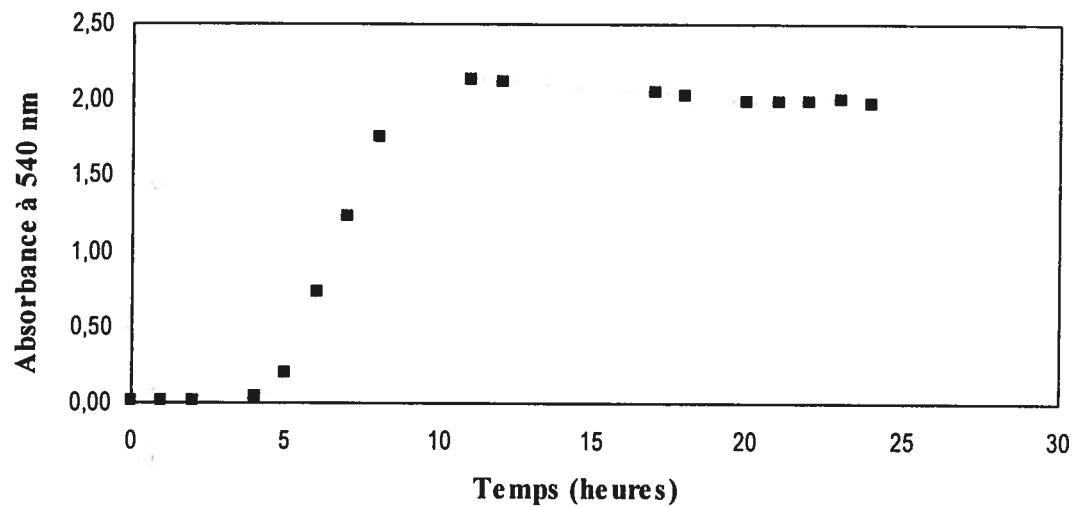


**Appendice A**  
**Courbes de croissance des souches bactériennes**

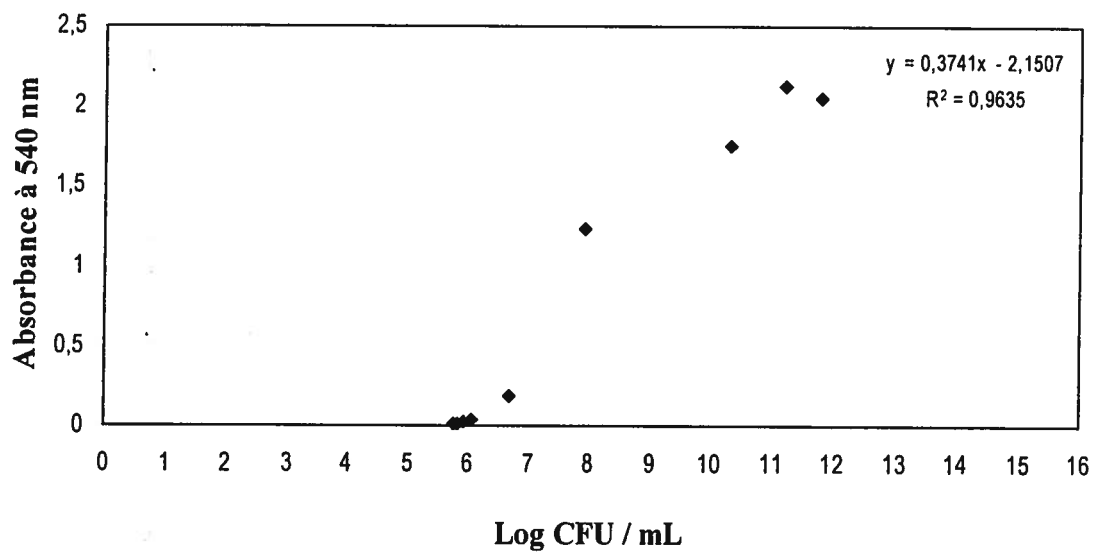


1. Courbes de croissance d' *Escherichia coli* (a, DO=f (temps) / b, DO=f (log CFU))

a

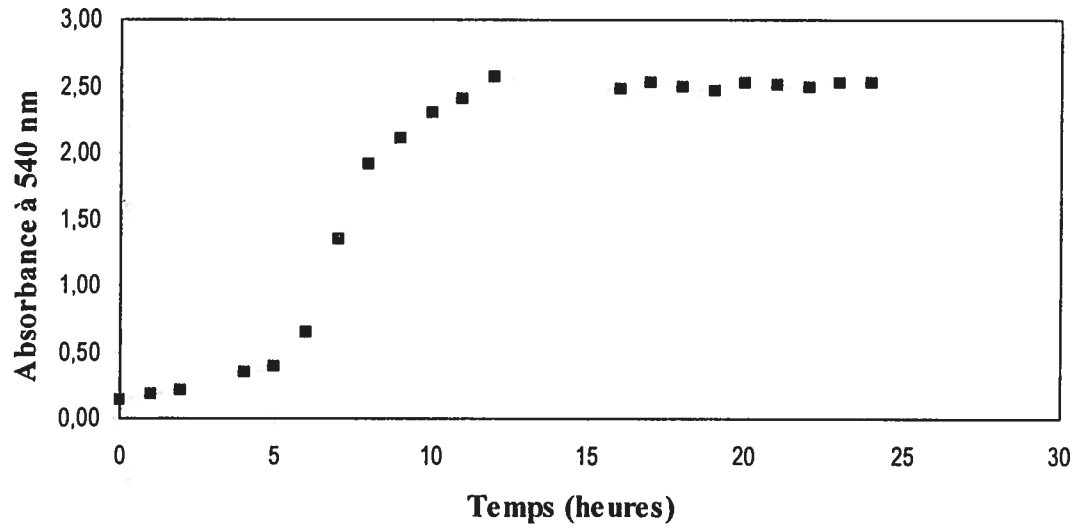


b

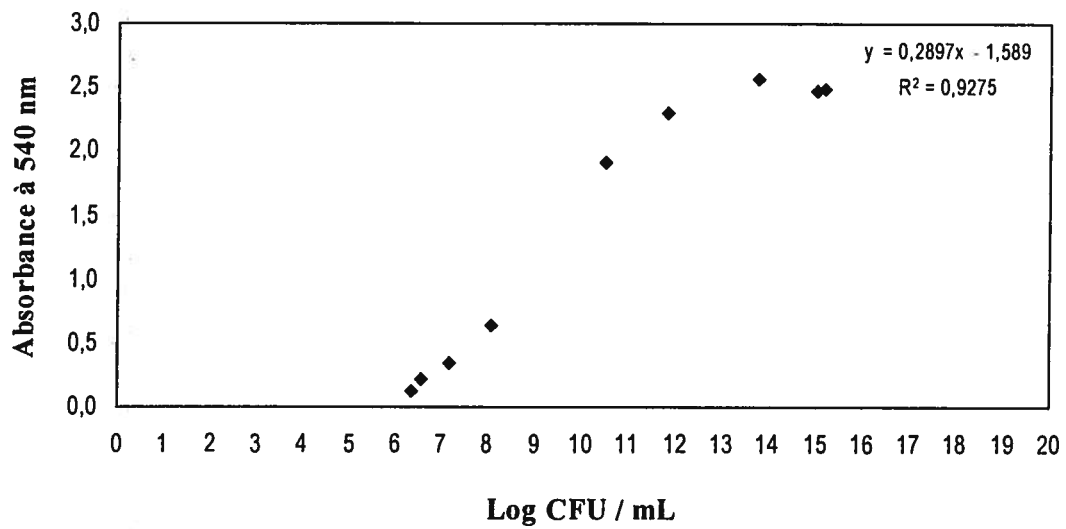


2. Courbes de croissance de *S. Typhi* (a,  $DO=f(\text{temps})$  / b,  $DO=f(\log \text{CFU})$ )

a



b



3. Courbes de croissance de *S. liquefaciens* (a, DO=f (temps) / b, DO=f (log CFU))

**Appendice B**  
**Composition de la boisson**

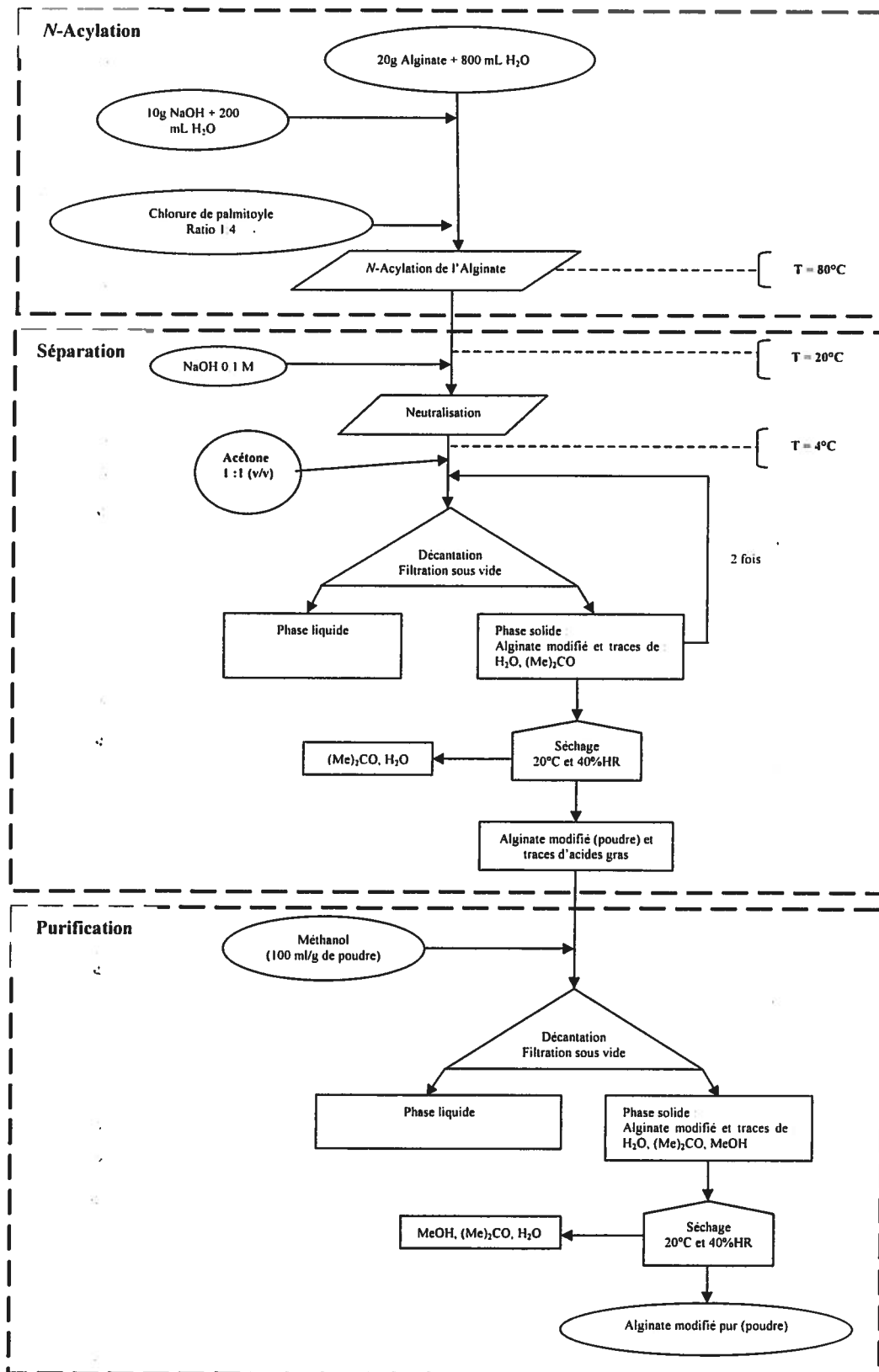
**Composition de la boisson**

Ingrédients	% de la recette	µg / mL de boisson reconstituée*
Sucrose	90.0700	-
Arôme orange	0.6000	-
Acide citrique	5.0000	-
Riboflavine (vitamine B <sub>2</sub> )	0.0025	2.400
Pyridoxine (vitamine B <sub>6</sub> )	0.0029	2.800
Cyanocobalamine (vitamine B <sub>12</sub> )	0.0132	0.012
Acide ascorbique (vitamine C)	0.3024	288.000
Acide folique	0.0006	0.560
Niacine	0.0210	20.560
α-Tocophérol Acétate (vitamine E)	0.1008	42.000
Provitamine A (bêta carotène)	1.0000	2.100
Citrate d'ammonium ferrique	0.1250	156.000
Iodure de potassium	0.0002	0.180

\* Selon les recommandations du fabricant, soit 25 g de boisson en poudre dans 200 mL d'eau

