

INRS-Institut Armand-Frappier

Stratégies technologiques utilisées pour
améliorer la viabilité et la rétention de
bactéries probiotiques dans le fromage
cheddar frais

Par
Marie-Hélène Fortin

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne:

Nicolas Doucet (centre INRS-Institut
Armand-Frappier)

Examineur externe:

Pascal Audet (Université de Moncton- École
des sciences des aliments, de nutrition et
d'études familiales)

Directrice de recherche:

Monique Lacroix (centre INRS-Institut
Armand-Frappier)

Codirecteur de recherche:

Claude Champagne (Centre de recherches
et développement sur les aliments)

Résumé

La population mondiale devient de jour en jour plus conscientisée aux problèmes que peuvent entraîner de mauvaises habitudes de vie comme un manque d'exercices ou une alimentation riche en gras et sucres, mais pauvre en fibres et vitamines. Les gens ayant connaissance de ces enjeux deviennent souvent plus consciencieux dans leurs choix de vie et plus critiques sur ce qui se retrouve dans leur assiette.

Les produits nutraceutiques répondent à cette demande croissante de « produits santé », en garantissant des effets bénéfiques sur une ou plusieurs fonctions du corps, ce qui aura comme effet d'améliorer l'état de santé et le bien-être et/ou de diminuer le risque de maladie (Mattila-Sandholm et Saarela, 2003). Plusieurs types d'aliments peuvent être retrouvés en tant que produit nutraceutique; dans le cadre de cette étude, nous nous sommes penchés sur le cas du fromage cheddar supplémenté en probiotiques.

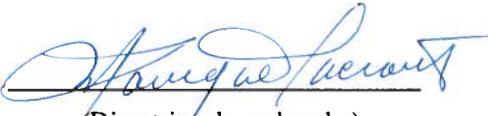
La problématique retrouvée dans le fromage est que les probiotiques ne sont pas retenus dans la matrice fromagère à de hauts niveaux, mais sont plutôt perdus dans le lactosérum tout au long de la fabrication. De plus, les essais déjà réalisés par d'autres équipes de recherche démontrent que les probiotiques ne résistent pas bien aux périodes de conservation, à cause de l'action des ferments lactiques, de la salinité, de l'acidité et de la présence d'oxygène dans le fromage.

Pour tenter de résoudre ces problèmes, différentes approches ont été testées dans cette étude : l'ajout des probiotiques à différents moments lors de la fabrication fromagère, un changement dans le taux d'inoculation, l'entreposage des fromages sous formes de grains et de blocs et la microencapsulation des cellules. La microencapsulation devrait permettre d'augmenter la rétention des probiotiques dans le caillé, de même que la viabilité des bactéries tout au long de la durée de vie du fromage, en plus d'améliorer la résistance aux enzymes digestives et à la grande acidité de l'estomac. Des résultats concluants pour l'une ou l'autre des stratégies

technologiques testées permettraient donc d'avoir des pistes de solutions pour des entreprises alimentaires qui seraient aux prises avec des problèmes de viabilité de souches probiotiques plus sensibles au cours de la fabrication ou conservation d'aliments.

La souche probiotique utilisée pour les essais a été sélectionnée selon sa sensibilité à diverses conditions retrouvées dans le fromage : *Bifidobacterium longum* 15708. Les stratégies technologiques testées n'ont pas permis d'améliorer suffisamment la viabilité de la souche au cours de la production et de l'entreposage du fromage cheddar pour permettre l'utilisation commerciale à cette fin. Les défis à relever au cours de cette étude ont démontré que le choix de la souche probiotique pour les industries alimentaires est très important, puisque la survie des bactéries dans l'aliment peut être très difficile, surtout dans le cas d'une souche probiotique sensible aux conditions retrouvées dans l'aliment.


(Étudiante)


(Directrice de recherche)

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier Dr Monique Lacroix de m'avoir donné la chance de réaliser ce beau projet dans le cadre de mes études de maîtrise et de m'avoir fait confiance. Je remercie également Dr Claude Champagne pour ses encouragements et ses conseils, de même que tous les gens qui m'ont aidé à persévérer tout au long du projet, entres autres Dr Daniel St-Gelais, Dr Michel Britten, Dr Patrick Fustier, Yves Raymond, Gaétan Bélanger, Sophie Turcot, Annie Caron, Nancy Graveline, Jacinthe Fortin, Delphine Sène, Mathieu Millette et plusieurs autres. Un merci tout spécial à Gabrielle Gagné pour ses efforts et ses travaux de grande qualité qui m'ont permis d'avancer dans ma recherche. Un grand merci également à ma famille, mes amis et à Marc pour le constant soutien et les encouragements. C'est grâce à vous tous si j'ai su persévérer dans ce projet et pour ceci, je vous remercie du fond du cœur!!

Finalement, un grand merci aux organismes qui ont subventionné le projet, dont FQRNT, MAPAQ, Novalait, Inc. et Agriculture et Agroalimentaire Canada de même qu'aux organismes qui m'ont gracieusement offert leur soutien financier par l'attribution de bourses de recherche, soit la Commission Canadienne du Lait, Novalait Inc, la Fondation Armand-Frappier et Initia.

Table des Matières

Jury d'évaluation	ii
Résumé	iii
Remerciements	v
Table des Matières	vi
Liste des Tableaux	x
Liste des Figures	xi
Liste d'abréviations	xii
Chapitre 1	1
1. Histoire	2
1.1 Les probiotiques	2
1.1.1 Définition	4
2. Description des bactéries probiotiques	4
2.1. Propriétés	5
2.2. Bactéries lactiques	6
2.3. Caractérisation des genres de bactéries probiotiques	7
2.3.1. <i>Bifidobacterium</i> sp.	7
2.3.1.1. <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12.....	10
2.3.1.2. <i>Bifidobacterium longum</i> RO175	11
2.3.1.3. <i>Bifidobacterium longum</i> 15708.....	11
2.3.1.4. <i>Bifidobacterium infantis</i> 15697	12
2.3.2. <i>Lactobacillus</i> sp.....	12
2.3.2.1. <i>Lactobacillus helveticus</i> R0052	13
2.3.3. <i>Lactococcus</i> sp.	14
2.3.4. <i>Propionibacterium</i> sp.	14
2.3.5. <i>Pediococcus</i> sp.	15
2.3.6. <i>Leuconostoc</i> sp.	16
2.3.7. <i>Streptococcus</i> sp.	16
2.3.8. <i>Saccharomyces</i> sp.	17
2.3.9. <i>Enterococcus</i> sp.....	17
2.4. Croissance des probiotiques	18
2.5. Effets bénéfiques	19
2.6. Effets négatifs	19
2.7. Principaux aliments fonctionnels	22
2.7.1. Doses recommandées	23
2.7.2. Prébiotiques	23
3. Le fromage comme matrice pour « livrer » des probiotiques	24
3.1. Moment d'addition	26
3.2. Le cheddar	27
3.3. Les défis	27
4. Immobilisation cellulaire.....	30
4.1. Un phénomène naturel	30
4.2. Types d'immobilisation cellulaire.....	31
4.2.1. Agrégation, adhésion et adsorption à des transporteurs poreux.....	31

4.2.2. Rétention des cellules à l'aide de structures préformées.....	31
4.2.3. Bioencapsulation	32
5. Encapsulation	32
5.1. Le principe.....	33
5.1.1. Immobilisation des billes de gel	34
5.1.2. Formation directe de membrane	34
5.1.3. Enrobage des billes de gel	34
5.2. Avantages de la microencapsulation	35
5.3. Désavantages de la microencapsulation	35
5.4. Comment choisir une technique de microencapsulation	37
5.5. Techniques de microencapsulation.....	38
5.5.1. Gélification ionotropique.....	38
5.5.2. Atomisation	40
5.5.2.1. « Spray-chilling » et « spray-drying »	40
5.5.2.2. « Spray-coating ».....	41
5.5.3. Émulsion.....	42
5.5.4. Séparation de phase	43
5.5.5. Techniques « à sec ».....	44
5.5.5.1. Moulinage.....	44
5.5.5.2. Extrusion.....	45
6. Choix des polymères à tester	45
6.1. Alginate	46
6.2. κ-carraghénane	48
6.3. Amidon.....	50
6.4. Gomme de gellane.....	51
6.5. Carboxymethyl cellulose.....	53
6.6. Gélatine.....	54
6.7. Pectine	55
6.8. Chitosane	56
6.9. Alcool polyvinyl.....	56
6.10. Protéines et gras laitiers.....	57
7. Aliments enrichis de probiotiques encapsulés.....	58
8. Le fromage cheddar.....	60
8.1. Histoire du fromage.....	60
8.2. Le cheddar	61
8.3. Définition du fromage cheddar selon Santé Canada	61
8.4. Marché du cheddar	62
9. Fabrication du fromage cheddar	63
9.1. Les ferments	63
9.2. L'expérimentation	64
9.3. Procédé de fabrication	65
Étape 1 : La préparation du lait	65
Étape 2 : Ensemencement des bactéries lactiques	68
Étape 3 : La coagulation du lait.....	70
Étape 4 : L'égouttage du coagulum.....	72
Étape 5 : La cuisson et le soutirage	72
Étape 6 : La cheddarisation	73