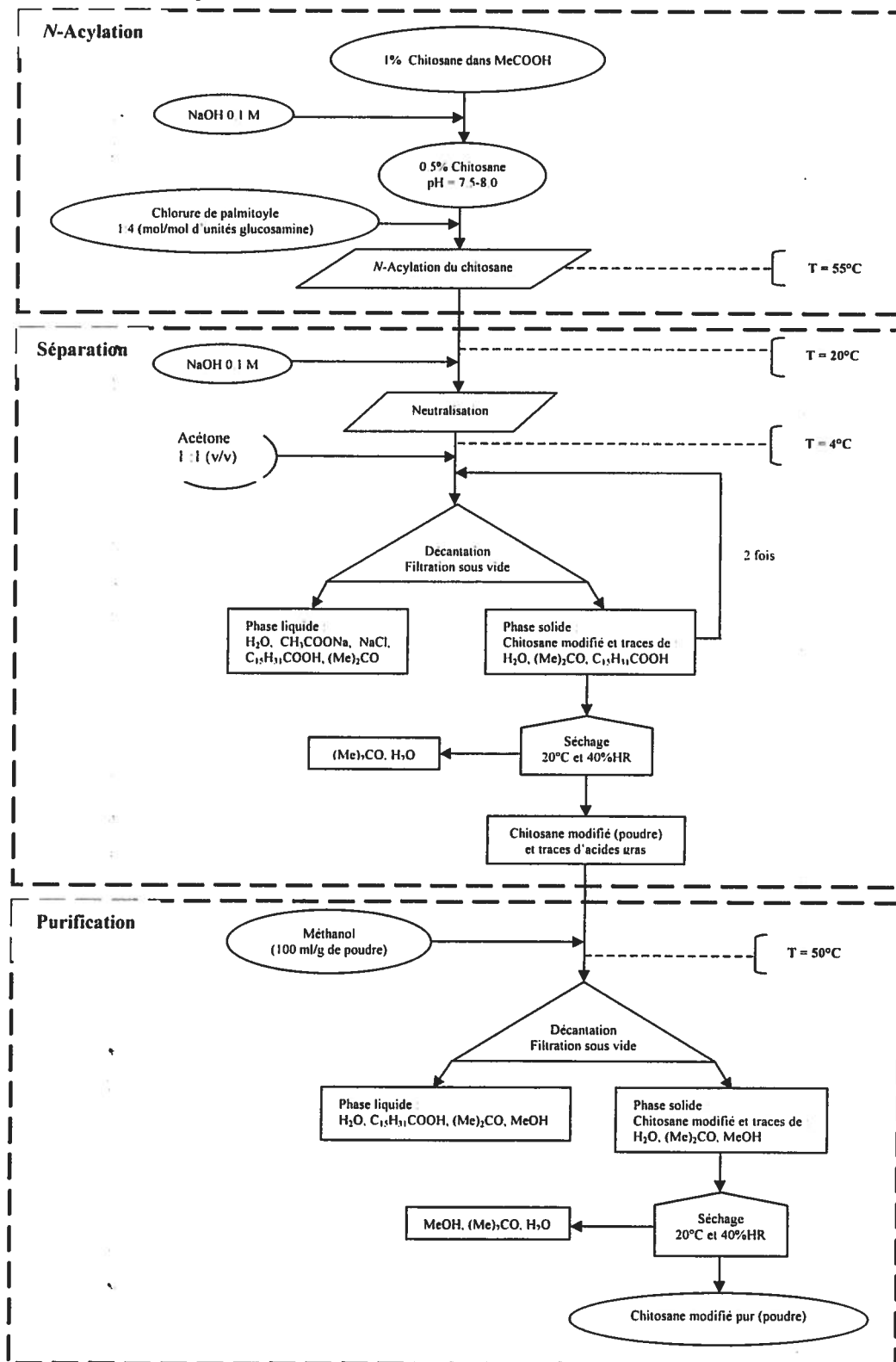
**Appendice C**  
**Fonctionnalisation des polymères**

# 1. Schéma de l'acylation de l'alginate





## 2. Schéma de l'acylation du chitosane



## 1. Cinétique d'inhibition de la croissance d'*Escherichia coli*

### 1.1. Analyse multifactorielle de la variance (ANOVA) réalisée sur les dénombrements bactériens

Facteur	Degré de liberté (dl)	p (dénombrement bactérien) =		
		Sans acide	Acide minéral	Acides organiques
Contamination	2	<0.001	<0.001	<0.001
Temps	4	0.082	<0.001	<0.001
Contamination x Temps	8	0.943	<0.001	<0.001

➤ Il n'y a pas d'effet significatif ( $p > 0.05$ ) du temps et de la contamination x temps pour l'expérience réalisée sans acide. Tous les autres effets sont significatifs ( $p \leq 0.05$ ).

### 1.2. Test de comparaison multiple des moyennes (LSD) réalisé sur les dénombrements bactériens (effet du temps de contact)

		p (dénombrement bactérien) =					
		Acide minéral			Acides organiques		
Temps 1 (min.)	Temps 2 (min.)	10 <sup>3</sup> bact./mL	10 <sup>5</sup> bact./mL	10 <sup>7</sup> bact./mL	10 <sup>3</sup> bact./mL	10 <sup>5</sup> bact./mL	10 <sup>7</sup> bact./mL
0	5	<0.001	0.050	0.038	0.027	<0.001	0.001
	10	<0.001	0.050	<0.001	0.008	<0.001	0.001
	60	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	180	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
5	10	<0.001	0.948	0.050	0.399	0.282	0.936
	60	<0.001	0.006	0.036	<0.001	<0.001	0.049
	180	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
10	60	<0.001	0.044	0.843	<0.001	<0.001	0.036
	180	<0.001	<0.001	0.003	<0.001	<0.001	<0.001
60	180	<0.001	0.028	0.004	0.001	<0.001	0.001

➤ On remarque que la différence entre les temps 5 et 10 min est souvent non significatives ( $p > 0.05$ ).

1.3. Test de comparaison multiple des moyennes (LSD) réalisé sur les dénombrements bactériens (effet du type de boisson)

Inoculum	Type de boisson 1	Type de boisson 2	p (dénombrement bactérien) =				
			T <sub>0 min</sub>	T <sub>5 min</sub>	T <sub>10 min</sub>	T <sub>60 min</sub>	T <sub>180 min</sub>
10 <sup>3</sup> bact./mL	Sans acide	Acide minéral	0.090	<0.001	<0.001	0.006	<0.001
		Acides organiques	0.081	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
		Acide minéral	0.154	0.030	0.004	0.045	1.000
10 <sup>5</sup> bact./mL	Sans acide	Acide minéral	0.332	0.032	0.022	<0.001	<0.001
		Acides organiques	0.260	0.015	0.022	<0.001	<0.001
		Acide minéral	0.080	0.940	0.719	0.547	<0.001
10 <sup>7</sup> bact./mL	Sans acide	Acide minéral	0.759	0.012	<0.001	<0.001	0.001
		Acides organiques	0.090	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
		Acide minéral	0.060	0.190	0.432	0.981	0.395

➤ Lorsque  $p = 1.000$  la différence entre les moyennes n'apparaît pas significative ( $p > 0.05$ ) car les valeurs du dénombrement bactérien sont nulles.

## 2. Cinétique d'inhibition de la croissance de *Salmonella* Typhi

### 2.1. Analyse multifactorielle de la variance (ANOVA) réalisée sur les dénombrements bactériens

Facteur	Degré de liberté (dl)	p (dénombrement bactérien) =		
		Sans acide	Acide minéral	Acides organiques
Contamination	2	<0.001	<0.001	<0.001
Temps	4	0.072	<0.001	<0.001
Contamination x Temps	8	0.340	<0.001	<0.001

➤ Il n'y a pas d'effet significatif ( $p > 0.05$ ) du temps et de la contamination x temps pour l'expérience réalisée sans acide. Tous les autres effets sont significatifs ( $p \leq 0.05$ ).