Étape 7 : Le salage	74
Étape 8 : Le moulage et le pressage	74
Étape 9 : L'affinage.....	75
9.4 Analyses fromagères	76
10. Projet	76
10.1. Problématique.....	76
10.2. Hypothèses	79
10.3. Objectifs du projet.....	79
10.4. Moyens pour atteindre les objectifs	80
Chapitre 2	83
1. Choix d'un milieu sélectif aux bifidobactéries	84
1.1 Essai de croissance	84
1.2 Essai de sélectivité en bouillon	85
1.3 Essai de sélectivité lors de fabrication en mini-fromagerie	87
1.4 Essai de sélectivité lors de fabrication fromagère	90
2. Résultats de la recherche	91
Chapitre 3	92
Effect of Time of Inoculation, Starter Addition, Oxygen Level and Salting on the Viability of Probiotic Cultures during Cheddar Cheese Production	93
1. Contribution des auteurs.....	94
2. Résumés	94
2.1 Résumé en français.....	94
2.2. Abstract	95
3. Introduction	96
4. Materials and methods	98
4.1 Cultures	98
4.2 Laboratory-scale Cheddar manufacturing system.....	100
4.3 Effect of dissolved oxygen level	101
4.4 Effect of time of inoculation of the probiotic cultures	102
4.5 Analyses	103
4.6 Calculations.....	104
4.7 Statistical analyses.....	105
5. Results and discussion.....	105
5.1 Effect of dissolved oxygen level	105
5.2 Effect of starter addition.....	109
5.3 Effect of the moment of inoculation	112
5.4 Stability during storage	114
5.5 Perspectives	116
6. Conclusion.....	117
7. Acknowledgments	118
8. References	118
Chapitre 4	122
Viability of <i>Bifidobacterium longum</i> in Cheddar Cheese Curd during Manufacture and Storage: Effect of Microencapsulation and Point of Inoculation	123
1. Contribution des auteurs.....	124
2. Résumés	125
2.1 Résumé en français.....	125

2.2 Abstract.....	126
1. Introduction	127
2. Materials and Methods	129
2.1 Cultures.....	129
2.2 Production of freeze-dried and microencapsulated probiotic cultures	130
2.3 Cheese production	131
2.4 Incorporation of probiotics during cheese manufacturing.....	132
2.5 Analyses	133
2.6 Calculations	135
2.7 Statistical analyses.....	136
3. Results and discussion.....	136
3.1 Effect of ME on viable counts during production	136
3.2 Effect of point of inoculation on viable counts during cheddar manufacturing....	139
3.3 Viable counts during storage	140
3.4 Effect of inoculation methods on the chemical composition of cheeses.....	145
3.5 Sensory analyses.....	147
4. Conclusion	147
5. Acknowledgments	149
6. References	149
Chapitre 5	152
Discussion générale	153
Conclusions générales et perspectives futures.....	160
Références	162
Appendice A	184

Liste des Tableaux

Chapitre 1

Tableau 1: Espèces de bactéries et de levures les plus communes considérées comme des probiotiques potentiels ou présentement utilisées à ce titre.....7

Tableau 2: Effets bénéfiques potentiels des probiotiques..... 20

Chapitre 2

Tableau 1: Milieux testés et résultats obtenus pour l'essai sur la croissance de *B. longum* 15708 et de ferments lactiques.....85

Tableau 2: Milieux testés et résultats obtenus pour l'essai de sélectivité en bouillon d'un mélange de *B. longum* 15708 et de ferments lactiques.....86

Tableau 3: Décomptes obtenus sur les différents milieux pour les essais de fabrication en mini-fromagerie.....88

Tableau 4: Observations microscopiques des colonies sur milieux LP et RAF après 7 jours d'entreposage.....89

Chapitre 3

Table 1: Incubation time required to prepare the various inocula and populations obtained in the cultures. Adapting the incubation time aimed the preparation of cells having similar physiological states.....106

Table 2: Viable probiotic counts, distribution and ratio from tests for the selection of an oxygen sensitive strain in starter-less cheese production (Log CFU·mL⁻¹ or CFU·g⁻¹).....107

Table 3: Effects of inoculation moment of *B. longum* 15708 and salting of the curds on viable counts in model cheese productions (bifidobacteria counts are in Log CFU·mL⁻¹ or CFU·g⁻¹).....112

Chapitre 4

Table 1: Effect of microencapsulation (ME) and of the point of inoculation on viable counts of *B. longum* 15708 (Log CFU·mL⁻¹ or g⁻¹) during cheddar cheese production.....138

Table 2: Effect of the point of inoculation on cell distribution and on the evolution of the ratio of *B. longum* 15708 cells recovered to those inoculated (Ratio R/I) during cheddar cheese production.....139

Table 3: Effect of the point of inoculation of *B. longum*, the pressing of curds as well as storage time on some cheese chemical characteristics.....143

Liste des Figures

Chapitre 1

<u>Figure 1</u> : Échelle suggérée de l'apparition de la fermentation lactique par rapport à l'évolution de l'espèce humaine	2
<u>Figure 2</u> : Elie Metchnikoff	3
<u>Figure 3</u> : Produits intermédiaires et enzymes de la voie métabolique F6PPK pour l'utilisation du glucose par les bifidobactéries.....	9
<u>Figure 4</u> : Principe de l'encapsulation	33
<u>Figure 5</u> : Structures de l'alginate.....	47
<u>Figure 6</u> : Structures des différents types de carraghénanes.....	49
<u>Figure 7</u> : Structures de l'amylose et de l'amylopectine.....	51
<u>Figure 8</u> : Structures de la gomme de gellane.....	52
<u>Figure 9</u> : Structure répétitive dans la molécule de carboxymethyl cellulose.....	53
<u>Figure 10</u> : Structure typique de la molécule de gélatine.....	54
<u>Figure 11</u> : Chaîne principale d'une molécule de pectine.....	55
<u>Figure 12</u> : Structure générale du chitosane.....	56
<u>Figure 13</u> : Structure répétitive d'une molécule d'alcool polyvinyl.....	57

Chapitre 3

<u>Figure 1</u> : Viable counts of <i>B. longum</i> 15708 in model cheese throughout storage (1 day at 22°C and 20 days at 4°C).....	115
--	-----

Chapitre 4

<u>Figure 1</u> : Effect of pressing of curds on the subsequent viability of <i>B. longum</i> 15708 during storage.....	142
<u>Figure 2</u> : Effect of the point of inoculation of <i>B. longum</i> 15708 during manufacture on the culture's stability during cheese storage.....	144

Appendice A

<u>Figure 1</u> : Viable counts of <i>B. longum</i> 15708 in model cheese throughout storage (1 day at 22°C and 20 days at 4°C).....	185
--	-----

Liste d'abréviations

AC : Acide ascorbique

ACIA / CFIA : Agence canadienne d'inspection des aliments / Canadian Food Inspection Agency

ADN : Acide désoxyribonucléique

AK : Acétokinase

ANOVA : Analyse de la variance

ATCC : American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)

ATP : Adénosine triphosphate

BHI : Milieu Brain and heart infusion, soit un bouillon à base de nutriments de cerveau et de cœur de bovins

Ca²⁺ : Cation de calcium

CaCl₂ : Chlorure de calcium

CFU ou cfu / UFC: Colony-forming unit / unité formatrice des colonies

cm : Centimètre (s)

CO₂ : Dioxyde de carbone

CO₃²⁻ : Anion carbonate

DO : Dissolved oxygen (oxygène dissous)

EDTA : Acide éthylènediaminotétraacétique sel disodique

Eq (s) : Équation (s)

F6PPK : Fructose-6-phosphate phosphocétolase

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

Fig (s) : Figure (s)

g : Gramme (s)

GDL : Gluconodeltalactone

GRAS : Generally Recognized As Safe

Groupe G-C : Guanine-Cytosine

- h : Heure (s)
- H⁺ : Cation d'hydrogène
- H₂ : Hydrogène gazeux
- H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
- HK : Hexokinase
- HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
- kg : Kilogramme (s)
- L : Litre (s)
- log : Logarithme
- LP: Milieu à base de chlorure de lithium et de propionate
- ME : Microencapsulé (microencapsulé)
- min : Minute (s)
- mg : Milligramme (s)
- mL : Millilitre (s)
- MPa : Mégapascal (10⁶ pascals)
- MRS : Milieu de Man, Rogosa et Sharpe
- MRS-Ox-Bile : Milieu de Man, Rogosa et Sharpe enrichi de bile déshydratée (oxgall (Merck & Co. #1.03756))
- nm : Nanomètre (1×10⁻⁹ mètre)
- N₂ : Azote gazeux
- O₂ : Oxygène gazeux
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- P : Probabilité (P-value)
- P/V ou W/V : poids/volume
- PCA : Plate count agar (milieu non sélectif)
- pH : Potentiel hydrogène
- pI : Point isoélectrique

PGI : Glucose-phosphate isomérase

RAF : Milieu à base de chlorure de lithium, de propionate et de raffinose

Ratio R/I : Ratio de cellules de *B. longum* 15708 retrouvées sur celles inoculées

rpm : Rotations par minute

s : Seconde (s)

SEM: Standard error of the mean (erreur type de la moyenne)

SN : Azote soluble

TA : Transaldolase

TCA : Acide trichloroacétique

TCA-SN : Azote soluble dans l'acide trichloroacétique

TK : Transcétolase

TN : Azote total

TPY : Milieu tryptose, peptone, yeast (levure)

V/V : volume/volume

W/W : poids/poids

WSN : Azote soluble dans l'eau

α : alpha

β : bêta

κ : kappa

ι : iota

λ : lambda

μm : Micromètre (1×10^{-6} mètre)

Chapitre 1

Revue de littérature
et introduction

1. Histoire

L'humain consomme des aliments fermentés depuis de très nombreuses années. La fermentation lactique est utilisée pour la conservation d'aliments depuis l'apparition de l'homme; les premiers humains ont rapidement compris qu'il s'agissait d'une façon simple et sécuritaire de conserver les aliments. En effet, certaines découvertes archéologiques démontrent que la fermentation lactique a été découverte par les premiers humanoïdes, il y a environ 1,5 million d'années (Leakey, 1993). La figure 1 représente une échelle suggérée pour représenter à quel point la technique de fermentation lactique est arrivée rapidement dans le développement de l'humain. Le phénomène n'a cependant été compris et expliqué que plusieurs millénaires plus tard, avec la découverte des bactéries et les premières recherches microbiologiques.

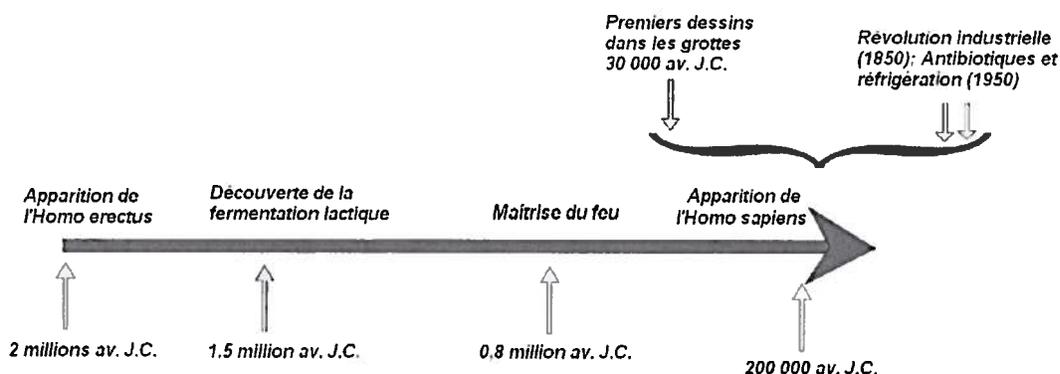


Figure 1. Échelle suggérée de l'apparition de la fermentation lactique par rapport à l'évolution de l'espèce humaine (Molin, 2006)

1.1 Les probiotiques

On reconnaît depuis de nombreuses années les bienfaits de certaines bactéries pour le corps humain. Les aliments fermentés sont consommés pour contrer la diarrhée depuis des siècles, soit avant même 1850. C'est le chercheur allemand Theodor Escherich qui prouva les bénéfices de la colonisation précoce de l'intestin de jeunes enfants pour la digestion en 1886 alors que Döderlein fut le premier à la même époque à suggérer l'association bénéfique des bactéries de la flore vaginale

produisant de l'acide lactique prévenant maladies et infections (Goktepe *et al.*, 2006). Les bactéries lactiques sont quant à elle connues depuis 1857, découvertes et décrites par Louis Pasteur.

Plusieurs recherches avaient préalablement permis de proposer les effets bénéfiques des bactéries lactiques, mais on attribue cependant à l'Ukrainien Elie Metchnikoff



Figure 2 : Elie Metchnikoff
(Encyclopédie Britannica Online, 2008)

(Figure 2) la découverte de l'effet de ces bactéries et l'essence même du mot probiotique. En effet, ses travaux réalisés en 1907 ont permis d'émettre l'hypothèse que la consommation de produits de lait fermenté permettait de contrer l'effet de bactéries putréfactives intestinales, ce qui aurait expliqué, à cette époque, la longévité de paysans bulgares qui consommaient ce type d'aliment en grande quantité (Gardiner *et al.*, 2002b). Au même moment, le pédiatre français Henri Tissier proposait également

au terme de ses travaux de recherche que les bactéries du genre *Bifidobacterium* pourraient être une avenue intéressante pour le traitement de diarrhées chez les enfants, afin de restaurer la balance de leur microbiote intestinal. Cette étude fut publiée en 1906, soit six années suivant la découverte et la caractérisation par le même chercheur des *Bifidobacteria*, isolées des selles de nouveaux-nés nourris de lait maternel (Doleyres, 2003).

Au début du 20^e siècle, les découvertes de Metchnikoff et Tissier étaient si prometteuses que des exploitations commerciales ont immédiatement été mises sur pied. Les résultats cliniques n'étaient cependant pas toujours positifs et pas aussi importants qu'escompté. L'engouement pour les probiotiques a donc perdu de la popularité, puisque le concept était scientifiquement non démontré. Ce n'est que depuis les trente dernières années que les chercheurs s'intéressent de plus en plus aux probiotiques, puisque les effets positifs sur la santé commencent à être

démontrés et les espèces spécifiques de bactéries entraînant ces effets commencent à être identifiées et caractérisées (Organisation Mondiale de la Santé, 2001).

1.1.1 Définition

La première personne ayant utilisé le terme « probiotique » a probablement été le chercheur Kollath en 1953, qui a utilisé ce mot pour décrire les aliments améliorant la santé et pouvant être utilisés à titre de suppléments. Il a utilisé le terme probiotique, soit « en faveur de la vie » selon la racine latine, en opposition au terme antibiotique. Depuis ce temps, le terme a souvent été repris et la définition a été rodée au cours des années par les suggestions de nombreuses équipes de recherches (Gardiner *et al.*, 2002b). La définition du mot « probiotiques » retenue et acceptée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) depuis 2001 et toujours d'actualité est : « Microorganismes vivants qui, lorsqu'ingérés en quantité suffisante, exercent des bénéfices pour la santé de l'hôte au-delà de leurs effets nutritifs. » (Organisation Mondiale de la Santé, 2001; 2006).

2. Description des bactéries probiotiques

Les bactéries intestinales sont d'une très grande importance dans la santé humaine. Elles sont très nombreuses, soit au-delà de 100 000 milliards, divisées entre 400 et 500 espèces différentes qui comportent des rôles primordiaux, dont une complémentation à la digestion et à l'absorption de nutriments, la synthèse de plusieurs vitamines, de même qu'un important apport aux défenses immunitaires (protection contre l'installation de divers organismes néfastes, diminution du passage de microbes dans le sang, diminution du potentiel carcinogène et mutagène de certaines substances, etc.) (O'Grady et Gibson, 2005). Plusieurs preuves de l'influence des bactéries intestinales ont été rapportées, telle que l'incidence de différentes maladies, souvent associée à la diminution du microbiote intestinal. Les probiotiques font partie de ce microbiote.

2.1. Propriétés

Toutes les bactéries intestinales ne sont pas considérées comme des probiotiques. Plusieurs souches dans les genres *Escherichia*, *Enterococcus* et *Clostridium* entre autres, peuvent entraîner différents problèmes si un déséquilibre survient. En fait, les caractéristiques principales associées aux probiotiques sont les suivantes. On estime que la souche bactérienne doit :

- 1- Être exempte de toxicité et/ou de pathogénicité.
- 2- Être un genre bactérien d'origine humaine.
- 3- Être en mesure de survivre dans le système gastro-intestinal, c'est-à-dire de réussir à outrepasser les défenses de l'organisme, de même que l'acide gastrique et les sels biliaires.
- 4- Être en mesure d'adhérer et de coloniser la muqueuse intestinale.
- 5- Proférer un avantage pour la santé de l'hôte *in vivo* (Ex : protection contre les pathogènes, aide à la digestion, propriétés anti-cancéreuses, stimulation des défenses immunitaires, diminution des symptômes et de l'occurrence de maladies intestinales et d'allergies, etc.) (Salminen et Isolauri, 2006).