### 2.2. Test de comparaison multiple des moyennes (LSD) réalisé sur les dénombrements bactériens (effet du temps de contact)

		p (dénombrement bactérien) =					
		Acide minéral			Acides organiques		
Temps 1 (min.)	Temps 2 (min.)	10 <sup>3</sup> bact./mL	10 <sup>5</sup> bact./mL	10 <sup>7</sup> bact./mL	10 <sup>3</sup> bact./mL	10 <sup>5</sup> bact./mL	10 <sup>7</sup> bact./mL
0	5	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.003	<0.001
	10	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	60	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	180	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
5	10	<0.001	0.334	0.858	1.000	<0.001	<0.001
	60	<0.001	<0.001	0.050	1.000	<0.001	<0.001
	180	<0.001	<0.001	0.011	<0.001	<0.001	<0.001
10	60	<0.001	<0.001	0.028	1.000	0.009	<0.001
	180	<0.001	<0.001	0.031	<0.001	<0.001	<0.001
60	180	<0.001	<0.001	0.016	<0.001	<0.001	<0.001

➤ Les différences entre 5, 10 et 60 min. ne sont pas significatives ( $p > 0.05$ ) pour l'expérience "10<sup>3</sup> bact. / mL – acides organiques".

2.3. Test de comparaison multiple des moyennes (LSD) réalisé sur les dénombrements bactériens (effet du type de boisson)

Inoculum	Type de boisson 1	Type de boisson 2	p (dénombrement bactérien) =				
			T <sub>0 min</sub>	T <sub>5 min</sub>	T <sub>10 min</sub>	T <sub>60 min</sub>	T <sub>180 min</sub>
10 <sup>3</sup> bact./mL	Sans acide	Acide minéral	0.973	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
		Acides organiques	0.129	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	Acide minéral	Acides organiques	0.117	<0.001	<0.001	<0.001	1.000
10 <sup>5</sup> bact./mL	Sans acide	Acide minéral	0.146	0.001	0.001	0.005	<0.001
		Acides organiques	0.343	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	Acide minéral	Acides organiques	0.959	0.227	<0.001	0.003	<0.001
10 <sup>7</sup> bact./mL	Sans acide	Acide minéral	0.220	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
		Acides organiques	0.614	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	Acide minéral	Acides organiques	0.110	0.070	<0.001	<0.001	<0.001

➤ Lorsque p = 1.000 la différence entre les moyennes n'apparaît pas significative (p>0.05) car les valeurs du dénombrement bactérien sont nulles.

### 3. Cinétique d'inhibition de la croissance de *Serratia liquefaciens*

#### 3.1. Analyse multifactorielle de la variance (ANOVA) réalisée sur les dénombrements bactériens

Facteur	Degré de liberté (dl)	p (dénombrement bactérien) =		
		Sans acide	Acide minéral	Acides organiques
Contamination	2	<0.001	<0.001	<0.001
Temps	4	0.482	<0.001	<0.001
Contamination x Temps	8	0.691	<0.001	<0.001

➤ Il n'y a pas d'effet significatif ( $p > 0.05$ ) du temps et de la contamination x temps pour l'expérience réalisée sans acide. Tous les autres effets sont significatifs ( $p \leq 0.05$ ).

#### 3.2. Test de comparaison multiple des moyennes (LSD) réalisé sur les dénombrements bactériens (effet du temps de contact)

		p (dénombrement bactérien) =					
		Acide minéral			Acides organiques		
Temps 1 (min.)	Temps 2 (min.)	$10^3$ bact./mL	$10^5$ bact./mL	$10^7$ bact./mL	$10^3$ bact./mL	$10^5$ bact./mL	$10^7$ bact./mL
0	5	<0.001	0.050	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	10	<0.001	0.050	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	60	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	180	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
5	10	<0.001	0.028	<0.001	1.000	0.403	0.098
	60	<0.001	0.006	<0.001	1.000	<0.001	<0.001
	180	<0.001	<0.001	<0.001	1.000	<0.001	<0.001
10	60	<0.001	0.044	<0.001	1.000	<0.001	<0.001
	180	<0.001	<0.001	<0.001	1.000	<0.001	<0.001
60	180	<0.001	0.948	<0.001	1.000	1.000	1.000

➤ Les différences pour lesquelles  $p = 1.000$  ne sont pas significatives ( $p > 0.05$ ) puisque qu'elles correspondent à des différences entre des dénombrements bactériens nuls.

3.3. Test de comparaison multiple des moyennes (LSD) réalisé sur les dénombrements bactériens (effet du type de boisson)

Inoculum	Type de boisson 1	Type de boisson 2	p (dénombrement bactérien) =				
			T <sub>0</sub> min	T <sub>5</sub> min	T <sub>10</sub> min	T <sub>60</sub> min	T <sub>180</sub> min
10 <sup>3</sup> bact./mL	Sans acide	Acide minéral	0.637	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
		Acides organiques	1.000	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	Acide minéral	Acides organiques	0.637	<0.001	<0.001	<0.001	1.000
10 <sup>5</sup> bact./mL	Sans acide	Acide minéral	0.103	<0.001	0.006	<0.001	<0.001
		Acides organiques	0.394	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	Acide minéral	Acides organiques	0.096	0.212	0.013	<0.001	<0.001
10 <sup>7</sup> bact./mL	Sans acide	Acide minéral	0.260	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
		Acides organiques	0.219	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	Acide minéral	Acides organiques	0.268	<0.001	0.038	<0.001	<0.001

➤ Lorsque  $p = 1.000$  la différence entre les moyennes n'apparaît pas significative ( $p > 0.05$ ) car les valeurs du dénombrement bactérien sont nulles.

#### 4. Cinétique d'inhibition de la croissance du mélange bactérien

##### 4.1. Analyse multifactorielle de la variance (ANOVA) réalisée sur les dénombrements bactériens

Facteur	Degré de liberté (dl)	p (dénombrement bactérien) =		
		Sans acide	Acide minéral	Acides organiques
Contamination	2	<0.001	<0.001	<0.001
Temps	4	0.079	<0.001	<0.001
Contamination x Temps	8	0.322	<0.001	<0.001

➤ Il n'y a pas d'effet significatif ( $p > 0.05$ ) du temps et de la contamination x temps pour l'expérience réalisé sans acide. Tous les autres effets sont significatifs ( $p \leq 0.05$ ).

##### 4.2. Test de comparaison multiple des moyennes (LSD) réalisé sur les dénombrements bactériens (effet du temps de contact)

		p (dénombrement bactérien) =					
		Acide minéral			Acides organiques		
Temps 1 (min.)	Temps 2 (min.)	$10^3$ bact./mL	$10^5$ bact./mL	$10^7$ bact./mL	$10^3$ bact./mL	$10^5$ bact./mL	$10^7$ bact./mL
0	5	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001
	10	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.004
	60	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	180	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
5	10	<0.001	<0.001	0.195	0.001	<0.001	0.877
	60	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	180	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
10	60	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	<0.001	<0.001
	180	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
60	180	1.000	<0.001	<0.001	1.000	1.000	0.010



4.3. Test de comparaison multiple des moyennes (LSD) réalisé sur les dénombrements bactériens (effet du type de boisson)

Inoculum	Type de boisson 1	Type de boisson 2	p (dénombrement bactérien) =				
			T <sub>0 min</sub>	T <sub>5 min</sub>	T <sub>10 min</sub>	T <sub>60 min</sub>	T <sub>180 min</sub>
10 <sup>3</sup> bact./mL	Sans acide	Acide minéral	0.989	0.029	<0.001	<0.001	<0.001
		Acides organiques	0.603	0.003	<0.001	<0.001	<0.001
	Acide minéral	Acides organiques	0.569	0.400	0.051	1.000	1.000
10 <sup>5</sup> bact./mL	Sans acide	Acide minéral	0.089	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
		Acides organiques	0.412	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	Acide minéral	Acides organiques	0.187	0.052	0.204	<0.001	1.000
10 <sup>7</sup> bact./mL	Sans acide	Acide minéral	0.607	0.013	0.002	<0.001	<0.001
		Acides organiques	0.607	0.004	<0.001	<0.001	<0.001
	Acide minéral	Acides organiques	0.988	0.006	0.033	<0.001	<0.001

➤ Lorsque p = 1.000 la différence entre les moyennes n'apparaît pas significative (p>0.05) car les valeurs du dénombrement bactérien sont nulles.

## 5. pH et concentration de la forme non dissociée des acides organiques des expériences réalisées avec *Escherichia coli*

### 5.1. Analyse multifactorielle de la variance (ANOVA) réalisée sur les valeurs de pH

Facteur	Degré de liberté (dl)	p (pH) =		
		Sans acide	Acide minéral	Acides organiques
Contamination	2	0.548	0.058	0.958
Temps	4	0.397	0.328	0.154
Contamination x Temps	8	0.143	0.742	0.883

➤ L'effet du degré de contamination initial n'étant pas significatif ( $p > 0.05$ ), les analyses sont effectuées sur la moyenne des pH des 3 inoculums).

### 5.2. Test de comparaison multiple des moyennes (LSD) réalisé sur les valeurs de pH (effet du type de boisson)

Type de boisson 1	Type de boisson 2	p (dénombrement bactérien) =
Sans acide	Acide minéral	0.018
	Acides organiques	0.045
Acide minéral	Acides organiques	0.931

➤ Seule la différence entre l'acide minéral et les acides organiques est significative ( $p \leq 0.05$ )

## 6. pH des expériences réalisées avec *Salmonella* Typhi

### 6.1. Analyse multifactorielle de la variance (ANOVA) réalisée sur les valeurs de pH

Facteur	Degré de liberté (dl)	p (pH) =		
		Sans acide	Acide minéral	Acides organiques
Contamination	2	0.207	0.054	0.076
Temps	4	0.128	0.241	0.127
Contamination x Temps	8	0.644	0.279	0.387

➤ L'effet du degré de contamination initial n'étant pas significatif ( $p > 0.05$ ), les analyses sont effectuées sur la moyenne des pH des 3 inoculums).

### 6.2. Test de comparaison multiple des moyennes (LSD) réalisé sur les valeurs de pH (effet du type de boisson)

Type de boisson 1	Type de boisson 2	p (dénombrement bactérien) =
Sans acide	Acide minéral	0.036
	Acides organiques	0.016
Acide minéral	Acides organiques	0.546

➤ Seule la différence entre l'acide minéral et les acides organiques est significative ( $p \leq 0.05$ )

## 7. pH et concentration de la forme non dissociée des acides organiques des expériences réalisées avec *Serratia liquefaciens*

### 7.1. Analyse multifactorielle de la variance (ANOVA) réalisée sur les valeurs de pH

Facteur	Degré de liberté (dl)	p (pH) =		
		Sans acide	Acide minéral	Acides organiques
Contamination	2	0.138	0.078	0.254
Temps	4	0.373	0.233	0.051
Contamination x Temps	8	0.511	0.752	1.000

➤ L'effet du degré de contamination initial n'étant pas significatif ( $p > 0.05$ ), les analyses sont effectuées sur la moyenne des pH des 3 inoculums).

### 7.2. Test de comparaison multiple des moyennes (LSD) réalisé sur les valeurs de pH (effet du type de boisson)

Type de boisson 1	Type de boisson 2	p (dénombrement bactérien) =
Sans acide	Acide minéral	0.008
	Acides organiques	0.039
Acide minéral	Acides organiques	0.899

➤ Seule la différence entre l'acide minéral et les acides organiques est significative ( $p \leq 0.05$ )

## 8. pH et concentration de la forme non dissociée des acides organiques des expériences réalisées avec le mélange bactérien

### 8.1. Analyse multifactorielle de la variance (ANOVA) réalisée sur les valeurs de pH

Facteur	Degré de liberté (dl)	p (pH) =		
		Sans acide	Acide minéral	Acides organiques
Contamination	2	0.371	0.160	0.196
Temps	4	0.292	0.212	0.071
Contamination x Temps	8	0.587	0.926	0.895

➤ L'effet du degré de contamination initial n'étant pas significatif ( $p > 0.05$ ), les analyses sont effectuées sur la moyenne des pH des 3 inoculums).

### 8.2. Test de comparaison multiple des moyennes (LSD) réalisé sur les valeurs de pH (effet du type de boisson)

Type de boisson 1	Type de boisson 2	p (dénombrement bactérien) =
Sans acide	Acide minéral	0.001
	Acides organiques	0.029
Acide minéral	Acides organiques	0.792

➤ Seule la différence entre l'acide minéral et les acides organiques est significative ( $p \leq 0.05$ )

## 9. Caractérisation des billes

### 9.1. Analyse multifactorielle de la variance (ANOVA)

<b>Facteur</b>	<b>Degré de liberté (dl)</b>	<b>p (FR) =</b>	<b>p (DR) =</b>	<b>p (visco) =</b>
Nature du polymère	1	<0.001	0.197	<0.001
Fonctionnalisation	1	0.725	0.030	<0.001
Polym. x Fonct.	1	0.784	0.001	0.850

### 9.2. Analyse multifactorielle de la variance (ANOVA) réalisé sur les valeurs de la perméabilité de l'eau

<b>Facteur</b>	<b>Degré de liberté (dl)</b>	<b>p (perméabilité à la vapeur d'eau) =</b>
Nature du polymère	1	<0.001
Fonctionnalisation	1	<0.001
Polym. x Fonct.	1	0.099

9.3. Analyse multifactorielle de la variance (ANOVA) réalisé sur les valeurs de gonflement des billes

<b>Facteur</b>	<b>Degré de liberté (dl)</b>	<b>p (perméabilité à la vapeur d'eau) =</b>
Nature du polymère	1	<0.001
Fonctionnalisation	1	<0.001
Temps	15	<0.001
Polym. x Fonct.	1	<0.001
Polym. x Temps	15	<0.001
Fonct. x Temps	15	<0.001
Polym. x Fonct. x Tps	15	0.194