Toutefois, il y a constamment remise en question des caractéristiques essentielles des probiotiques. Ainsi, une allégation santé récemment autorisée (EFSA, 2010) est reliée à l'hydrolyse du lactose chez les sujets qui le digèrent mal. Dans ce cas, les souches n'ont pas à répondre aux critères 2, 3 et 4 ci-haut.

Pour avoir la chance de profiter des différents effets bénéfiques des probiotiques, il faut cependant en faire une consommation fréquente, voire régulière, puisque leur présence dans l'intestin n'est que provisoire (Salminen et Isolauri, 2006).

Plusieurs espèces bactériennes sont considérées comme des probiotiques, dont plusieurs font partie du groupe des bactéries lactiques.

2.2. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes capables de transformer les glucides en acides carboxyliques, principalement l'acide lactique. Les baisses de pH ainsi créées dans le milieu permettent de prévenir les infections en inhibant plusieurs bactéries pathogènes. Le principal intérêt des bactéries lactiques, en omettant les propriétés probiotiques, est leur utilisation pour la fermentation du lait (yogourt, fromage), des légumes (choucroute), des viandes (saucissons secs), des céréales (pains de spécialité) et même des fruits (malolactique des vins). Les microorganismes de ce groupe sont souvent privilégiés pour la fermentation alimentaire pour plusieurs raisons. Tout d'abord, ils permettent de développer différentes saveurs et textures uniques dans les aliments et participent à leur préservation, grâce à l'acidification. Également, les bactéries lactiques rendent les aliments plus digestes en transformant une bonne partie du lactose du milieu en glucose et galactose grâce à la β -galactosidase, jusqu'en acide lactique et en hydrolysant partiellement plusieurs protéines et lipides du milieu. Leurs actions augmentent aussi la biodisponibilité des vitamines et minéraux (Champagne et Gardner, 2005; LeGras, 2007; EFSA, 2010).

Plusieurs bactéries lactiques possèdent des propriétés probiotiques, dont certaines espèces des genres *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*. Le genre *Bifidobacterium* est également reconnu pour ses nombreuses propriétés probiotiques, mais ne fait pas partie intégrante du groupe des bactéries lactiques à cause de la forte concentration en groupes G-C de son ADN, qui n'est pas typique des bactéries lactiques strictes. Cependant, les caractéristiques morphologiques, biochimiques et le type d'habitat (tractus gastro-intestinal) de ce genre bactérien en font un membre généralement accepté du groupe des bactéries lactiques, bien que non relié phylogénétiquement aux genres plus traditionnels (Gardiner *et al.*, 2002b; LeGras, 2007).

Les principales espèces de probiotiques sont regroupées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Espèces de bactéries et de levures les plus communes considérées comme des probiotiques potentiels ou présentement utilisées à ce titre

<i>Lactobacilli</i>	<i>Bifidobacteria</i>	Autres genres bactériens et levuriens
<i>L. acidophilus</i> *	<i>B. adolescentis</i> *	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. casei</i> *	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> *	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> *	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>cremoris</i>
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. bifidum</i> *	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
<i>L. fermentum</i> *	<i>B. breve</i> *	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. gasseri</i> *	<i>B. essensis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. johnsonii</i> *	<i>B. lactis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i> *	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. paracasei</i> *	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> *	
<i>L. plantarum</i> *	<i>B. thermophilum</i>	
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i> *		
<i>L. salivarius</i> *		

* : Espèces reconnues par l'Agence canadienne d'inspection des aliments comme des probiotiques pour fins d'allégations non associées à la souche. Sources : Gardiner *et al.*, 2002b; Macouzet et Champagne, 2007; Champagne et Gardner, 2005; Shah, 2007; CFIA, 2009.

Au Canada, seules les espèces identifiées d'un astérisque dans le Tableau 1 sont reconnues par l'Agence canadienne d'inspection des aliments comme des probiotiques pour fins d'allégations non associées à la souche (CFIA, 2009).

2.3. Caractérisation des genres de bactéries probiotiques

2.3.1. *Bifidobacterium* sp.

Les deux principaux genres de bactéries probiotiques sont les *Bifidobacterium* et les *Lactobacillus*, tel qu'illustré dans le Tableau 1. On peut possiblement expliquer ce fait par le statut de ces bactéries considérées généralement sécuritaires et associées avec la santé humaine, de même qu'à leur présence dans les produits alimentaires fermentés (Gardiner *et al.*, 2002b).

Depuis leur découverte en 1899, la taxonomie des bifidobactéries a continuellement été modifiée, les espèces étant associées à tour de rôle à toutes sortes d'autres genres bactériens. Le genre *Bifidobacterium* a officiellement été créé en 1974 pour caractériser les différentes espèces qui ne se classaient correctement dans aucun taxon déjà défini.

La morphologie des espèces de bifidobactéries varie grandement entre elles, passant de cellules courtes à longues, allongées à coccoïdales, arrangées en étoiles, en « V » ou en palissade, selon les espèces et les conditions de culture. D'autres caractéristiques existent cependant, qui sont communes à toutes les espèces de *Bifidobacterium*. Ce sont des eubactéries répondant positivement au test de Gram, non mobiles et ne formant pas de spores. Leurs conditions de croissance sont souvent moins fastidieuses que les *Lactobacillus*, mais certaines souches peuvent requérir des conditions particulières. Ces bactéries sont généralement mésophiles (mais supportent bien des chaleurs assez élevées), neutrophiles et anaérobies strictes, bien que certaines espèces tolèrent l'O₂ en présence de CO₂ (Gardiner *et al.*, 2002b). De plus, leur ADN contient généralement un pourcentage assez élevé en G-C, soit entre 55 et 67% (Biavati et Mattarelli, 2001). En 2010, on répertoriait 31 espèces de bifidobactéries, dont 11 provenant d'humains et les autres, isolées d'animaux, d'insectes, de lait fermenté et autres sources environnementales (Lee et O'Sullivan, 2010). Certaines souches peuvent produire une bactériocine nommée la bifidocine B (Tamime, 2002).

Le genre *Bifidobacterium* est caractérisé par le catabolisme du glucose et du fructose qui est fait par la voie métabolique de la phosphocétolase, couramment appelée « bifid shunt », représentée à la figure 3. En fait, cette voie est une particularité du genre bactérien, puisqu'aucune autre bactérie intestinale Gram positive ne l'utilise. De ce fait, l'enzyme fructose-6-phosphate phosphocétolase (F6PPK) est souvent utilisée dans les tests de détection, afin de confirmer la présence de bifidobactéries (Caescu *et al.*, 2004). Certains sucres, comme le lactulose ou des oligosaccharides non digestibles, sont utilisés préférentiellement

par les bifidobactéries habitant le côlon, ce qui leur offre un avantage sur plusieurs autres genres bactériens incapables d'utiliser ces polymères comme source d'énergie (Rašić et Kurmann, 1983).

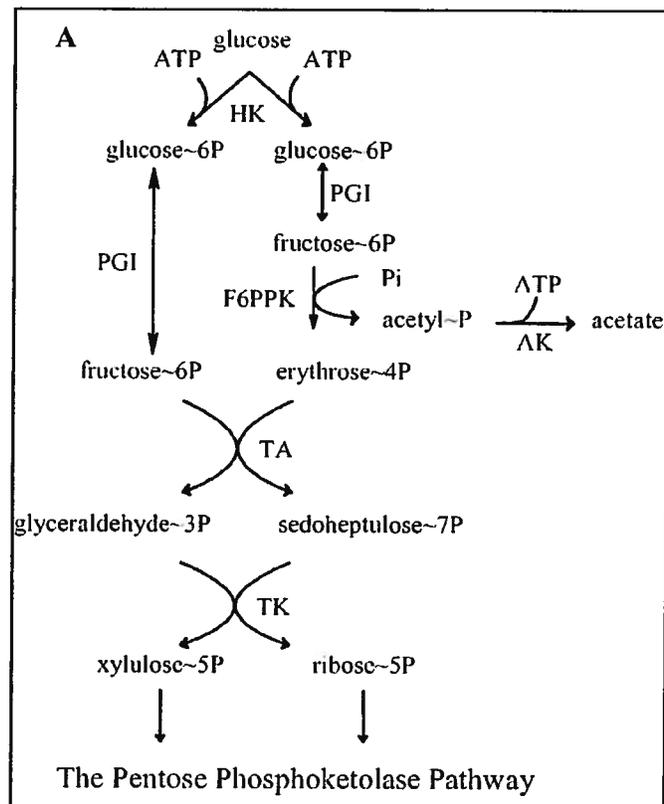


Figure 3. Produits intermédiaires et enzymes de la voie métabolique F6PPK pour l'utilisation du glucose par les bifidobactéries (Caescu *et al.*, 2004)

Les bifidobactéries représentent une large majorité des espèces bactériennes retrouvées chez les nouveaux-nés allaités au sein. En effet, ces microorganismes sont favorisés dans ce cas, puisque le lait maternel contient du lactose et des glucides simples, mais également plus de 80 types d'oligosaccharides, qui ne peuvent être digérés que par certaines bactéries, dont *Bifidobacterium* sp. (Newburg et Neubaer, 1995). Chez l'adulte, les concentrations de bifidobactéries sont beaucoup plus faibles. En fait, on ne retrouve que de 3 à 6% de bifidobactéries dans le microbiote fécal bactérien chez l'adulte, dépendant de l'âge et de la diète du sujet (Biavati et Mattarelli, 2001).

La survie des bifidobactéries dans l'intestin est attribuable à différents facteurs, qui ont été confirmés par le séquençage du génome de différentes espèces. En effet, de grandes quantités de gènes inhabituels, codant pour différentes enzymes catabolisant plusieurs types d'oligosaccharides complexes ont été découverts, ce qui contribuerait à la résistance et la compétitivité des bifidobactéries dans le côlon. De plus, des gènes produisant des fimbriae pouvant se lier aux glycoprotéines ont également été identifiés, ce qui pourrait être important pour l'adhésion et la persistance des différentes espèces dans l'intestin (Schell *et al.*, 2002).

Une seule espèce de bifidobactérie a un potentiel pathogène, soit *B. dentium*. Toutes les autres espèces sont considérées inoffensives, et plusieurs d'entre elles sont considérées comme des probiotiques. Les effets bénéfiques de l'absorption de certaines souches peuvent cependant être diminués en conditions de stress, comme des conditions acides ou la présence d'antibiotiques ou de pathogènes dans l'intestin (Kheadr *et al.*, 2007).

Certaines souches de bifidobactéries ont été sélectionnées dans le cadre de notre projet de recherche. Des souches probiotiques sensibles à l'oxygène devaient être utilisées pour tester des hypothèses de recherche, ce pour quoi *Bifidobacterium* devenait un genre de choix. En effet, considérant que la majorité des espèces de ce genre vivent en conditions anaérobies dans la nature, il est probable qu'une bonne proportion d'entre elles aient de la difficulté à gérer la présence d'oxygène *in vitro* (Tamime *et al.*, 2005). La sélection des souches pour le projet a été basée sur différentes études démontrant cette sensibilité.

Voici un aperçu de ces souches :

2.3.1.1. *Bifidobacterium lactis* Bb12

B. lactis Bb12 démontre effectivement une forte sensibilité à l'oxygène lors de sa culture, en comparaison avec d'autres espèces de bifidobactéries (Li *et al.*, 2010). Cette souche bactérienne provient du fournisseur Chr. Hansen Ltd. (Barrie, ON,

Canada). Elle est étudiée depuis de nombreuses années et est même utilisée à titre de supplément alimentaire internationalement depuis 1985. Les études cliniques réalisées jusqu'à maintenant ont permis de démontrer que la souche aide à soulager la constipation, peut aider à prévenir la diarrhée du voyageur et améliorer les symptômes de diarrhée aiguë et permet de régénérer le microbiote intestinal après un traitement antibiotique (CHR Hansen, 2010). On a également démontré chez cette souche une faible résistance à la cloxacilline et tétracycline, mais très forte à l'ampicilline et l'érythromycine (Kheadr *et al.*, 2007).

2.3.1.2. *Bifidobacterium longum* RO175

Cette souche provient de l'Institut Rosell Lallemand Inc. (Montréal, Qc, Canada). Elle posséderait des qualités pour la compétition de l'adhésion de pathogènes à la paroi intestinale dont *E. coli* 0157:H7, elle stimulerait la production de mucine aidant à prévenir l'attachement des pathogènes aux cellules, permettrait d'aider à réduire les inflammations et préviendrait les récives de colites ulcéraives chez les hôtes affectés (Lallemand Inc., 2010).

De plus, l'utilisation de cette espèce semble très pertinente, étant donné les caractéristiques connues de *B. longum*: meilleure survie aux conditions acides et à la bile en comparaison avec *B. infantis*, *B. adolescentis* et *B. bifidum*, de même qu'une meilleure capacité de croissance dans le lait (Lankaputhra et Shah, 1996).

Cette souche bactérienne a été démontrée comme peu résistante à la streptomycine, mais très résistante à la cloxacilline, comparativement à différentes souches de bifidobactéries (Kheadr *et al.*, 2007). Des études préliminaires au laboratoire ont démontré que cette souche présente une grande sensibilité à l'oxygène.

2.3.1.3. *Bifidobacterium longum* 15708

Cette souche bactérienne provenant du fournisseur ATCC (Rockville, MD, États-Unis) contient un chromosome circulaire formé à 60% de liaisons G-C (Schell *et*

al., 2002). L'espèce *B. longum* est une des espèces de bifidobactéries dominantes chez l'humain et est la seule espèce où il est fréquent de retrouver des plasmides. La souche a été démontrée comme très peu résistante à l'acide et à la pénicilline, mais plutôt résistante au chloramphénicol, comparativement à différentes souches de bifidobactéries (Kheadr *et al.*, 2007). La résistance à l'acidité est un critère à surveiller lors de l'incorporation à du fromage de probiotiques, puisque la fermentation du lait acidifie inévitablement le milieu, ce qui peut donc entraver la viabilité de souches moins résistantes à ces conditions, telle *B. longum* 15708.

De plus, des essais réalisés avec cette souche ont démontré une forte sensibilité à l'oxygène (Bolduc *et al.*, 2006).

2.3.1.4. *Bifidobacterium infantis* 15697

Cette souche bactérienne a été démontrée comme très peu résistante au peroxyde d'hydrogène, mais très résistante au chloramphénicol, à l'érythromycine et à l'hydrochlorure de tétracycline, comparativement à différentes souches de bifidobactéries. La résistance au peroxyde d'hydrogène est assez importante lors de la production de fromage, puisque plusieurs espèces bactériennes libèrent ce composé dans l'écosystème intestinal ou lors de la fermentation, comme c'est le cas de certaines espèces de lactobacilles utilisés pour la fabrication de fromage (Kheadr *et al.*, 2007).

Comme *B. longum* 15708, la souche *B. infantis* 15697 provient du fournisseur ATCC (Rockville, MD, États-Unis) et a été démontrée comme étant sensible à l'oxygène (Bolduc *et al.*, 2006).

2.3.2. *Lactobacillus* sp.

Les bactéries du genre *Lactobacillus* font partie d'un groupe possédant une très grande variété d'espèces qui ont chacune leurs propriétés distinctes. En effet, les espèces ont toutes une niche particulière qui diffère grandement d'une souche à

l'autre, mais elles ont en commun d'être assez fastidieuses, puisqu'elles requièrent l'apport externe de plusieurs substrats organiques complexes pour un taux de croissance maximal. Le genre regroupe plus de 54 espèces et plusieurs sous-espèces possédant toutes les caractéristiques de réponse positive au test de Gram et de morphologie de type bâtonnets, souvent arrangés en paires ou en chaînes, de longueurs variables et non mobiles. Les différentes espèces sont généralement microaérophiles, mais la croissance est souvent améliorée en conditions anaérobies. Comme les autres bactéries lactiques, les différentes espèces peuvent réduire le lactose en acide lactique, mais cette fermentation peut libérer ou non d'autres produits résiduels (CO₂ et/ou éthanol et/ou acide acétique), c'est-à-dire que les différentes espèces peuvent être homo- ou hétérofermentaires. Elles sont généralement mésophiles et acidophiles, mais certaines espèces sont très résistantes à la chaleur. Enfin, de nombreuses espèces sont connues pour libérer une ou plusieurs bactériocines, dont bulgarican, nisine, lactocidine, lactoline, lactobacilline, lactobrévine, acidophiline, helvéticine, casécine, reutéricine, etc. (Tamime, 2002; Shanani et Chandan, 1979).

Une souche de ce genre bactérien a également été sélectionnée pour le projet de recherche, puisqu'elle était également reconnue sensible à l'oxygène.

2.3.2.1. *Lactobacillus helveticus* R0052

Cette souche bactérienne provient de l'Institut Rosell Lallemand Inc. (Montréal, Qc, Canada). Elle permettrait d'activer les cellules immunitaires, préviendrait différentes infections intestinales dont des infections dues à *Escherichia coli* et *Helicobacter pylori* et compétitionnerait avec les pathogènes pour l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales. Cette famille de bactéries est reconnue comme étant anaérobie ou tout au plus aérotolérante (Lallemand Inc., 2010) et requiert des apports nutritifs complexes pour une croissance optimale (Gaudreau et *al.*, 2005).

2.3.3. *Lactococcus* sp.