9.4. Analyse multifactorielle de la variance (ANOVA) réalisé sur les valeurs de concentration des micronutriments encapsulés au cours des 6 mois de stockage

<b>Facteur</b>	<b>Degré de liberté (dl)</b>	<b>p (Vit C) =</b>	<b>p (pro Vit A) =</b>	<b>p (Fer) =</b>
Nature du polymère	1	0.023	0.001	<0.001
Fonctionnalisation	1	0.047	0.031	0.005
Temps	8	0.016	0.009	0.004
Polym. x Fonct.	1	0.007	0.045	0.019
Polym. x Temps	8	0.015	0.021	0.009
Fonct. x Temps	8	0.034	0.049	0.034
Polym. x Fonct. x Tps	8	0.048	0.037	0.050

9.5. Analyse multifactorielle de la variance (ANOVA) réalisé sur les valeurs de libération contrôlée des micronutriments encapsulés

<b>Facteur</b>	<b>Degré de liberté (dl)</b>	<b>p (Fer) =</b>	<b>p (Vit C) =</b>	<b>p (pro Vit A) =</b>
Nature du polymère	1	<0.001	<0.001	<0.001
Fonctionnalisation	1	<0.001	<0.001	<0.001
Temps	1	<0.001	<0.001	<0.001
Polym. x Fonct.	1	<0.001	<0.001	<0.001
Polym. x Temps	10	<0.001	<0.001	<0.001
Fonct. x Temps	10	<0.001	<0.001	<0.001
Polym. x Fonct. x Tps	10	<0.001	<0.001	<0.001



## Liste des références

AHMED S.A., B. A. HOQUE et A. MAHMUD. 1998. "Water management practices in rural and urban homes: a case study from Bangladesh on ingestion of polluted water". Public Health, vol. 112, p. 317-321.

ALBALÀ-HURTADO S., M. T. VECIANA-NOGUÉS, M. IZQUIERDO-PULIDO et A. MARINÉ-FONT. 1997. "Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography". Journal of Chromatography A, 778, p. 247-253.

ALLEN, L. H. 2002. "Iron supplements: scientific issues concerning efficacy and implications for research and programs." Journal of Nutrition, vol. 132, p. 813S -819S

ANAND S.K., R. S. SINGH. 1988. "Bacteriological quality of rural potable water". Indian journal of medical sciences, vol. 42, p. 205-208.

ARROYAVE G. 1987. "Alternative strategies with emphasis on food fortification". ACC/SCN State-of-the-art Series, Discussion Paper, p. 87-91.

ATTIG G. A., S. SMITASRI et K. D. ITTIKAM. 1993. "Promoting home gardening to control Vitamin A deficiency in NE Thailand". Food Nutrition and Agriculture, vol. 7, p. 18-25.

AUGUSTINOS M. T., S. N. VENTER et R. KFIR. 1995. "Assessment of water quality problems due to microbial growth in drinking water distribution systems". Environmental Toxicology and Water Quality, vol. 10, p. 295-299.

- AUERNFEIND J.C. et E. DE RITTER. 1991. "Food considered for nutrient addition". Nutrient addition to food, éd. JC Bauernfeind and PA Lachance, Food and Nutrition Press, Connecticut.
- BEAULIEU L., L. SAVOIE, P. PAQUIN et M. SUBIRADE. 2001. "Elaboration and characterization of whey protein beads by an emulsification/cold gelation process: application for the protection of retinol". Biomaterials, vol. 3, p. 239-248.
- BERGLUND P. T., J. W. DICK et M. L. DREHER. 1987. "Effect on enrichment and iron on thiamine, riboflavin and niacinamide, and cooking parameters of enriched spaghetti". Journal of Food Science, vol. 52, p. 1376-1377.
- BRACCINI I. et S. PEREZ. 2001. "Molecular basis of Ca<sup>++</sup>-induced gelation in alginates and pectin: the egg-box model revisited". Biomacromolecules, vol. 2, p. 1089-1096.
- CERVINSKA J. et M. LOTFI. 1996 "Vitamin A deficiency: key resources in its prevention and elimination". The Micronutrient Initiative information paper n°1.
- CHAUDHURI M. et S.A. SATTAR. 1990. "Domestic water treatment for developing countries". World Health Organisation. Technical report.
- CHEN H. E., H. Y. PENG et B. H. CHEN. 1996. "Stability of carotenoids and vitamin A during storage". Food Chemistry, vol. 57, p. 497-503.
- COFFIN E. 1994. "Étude du rôle des bactéries hétérotrophes et des virus entériques humains dans les gastro-entérites associées à l'eau de consommation". Mémoire de maîtrise, Institut Armand-Frappier, Laval, 94 p.
- COUTURE B. 1997. Bactériologie médicale, 3<sup>ème</sup> édition, éd. Décarie, 423 p.

DARY O, M. GUAMUCH, P. NESTEL. 1988. "Recovery of retinol in soft-drink beverages made with fortified unrefined and refined sugar : Implications for national fortification programs". Journal of Food Composition and Analysis, vol. 11, p.212-220.

DE LORENZI G., C. VOLTA et L. MONJOUR. 1989. "Application de la désinfection solaire à l'eau de boisson en milieu tropical". Bulletin de la Société de Pathologie exotique, vol. 82, p. 255-259.

DE OLIVEIRI J.E., M.M. SCHEID, I.D. DESAI et D. MARCHINI. 1996. "Iron fortification of domestic drinking water to prevent anemia among low socioeconomic families in Brazil". International Journal of Food Science and Nutrition, vol. 47, p. 213-219.

DICKSON J. S. et M. E. ANDERSON. 1992. "Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: a review". Journal of Food Protection, vol. 55, p.133-140.

EDWARDS-LÉVY F. et M.-C. LÉVY. 1999. "Serum albumin-alginate coated beads: mechanical properties and stability". Biomaterials, vol. 20, p. 2069-2084.

EPLER K. S., E. G. ZIEGLER et N. E. CRAFT. 1993. "Liquid chromatographic method for the determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human serum and in food". Journal of Chromatography, 619, p. 37-48.

FAO/WHO. 1994. Codex Alimentarius, vol. 4, 2nd edition.

FIDLER M. C., L. DAVIDSSON, C. ZEDER, T. WALCZYK et R. F. HURELL. 2003. "Iron absorption from ferrous fumarate in adult women is influenced by ascorbic acid but not by Na<sub>2</sub>EDTA". British Journal of Nutrition, vol. 90, p. 1081-1085.

FRANCO R. M., R. ROCHA-EBERHARDT et R. CANTUSIO NETO. 2001. "Occurrence of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil". Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, vol. 43, p. 109-111.