Un autre genre bactérien qui permet d'observer des actions santé chez les consommateurs pour plusieurs espèces est *Lactococcus*. Seulement certaines souches de ce genre peuvent toutefois être considérées probiotiques. Les *Lactococcus* sont des bactéries lactiques, mais leur fermentation homo- ou hétérofermentaire diffère selon l'espèce. Elles présentent généralement une morphologie de cellules coccoïdales formant de courtes chaînes, répondent positivement au test de Gram et sont généralement microaérophiles, mésophiles, sans flagelles ni spores. Certaines espèces produisent des exopolysaccharides, des bactériocines (nisine, lacticine, lactococcine, lactostrepcine, lactocine) et autres produits de la fermentation comme le diacétyle, qui contribue grandement aux qualités organoleptiques de l'aliment. L'espèce la plus connue est *Lactococcus lactis* dont on retrouve trois sous-espèces très souvent utilisées pour la fermentation de lait, soit *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* et *L. lactis* ssp. *diacetylactis*, dont les deux premières sont également reconnues pour leurs vertus probiotiques (Tamime, 2002). Des études récentes réussissent de plus en plus à démontrer des effets probiotiques intéressants chez différentes souches de lactocoques, dont, à titre d'exemple, des effets antimicrobiens contre des pathogènes intestinaux chez *L. lactis* MM19 et *L. lactis* ATCC 11454 (Millette *et al.*, 2007; Millette *et al.*, 2004).

2.3.4. *Propionibacterium* sp.

Les bactéries du genre *Propionibacterium* ont généralement une morphologie de bâtonnets courts, différant selon le milieu de culture et la phase de croissance, et répondent positivement au test de Gram. Les différentes espèces sont non mobiles, ne possèdent pas de spores, sont hétérofermentaires et sont anaérobies à aérotolérantes. Les propionibactéries peuvent utiliser une voie métabolique particulière, soit la fermentation propionique. Les produits résultants de l'utilisation de cette voie sont le propionate, l'acétate, le succinate et le CO₂. Certaines espèces

dont *P. thoenii* et *P. jensenii* possèdent une capsule et certaines autres produisent des exopolysaccharides (Tamime, 2002; Cousin *et al.*, 2010).

On peut séparer les espèces de ce genre selon leur habitat de prédilection, soit les produits laitiers alimentaires et la peau et l'intestin humains. *P. freudenreichii* est une des espèces de propionibactéries les plus importantes pour l'homme, puisqu'elle permet le développement des caractéristiques organoleptiques et la production de CO₂ lors de la fabrication de fromages de type suisse, comme le gruyère ou l'emmenthal (LeGras, 2007; Tamime, 2002). Cette espèce est également considérée comme probiotique, de même que *P. acidipropionici*. Les effets santé de *P. freudenreichii* ont été démontrés par plusieurs équipes de recherches, tels que l'amélioration des symptômes de la constipation, du syndrome du côlon irritable, des infections respiratoires, des allergies et des infections à *Helicobacter pylori*, la modulation du microbiote intestinal avec effet positif sur la survie de bifidobactéries, la prévention de dermatites, etc. Les effets de *P. acidipropionici* n'ont été démontrés que sur les animaux et *in vitro* pour l'instant, mais les résultats sont déjà très prometteurs dans les tests sur les souris, comme la résistance à *Salmonella typhimurium*, un effet hypolipidémique réduisant le cholestérol, une modulation des facteurs de risques pour le cancer, l'amélioration des symptômes de colites, etc. D'autres recherches sont déjà en cours sur le potentiel probiotique chez les humains de certaines souches de ces espèces de propionibactéries (Cousin *et al.*, 2010).

2.3.5. *Pediococcus* sp.

Ces bactéries répondent positivement au test de Gram, ont une morphologie de coques de tailles uniformes regroupées en tétrades, sont non mobiles et thermophiles (Tamime, 2002; Tamime *et al.*, 2005). Peu d'espèces de ce genre produisent de l'acide lactique, mais certaines en sont capables, dont *Pediococcus acidilactici* qui est la seule à être utilisée comme agent de fermentation pour produits laitiers. Les espèces mésophiles ont également la faculté de survivre à des

concentrations de sel allant jusqu'à 6,5% (Cogan et Beresford, 2002). Certaines espèces peuvent produire une bactériocine appelée la pédiocine (Tamime, 2002).

2.3.6. *Leuconostoc* sp.

Ce genre bactérien possède les caractéristiques de répondre positivement au test de Gram, a habituellement des cellules coccoïdales mais différant selon les conditions de croissance, asporulées et non mobiles. Ces microorganismes font partie des bactéries lactiques, puisque toutes les espèces sont capables de fermenter le lactose et le citrate par voie hétérofermentaire. La production d'éthanol, de CO₂ et de diacétyle chez certaines espèces peut être utilisée positivement à titre d'arômes dans les aliments, mais peut également entraîner des problèmes lors de fabrications alimentaires (Tamime, 2002). À titre d'exemple, certaines espèces de *Leuconostoc* peuvent créer l'apparition de trous dans la matrice fromagère, ce qui en change la rhéologie et empêche la mise en marché. Ces contaminations surviennent surtout à cause de lait contaminé par le pis des vaches ou de la poussière provenant de foin, de grains et du sol (P.E.P. Caprin, 2008). Cependant, certains aspects de ces bactéries peuvent être recherchés lors de production de produits laitiers. En effet, certaines espèces de ces microorganismes sont filantes et créent un aspect limoneux à cause de leur production de polysaccharides et de polypeptides. Cette texture est parfois recherchée chez différents aliments comme le yogourt, afin de diminuer l'utilisation d'agent gélifiant (LeGras, 2007). Une seule espèce du genre *Leuconostoc* possède des propriétés pouvant permettre de la considérer comme probiotique, soit *Leuconostoc mesenteroides*, puisqu'elle est caractérisée par la libération de la bactériocine nommée mésentéroïcine (Tamime, 2002).

2.3.7. *Streptococcus* sp.

Une seule espèce de ce genre a été reconnue comme probiotique, soit *Streptococcus thermophilus*, parfois aussi nommée *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. Cette espèce est connue pour sa libération de thermophiline, une bactériocine empêchant la croissance de pathogènes. Le genre bactérien *Streptococcus* présente

des espèces dont les cellules ont morphologiquement l'apparence de coques répondant positivement au test de Gram. Elles sont non mobiles, ne forment pas de spores et sont homofermentaires. *S. thermophilus* est une espèce dont la température de croissance optimale se situe entre 37 et 45°C, caractéristique d'où elle tire son nom. Elle est naturellement retrouvée dans le lait cru d'animaux un peu partout à travers le monde, mais possède une faible activité protéolytique, malgré cet habitat riche en protéines. Cette espèce est souvent utilisée pour la fabrication de yogourt (Tamime, 2002).

2.3.8. *Saccharomyces* sp.

Une seule espèce de ce genre a été reconnue comme proférant des bénéfices pour la santé de l'hôte, soit *Saccharomyces boulardii*. Ce microorganisme est en fait une levure qui est caractérisée par la sécrétion de protéases spécifiques contre les toxines de *Clostridium difficile* (Castagliuolo *et al.*, 1999). Cet avantage en fait un candidat intéressant pour l'utilisation comme probiotique, surtout pour des patients déjà traités aux antibiotiques, puisque cet eucaryote est résistant à leur action. Par contre, *S. boulardii* a le désavantage de ne pas persister dans l'intestin humain, puisque son adhérence à la muqueuse n'est pas très forte; de ce fait, ce microorganisme doit être administré sur une base régulière pour présenter un effet bénéfique (Klein *et al.*, 1993). Des études utilisant des techniques de biologie moléculaire ont récemment présenté des résultats suggérant que *S. boulardii* pourrait être inclus dans l'espèce *S. cerevisiae*, qui est très utilisée pour la fermentation alcoolique dans l'industrie alimentaire (Mitterdorfer *et al.*, 2002; Hennequin *et al.*, 2001).

2.3.9. *Enterococcus* sp.

Ces bactéries ne sont pas toujours considérées comme sécuritaires pour la santé, mais certaines souches possèdent toutefois plusieurs caractéristiques très positives permettant des les considérer comme des probiotiques, résultats soutenus par plusieurs recherches (Gardiner *et al.*, 2002b; Tompkins *et al.*, 2008). Cependant,

leur usage sera désormais très limité, puisque l’OMS et la FAO ordonnent dans un rapport publié en 2001 que les espèces de ce genre bactérien ne soient plus considérées comme des probiotiques pour usage humain. Ils appuient leur recommandation sur la forte probabilité que les bactéries présentent ou acquièrent un gène de résistance à la vancomycine, ce qui pourrait entraîner des complications médicales si le gène était transmis à d’autres bactéries intestinales, puisqu’il a été démontré que certaines maladies nosocomiales sont causées par ce type de bactéries (Organisation Mondiale de la Santé, 2001). Leur utilisation comme probiotique nécessite donc une évaluation détaillée (Tompkins *et al.*, 2008).

2.4. Croissance des probiotiques

Généralement, les probiotiques requièrent un milieu riche pour une croissance maximale, comme les milieux TPY (Tryptose, peptone, yeast) ou MRS (de Man, Rogosa et Sharpe). Le lait n’est pas leur milieu de croissance idéal, puisqu’il est trop pauvre en acides aminés libres et en petits peptides. L’effet tampon du lait peut toutefois être intéressant pour les probiotiques, qui ont souvent certaines difficultés avec l’acidité créée lors de fermentations. Certaines espèces de probiotiques possèdent cependant des caractéristiques spécifiques aux bactéries intestinales. À titre d’exemple, les bifidobactéries possèdent les enzymes nécessaires pour utiliser le lactulose et les oligosaccharides, qui sont des prébiotiques. Également, les bifidobactéries et *Lactobacillus acidophilus* possèdent certains niveaux d’activité de l’enzyme β -galactosidase qui permet la digestion du lait; il s’agit de spécificités énergétiques pertinentes à savoir pour la croissance de ces bactéries. Enfin, il est important d’incuber les milieux de croissance dans l’environnement atmosphérique approprié, puisque plusieurs espèces sont anaérobies strictes, dont plusieurs bifidobactéries (Tamime *et al.*, 2005). En fait, l’oxygène peut être toxique par contact direct entraînant la mortalité des cellules, ou par réaction de peroxyde et d’acide qui entraîne la mortalité des probiotiques, puisque le peroxyde peut être produit par certaines bactéries lactiques en présence d’oxygène dont *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lankaputhra et Shah, 1996).

2.5. Effets bénéfiques

De très nombreux effets bénéfiques sont associés aux probiotiques. Plusieurs recherches cliniques ont été faites au cours des dernières années et ont permis d'associer certains bénéfices santé à des souches particulières de bactéries probiotiques. Il est important de préciser que ces effets ne sont souvent associés qu'à certaines souches particulières de probiotiques et sous certaines conditions. Cependant, les nombreuses recherches cliniques réalisées sur plusieurs souches de probiotiques sont souvent très prometteuses et encourageantes pour la prévention de certaines maladies et infections et l'atténuation des symptômes de plusieurs maux. Le Tableau 2 regroupe plusieurs de ces effets bénéfiques démontrés, et quelques articles présentant des preuves scientifiques et recherches cliniques réalisées sur le sujet.

2.6. Effets négatifs

L'absence totale de risque lié à la consommation d'aliments enrichis de probiotiques ne peut être garantie. Cependant, des produits de lait fermentés et des fromages fabriqués à partir de différentes espèces de bactéries lactiques, dont *Lactobacillus* sp. sont produits depuis plusieurs siècles et très peu de cas de problèmes reliés directement à la consommation de ces aliments ont été répertoriés depuis ce temps. En fait, les microorganismes considérés probiotiques possèdent tous le statut « GRAS », c'est-à-dire « Generally Recognized As Safe », ce qui signifie que ces organismes ne sont pas dangereux pour la santé humaine, ni opportunistes (Gardiner *et al.*, 2002b). Quelques rares cas d'infections reliés à la consommation de produits fermentés commerciaux enrichis de probiotiques ont été répertoriés chez des individus à l'état de santé fragile, mais rien ne prouve que ces problèmes aient été spécifiquement attribuables à la consommation de lactobacilles (Mackay *et al.*, 1999; Rautio *et al.*, 1999). Certains risques existent considérant la translocation bactérienne, c'est-à-dire le passage des bactéries du tractus gastro-intestinal vers d'autres organes, dont le sang, le foie, les reins, les nodules

Tableau 2. Effets bénéfiques potentiels des probiotiques

Effets biologiques	Littérature associée à la découverte
Diminution des symptômes et/ou prévention de :	
Diarrhée	Siitonen <i>et al.</i> , 1990; Armuzzi <i>et al.</i> , 2001; McFarland <i>et al.</i> , 1995; Black <i>et al.</i> , 1989; Rosenfeldt <i>et al.</i> , 2002
Hypercholestérolémie	Anderson et Gilliland, 1999; Agerback <i>et al.</i> , 1995; Dambekodi et Gilliland, 1998
Maladies inflammatoires du côlon (colite ulcéreuse et maladie de Crohn)	Guslandi <i>et al.</i> , 2000 ; Furrer <i>et al.</i> , 2004; Krus <i>et al.</i> , 1997
Pouchite	Mimura <i>et al.</i> , 2004; Gosselink <i>et al.</i> , 2004
Syndrome du côlon irritable	Nobaek <i>et al.</i> , 2000; Hunter <i>et al.</i> , 1996
Entérocolite nécrosante	Mao <i>et al.</i> , 1997; Hoyos, 1999
Infection du foie	Adawi <i>et al.</i> , 1997; Nanji <i>et al.</i> , 1994
Constipation	Motta <i>et al.</i> , 1991; Seki <i>et al.</i> , 1978
Infection à <i>Helicobacter pylori</i>	Bhatia <i>et al.</i> , 1989; Midolo <i>et al.</i> , 1995
Hypercroissance bactérienne dans l'intestin grêle	Siemehoff <i>et al.</i> , 1996
Cancer du côlon	Reddy et Rivenson, 1993; Rao <i>et al.</i> , 1999
Cancer de la vessie	Aso et Akazan, 1992; Ohashi <i>et al.</i> , 2002
Cancer du col utérin	Okawa <i>et al.</i> , 1993
Cancer du sein	Reddy et Rivenson, 1993; Knekt <i>et al.</i> , 1996
Allergies	Isolauri <i>et al.</i> , 2000; Trapp <i>et al.</i> , 1993
Dermatites atopiques	Kalliomäki <i>et al.</i> , 2003; Isolauri <i>et al.</i> , 2000
Maladies coronariennes	Tavani <i>et al.</i> , 2002
Infection des voies urinaires	Reid <i>et al.</i> , 1995, Kontiokari <i>et al.</i> , 2001
Infection des voies respiratoires	Roos <i>et al.</i> , 2001; Habermann <i>et al.</i> , 2002
Vaginoses et vaginites	Reid <i>et al.</i> , 2001, Reid et Bruce, 2003
Amélioration de :	
Assimilation du lactose	De Vrese <i>et al.</i> , 2001; Saltzman <i>et al.</i> , 1999; Jiang <i>et al.</i> , 1996
Digestion	Friend et Shahani, 1984
Défense immunitaire	Takahashi <i>et al.</i> , 1998; Muscettola <i>et al.</i> , 1994; De Simone <i>et al.</i> , 1987
Pression sanguine	Naruszewicz <i>et al.</i> , 2002; Seppo <i>et al.</i> , 2003
Santé buccale	Näse <i>et al.</i> , 2001
Interférence avec les pathogènes	Levy, 1997; Nes et Holo, 2000; Michail et Abernathy, 2002
Maintenance et intégrité des muqueuses	Coconnier et Lievin, 1997; Salminen <i>et al.</i> , 1996
Participation à la synthèse de différentes vitamines et molécules essentielles et à l'absorption de minéraux	Tamime <i>et al.</i> , 1995; Deguchi <i>et al.</i> , 1985

Adapté de Champagne et Kailasapathy, 2008 et Ouwehand *et al.*, 2003

lymphatiques, etc. Ce phénomène peut ainsi entraîner des infections indésirables, chez les individus immunodéprimés. Cependant, ce problème n'est que très rare et peut survenir majoritairement chez des patients à l'épithélium intestinal fragile suite à un cancer, une blessure ou un agent toxique (Ishibashi et Yamazaki, 2001; Gardiner *et al.*, 2002b). Des problèmes sont également survenus dans une unité hospitalière d'Italie avec *Saccharomyces boulardii*, microorganisme soupçonné d'avoir été la cause de plusieurs autres cas de septicémies depuis l'utilisation de la levure à titre de probiotique (Cassone *et al.*, 2003). De même, ce microorganisme semble avoir été la cause de treize cas de fongémies, suite à des contaminations de cathéters vasculaires (Hennequin *et al.*, 2000).

De plus, des recherches plus approfondies devraient être menées concernant les effets des probiotiques sur le système immunitaire. En effet, les probiotiques altèrent le microbiote intestinal, qui est d'une importance cruciale aux réponses immunitaires normales de l'organisme. Les effets à long terme de ces changements sur l'hôte ne sont pas facilement prévisibles et n'ont été que très peu étudiés. En fait, les changements possibles que les probiotiques pourraient entraîner sur le système immunitaire pourraient entre autres avoir une incidence pour les nouveau-nés et pour les femmes enceintes. Les risques demeurent théoriques pour l'instant, mais les recherches actuelles ne permettent pas d'écarter complètement l'hypothèse de risques éventuels du point de vue immunologique lors de la consommation de probiotiques, surtout pour les patients immunodéprimés (Boyle *et al.*, 2006).