GARCIA-CASAL M. N., M. LARYSSE, L. SOLANO, M. A. BARON, F. ARGUELLO, D. LLOVERA, J. RAMIREZ, I. LEETS et E. TROPPER. 1998. "Vitamine A and beta-carotene can improve nonheme iron absorption from rice, wheat and corn by humans". Journal of Nutrition, vol. 128, p. 646-650.

GELDREICH E. E. 1991. Environmental Toxicology of Water Quality, vol. 6, p.209-223

GENTHE B., N. STRAUSS, J. SEAGER, C. VUNDULE, F. MAFORAH, et R. KFIR. 1997. "The effect of type of water supply on water quality in a developing community in South Africa". Water Sciences technology, vol. 35, p. 35-40.

GIMENEZ R., C. CABRERA, M. OLALLA, M. D. RUIZ et M. C. LOPEZ. 2002 "Ascorbic acid in diet supplements: loss in the manufacturing process and storage". International Journal of Food Science and Nutrition, vol. 53, p. 509-518.

GONTARD N., S. GUILBERT et J.-L. CUQ. 1992. "Edible wheat gluten films : influence of the main process variables on film properties using response surface methodology". Journal of food science, vol. 57, p.190-195.

GOVERED K. A., BEECH F. W., HOBBS R. P. et SHANNON R. 1979. "The occurrence and survival of coliforms and salmonellas in apple juice and cider". Journal of applied microbiology, vol. 46, p 521-530.

GUERRANT R. L. et D. A. BOBAK. 1991. " Bacterial and protozoal gastroenteritis". New Engl. Journal of Medecine. Vol. 325, p. 327-340.

HALLEBERG L., M. BRUNE et L. ROSSANDER. 1986. "Effect of ascorbic acid on iron absorption from different types of meal. Studies with ascorbic-acid-rich foods and synthetic ascorbic acid given in different amount with different meals". Human Nutrition: Clinical Nutrition, vol. 40, p. 97-113.

HARRIS R. S. 1988. Nutritional Evaluation of Food Processing, troisième édition, édité par E. Karmas, publié par Van Nostrand Reinhold Company, New-York, USA.

ICMSF (International commission on microbiological specifications for foods). 1980. "Factors affecting life and death of microorganisms. microbial ecology of foods". Academic Press vol. 1

INGRAM C. W. et K. H. WILSON. 1990. "Bacterial diarrheas" dans Gastrointestinal infections in the tropics, édité par V. K. Rustgi, p. 206-223.

INTERNATIONAL NUTRITION FOUNDATION (INF) AND THE MICRONUTRIENT INITIATIVE. 1998. "Preventing iron deficiency in women and children: background and consensus on key technical issues and resources for advocacy, planning and implementing national programs". Unicef / WHO / MI, technical workshop, New York, USA.

JONNALAGADDA P. R. et R. V. BHAT. 1995. "Parasitic contamination of stored water used for drinking / cooking in Hyderabad". Southeast Asian Journal of Tropical Public Health, vol. 26, p. 789-794.

KNORR D. et M. DALY. 1988. "Mechanics and diffusional changes observed in multilayer chitosan/alginate coacervate capsules". Process in Biochemistry, vol. 23, p. 48-50.

KOIDE K. et M. KAREL. 1987. "Encapsulation and stimulated release of enzymes using lecithin vesicles". International Journal of Food Science and Technology, vol. 22, p. 707.

KRAMER A. 1977. "Effects of storage on nutritive value of food". Journal of Food Quality, vol. 1, p. 23-55.

LAVIGNE C., J. A. ZEE, R. E. SIMARD et C. GOSSELIN. 1987. "High-performance liquid chromatographic-diode-array determination of ascorbic acid, thiamine and riboflavin in goats' milk". Journal of Chromatography A, 410, p. 201-205.

LECLERC H., L. SCHARWTZBROD et E. DEI-CAS. 2002. "Microbial agents associated with waterborne diseases". Critical Reviews in Microbiology, vol. 28, p. 371-409.

LE TIEN, C., M. LACROIX, M. A. MATEESCU et P. SZABO. 2001. "Biocompatible composition as carrier or excipient for pharmaceutical and nutraceutical formulations and for food protection". Patent application / PCT 869192-1.

MACHLIN L. J. et E. GABRIEL. 1980. "Interactions of vitamin E with vitamin C, vitamin B<sub>12</sub> and zinc". Dans Micronutrient interactions: Vitamins, Minerals and Hazardous Elements, Annals of the New-York Academy of Sciences, vol. 355, p. 98-108.

MACLER B. A. et J. C. MERKLE. 2000. "Current knowledge on groundwater microbial pathogens and their control". Hydrogeology Journal, vol. 8, p. 29-40.

MAHALANABIS D. et M. K. BHAN. 2001. "Micronutrients as adjunct therapy of acute illness in children: impact on the episode outcome and policy implications of current findings". British Journal of Nutrition, vol. 85, p. S151-S158.

MAHROUR A., M. LACROIX, J. NKETSA-TABIRI, N. CALDERON et M. GAGNON. 1998a. "Antioxidant properties of natural substances in irradiated fresh poultry". Radiation Physics and Chemistry, vol. 52, p. 77-80.

MAHROUR A., J. NKETSA-TABIRI, N. CALDERON et M. LACROIX. 1998b. "Antimicrobial properties of natural substances in irradiated fresh poultry". Radiation Physics and Chemistry, vol. 52, p. 81-84.

MANNAR V. 1991. "Fortification of foods to combat micronutrient deficiencies". Proceedings of Ending the Hidden Hunger, p. 35-47.

MARTIN G. 1986. "Évaluation toxicologique et nutritionnelle des alginate : définition, structure, fabrication, propriétés et application". Dans Sciences des Aliments – Journal International de Science et de Technologie des Aliments, vol. 6, p. 473-486.

MEGRAUD G., D. CHEVRIER, N. DESPLACES, A. SEDALLIAN et J. L. GUESDON. 1988. "Urease-positive thermophilic *Campylobacter* (*Campylobacter laridis* variant) isolated from an appendix and from human feces". Journal of Clinical Microbiology, vol. 26, p. 1050 et 1051.

MERCK RESEARCH LABORATORIES (éd.). 1996. The Merck Index, an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 2<sup>nd</sup> edition, Whitehouse Station, New Jersey.

MONJOUR L.. 1994. "Eau potable et santé : actions prioritaires en milieu tropical". Colloque scientifique et technique international Hydrotop, Marseille, 12-15 avril 1994.

MONJOUR L.. 1998. "Eau et santé – L'eau polluée le plus grand fléau du monde". Eau et développement durable, la Houille Blanche, vol. 2, p. 29-33.

MONJOUR L., C. VOLTA, N. UWECHUE et G. DE LORENZI. 1990. "Evaluation of traditional filters for water purification in Burkina Faso". Ann. Soc. Belge Med. Trop., vol. 70, p. 311-315.

MORENO G. 2000. "Formulation et caractérisation d'une matrice polyssacharidique biocompatible pour applications alimentaires et biomédicales". Rapport de stage, INRS - Institut Armand-Frappier, 67 p.

MORRIS R. D., E. N. NAUMOVA, R. LEVIN et R. L. MUNASINGHE. 1996. "Temporal variation in drinking water turbidity and diagnosed gastroenteritis in Milwaukee." American Journal of Public Health, vol. 86, p. 237-239.

MORTIMORE S. et C. WALLACE. 1996. "HACCP : guide pratique." Édition Polytechnica, p. 56-59.

MURATA Y., K. NAKADA, E. MYAMOTO, S. KAWASHIMA et S. H. SEO. 1993. "Influence of erosion of calcium-induced alginate gel matrix on the release of brilliant blue." Journal of Control Release, vol. 23, p. 21-26.

NADIGER H. A., K. A. KRISHNAMACHARI A. N. NAIDU B. S. RAO et S. G. SRIKANTIA. 1980. "The use of common salt (sodium chloride) fortified with iron to control anemia: results of a preliminary study". British Journal of Nutrition, vol. 43, p. 45-51.

NESTEL P. 1993. "Food fortification in developing countries". U.S. Agency for International Development.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. 1994. "Aspects microbiologiques" Directives de qualité pour l'eau de boisson, 2<sup>ème</sup> édition, vol. 1: Recommandations, Genève, p. 8-30.



ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. 1996. Organisation mondiale de la santé, Genève.

OUATTARA B., R. E. SIMARD R. A. HOLLEY G. J.-P. PIETTE et A. BÉGIN. 1997. "Inhibitory Effect of Organic Acids upon Meat Spoilage Bacteria". Journal of Food Protection, vol. 60, p.246-253.

PANDEY B. N., S. K. MISHRA, S. YADAV et P. D. SHARMA. 1998. "An assessment of water quality of Purnia in relation to its impact on public health". Journal of Environment and Pollution, vol. 5, p. 259-263.

PANDYA Y. et D. KNORR. 1991. "Diffusion characteristics and properties of chitosane coacervate capsules". Process in Biochemistry, vol. 26, p. 75-81.

PREMKUMAR K., et C. L. BOWLUS. 2004. "Ascorbic Acid Does Not Increase the Oxidative Stress Induced by Dietary Iron in C3H Mice". Journal of Nutrition, vol 134, p. 435-438.

RAMTEKE P. W., J. W. BHATTACHARJEE, S. P. PATHAK et N. KALRA. 1992 "Evaluation of coliforms as indicators of water quality in India". Journal of Applied Bacteriology, vol. 72, p. 352-356.

RÉFÉRENCE 1 : <http://www.ac-clermont.fr/etabliss/mauriac/eau-pvd.htm>

RÉFÉRENCE 2 : [http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgsp/msds-ftss/index\\_f.html](http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgsp/msds-ftss/index_f.html)

RÉFÉRENCE 3 : <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ss/serratia.html>

RÉFÉRENCE 4 : [http://dgrwww.epfl.ch/GS/genie\\_san/res\\_wa/5.html](http://dgrwww.epfl.ch/GS/genie_san/res_wa/5.html)

RÉFÉRENCE 5 : <http://www.nutrisana.com/html/article1.html>

RÉFÉRENCE 6 : <http://www.phlebologie.com/fr/html/bref/1999/3-1999.html>

RÉFÉRENCE 7 : <http://www.gelken.com/fr/APPFR.html>

RÉFÉRENCE 8 : <http://www.micronutrient.org/framesets/search.htm>

REGNAULT R. 1998. Microbiologie générale

REIFF F. M., M. ROSES, L. VENCZEL, R. QUICK et V. M. WITT. 1997. "Low-cost safe water for the world : a practical interim solution". Journal of Public Health Policy, vol.17, p.389-408.

RENNER E. 1988. "Storage stability and some nutritional aspects of milk powders and ultra high temperature products at high ambient temperatures". Journal of Dairy Research, vol.55, p. 125-142.

ROCHE. 2001. "Points d'intérêts sur les vitamines". Programme d'information sur les vitamines, 35 p.

SABATO S. F., B. OUATTARA, H. YU, G. D'APRANO, C. LE TIEN, M. A. MATEESCU et M. LACROIX. 2001. "Mechanical and barrier properties of cross-linked soy and whey protein based films". Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 49, p. 1397-1403.

SACK R. B. 1975. "Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*". Annual Review of Microbiology, vol. 29, p. 333-353.

SANTÉ CANADA. 1996. "Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada". 6<sup>ième</sup> édition, 102 pp.

SCHEIDER W. L. 1985. La nutrition, édité par Mc graw-Hill, Montréal, 548 p.

SCHMITT C., C. SANCHEZ, S. DESOBRY-BANON et J. HARDY. 1998. "Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review". Critical review in Food Science and Nutrition, vol. 38, p. 689-753.

SHAHIDI F. et X.-Q. HAN. 1993. "Encapsulation of food ingredients". Critical Review in Food Science and Nutrition, vol. 33, p. 501-547.

SHAW R. D. 1990. "Viral gastroenteritis". Dans Gastrointestinal infections in the tropics, édité par V. K. Rustgi.

SHEARS P., M. A. HUSSEIN, A. H. CHOWDHURY et K. Z. MAMUN. 1995. "Water sources and environmental transmission of multiply resistant enteric bacteria in rural Bangladesh". Annals of Tropical Medicine and Parasitology, vol. 89, p. 297-303.

SIMANGO C. et RUKURE G. 1992. "Survival of bacterial pathogens in traditional fermented foods". Journal of applied bacteriology, vol. 73, p. 37-40.

SLOMS J. 1986. "Interaction of non-volatile and volatile substances in food". Dans Interactions of Food Components, édité par Elsevier, Londres, p. 189.

SMITASIRI S. 1991. "Encouraging production and consumption of micronutrient rich foods". Proceedings of 'Ending the Hidden Hunger, p. 49-70.

SUBBANNAYYA K., G. KUMARI et P. G. SIVANANDA. 1990. "Amoebiasis - review". Arogya Journal of Health Sciences, vol. 16, p. 109-115.

TAKKA S. et F. ACARTURK. 1999. " Calcium alginate microparticles for oral administration: I: Effect of sodium alginate type on drug release and drug entrapment efficiency". Journal of Microencapsulation, vol. 16, p. 275-290.

TCHOUNWOU P.B., D. M. LANTUM, A. MONKIEDJE, I. TAKOUGANG et P. BARBAZAN. 1997. "The urgent need for environmental sanitation and safe drinking water supply in Mbandjock, Cameroon". Archives of Environmental Contamination and toxicology, vol. 33, p. 17-22.

THE UNITED STATE PHARMACOPIA. 1990. 22<sup>th</sup> revision.

THURMAN R., B. FAULKNER, D. VEAL, G. CRAMER et M. MEIKLEJOHN. 1998. " Water quality in rural Australia". Journal of Applied Microbiology, vol. 84, p. 627-632.

WIEMER K. 1995. "Impact of fortification on nutrient intake of the US population". Abs. ILSI Annual Meeting Jan 22-26, Cancun, Mexico.