De ce fait, les scientifiques s'accordent pour recommander une consommation orale de probiotiques surtout pour des individus en santé, puisque des complications peuvent avoir une incidence plus fréquente chez des patients aux maladies sévères et fortement immunodéprimés (Salminen *et al.*, 1998; Oggioni *et al.*, 1998). Cependant, cette conclusion est contraire à ce qui serait souhaitable pour la plupart de ces patients, pour qui l'apport de probiotiques pourrait aider à surmonter leur maladie (Gardiner *et al.*, 2002b). En fait, on répertoriait en 1999 plus de 143 études cliniques, ayant eu cours durant les 40 années précédentes, où plus de 7526 patients

n'avaient présenté aucun effet secondaire après la prise de probiotiques (Naidu *et al.*, 1999). Certaines souches ont ainsi acquis le statut d'être complètement sûres pour l'utilisation en tant que probiotiques, mais des études cliniques doivent continuer d'être faites sur de grands panels de patients pour mériter ce titre, ce qui est continuellement à refaire avec la découverte de nouvelles propriétés bénéfiques pour de nombreuses souches bactériennes (Gardiner *et al.*, 2002b).

2.7. Principaux aliments fonctionnels

Les aliments enrichis de probiotiques sont commercialisés depuis longtemps déjà. Les Japonais en font le commerce depuis les années 1920. Depuis ce temps, le marché a grandement évolué avec de très nombreux types d'aliments utilisés comme vecteurs. On peut retrouver entre autres de nombreux produits laitiers et produits laitiers fermentés enrichis de probiotiques, de même que du pain, du jus, du chocolat, des aliments pour bébé, des fruits et légumes, de même que certains aliments prêt-à-manger (Tamime *et al.*, 2005; Homayouni *et al.*, 2008; Belvis *et al.*, 2006; Lassonde, 2005; Lallemand, 2009; Nestlé Canada, 2010; Lavermicocca *et al.*, 2005; Valerio *et al.*, 2006; Kourkoutas *et al.*, 2005; Rodgers, 2007). Certains aliments sont moins recommandables que d'autres pour assurer la survie des probiotiques tout au long de l'entreposage et/ou dépendant de l'usage. En effet, certains probiotiques peuvent avoir plus de difficulté à survivre dans des milieux acides, salés ou dans le cas d'aliments devant être réchauffés ou congelés. Cependant, certaines souches bactériennes sont plus résistantes que d'autres à ces conditions; il convient donc de choisir la souche appropriée aux conditions voulues. À titre d'exemple, on a démontré que certaines souches de probiotiques survivaient très bien dans de la crème glacée, grâce au taux élevé de solides totaux. En fait, cette étude a même démontré que les probiotiques semblent plus susceptibles à l'acidité du milieu qu'à la congélation (Kailasapathy, 2002).

2.7.1. Doses recommandées

Les chercheurs s'entendent pour penser qu'il y a une dose minimale de probiotiques recommandable pour obtenir les bénéfices recherchés pour chaque souche. Cependant, cette concentration minimale est très discutable, puisqu'elle dépend entre autres du microbiote particulier à l'hôte, dépendant de son âge, état de santé et alimentation. De façon très sommaire, on recommande généralement une dose thérapeutique minimale de 10^7 UFC par gramme ou par millilitre par jour pour toutes les souches, en considérant une portion recommandée de l'aliment de 100 g ou mL. Une concentration de cet ordre devrait compenser pour la perte probable de nombreux organismes lors du passage gastrique et intestinal, mais doit également être la concentration minimale retrouvée au jour d'expiration de l'aliment (CFIA, 2009; Shah, 2000; Donnet-Hughes *et al.*, 1999; Kurmann et Rašić, 1991). L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) spécifie quant à elle que la concentration minimale de probiotiques viables réputés pour améliorer la digestion du lactose dans le yogourt devrait être de 10^8 UFC/g, pour ressentir les effets bénéfiques (EFSA, 2010). Bref, la quantité recommandée de probiotiques est sujette à débats, puisqu'il faut considérer l'effet santé, l'effet de souche, la survie des bactéries dans l'aliment, la durée de vie de l'aliment, etc.

2.7.2. Prébiotiques

On retrouve souvent sur le marché des aliments enrichis de probiotiques et de prébiotiques. Les prébiotiques ont été définis pour la première fois en 1995 par Gibson et Roberfroid comme « des oligosaccharides indigestes qui apportent des bénéfices à leur hôte en stimulant spécifiquement la croissance et/ou l'activité d'une ou plusieurs espèces de bactéries dans le côlon » (O'Grady et Gibson, 2005). Plusieurs composants alimentaires pourraient être considérés comme prébiotiques, tels certains oligosaccharides et polysaccharides. Cependant, certaines conditions doivent être respectées pour entrer dans la catégorie des prébiotiques : le composé doit résister à l'acidité gastrique, à l'hydrolyse par les enzymes de l'hôte et à l'absorption intestinale, doit être un substrat sélectif pour un nombre limité de

bactéries intestinales endogènes et conséquemment stimuler la croissance et/ou l'activité de ces bactéries intestinales contribuant ainsi à la santé et au bien-être de l'hôte (Gibson *et al.*, 2004).

Les prébiotiques les plus souvent utilisés comme supplément alimentaire sont sans doute les fructanes, dont fait partie l'inuline, qui sont des fibres solubles souvent isolées d'aliments, entre autres la racine de chicorée. L'effet souhaité de l'utilisation des prébiotiques est la meilleure probabilité de survie des probiotiques à travers le transit gastro-intestinal pour permettre à l'hôte de bénéficier des effets des probiotiques. Certaines études ont permis de démontrer cet effet, mais seulement chez des patients ou animaux au microbiote intestinal affaibli (Mayer *et al.*, 2003; Rafter *et al.*, 2007; Rowland *et al.*, 1997). Un autre bénéfice des prébiotiques dans l'alimentation est l'amélioration de la régularité pour le consommateur, à cause d'un effet d'augmentation de la masse bactérienne fécale et de la teneur en eau des selles. De plus, les fibres solubles présentent l'avantage d'avoir une texture pratiquement imperceptible dans les aliments. (Côté, 2007).

3. Le fromage comme matrice pour « livrer » des probiotiques

Plusieurs études portant sur la survie de probiotiques dans du lait fermenté présentent des résultats concluants (Samona et Robinson, 1994; Martinez-Villaluenga *et al.*, 2006; Kourkoutas *et al.*, 2005), ce qui a mené vers l'idée d'incorporer ces microorganismes à d'autres produits laitiers, dont le fromage. Cependant, le fromage présente de nombreuses caractéristiques pouvant entraîner des difficultés pour la survie des probiotiques. En voici quelques exemples :

- Coévolution avec d'autres microorganismes potentiellement antagonistes (ex : production d'acide lactique) ou compétitifs (ex : compétition pour les nutriments), soit par exemple les ferments lactiques, des levures ou moisissures

- Taux d'humidité relative faible
- Présence de sel
- Maturation du fromage et/ou entreposage qui peut s'étendre sur plusieurs mois et ainsi influencer les activités biochimiques, le potentiel redox et la structure du fromage (Tamime *et al.*, 2005)

Ces facteurs peuvent entraîner des difficultés pour la survie des probiotiques, comme observé par plusieurs équipes de recherche lors de la fabrication et de l'entreposage de fromage cheddar (Lynch *et al.*, 1996; Gardiner *et al.*, 1998; Darukaradhya *et al.*, 2006; Sharp *et al.*, 2008; Ong *et al.*, 2007b, Godward et Kailasapathy, 2003; McBreaty *et al.*, 2001).

Cependant, de nombreuses études démontrent également qu'il est possible d'incorporer efficacement des probiotiques à différentes sortes de fromages, comme le fromage cottage (O'Riordan et Fitzgerald, 1998), le fromage Kasar (Özer *et al.*, 2008), le Canestrato apulien (Corbo *et al.*, 2001), le Gouda (Gomes *et al.*, 1995), le fromage de chèvre (Gomes et Malcata, 1998), un fromage argentin (Bergamini *et al.*, 2005) et le Cheddar (Ong *et al.*, 2007b; Gardiner *et al.*, 2002a; Stanton et Ross, 1999; Lynch *et al.*, 1996). En fait, Kailasapathy note même que le fromage semble être un excellent aliment pour l'insertion de bactéries probiotiques, puisque la matrice fromagère présente un effet tampon important et une grande concentration en gras. Ces caractéristiques peuvent aider significativement à la protection des cellules contre la dégradation enzymatique et favoriserait une meilleure résistance à l'acidité de l'estomac, lors du passage gastro-intestinal (Kailasapathy, 2002; Stanton *et al.*, 1998). De plus, le fromage cheddar a été testé pour la survie de probiotiques et il a été démontré qu'un très bon rendement de survie pouvait être atteint pour plusieurs espèces lorsqu'ajoutées au fromage, à l'exception de *Lactobacillus acidophilus* qui survit difficilement, probablement à cause de la présence d'oxygène (Phillips *et al.*, 2006).

Il semble donc que le facteur principal pouvant expliquer le faible taux de survie des probiotiques dans le fromage est la souche bactérienne utilisée, réagissant différemment selon ses caractéristiques spécifiques.

3.1. Moment d'addition

Le moment d'addition et la forme sous laquelle se retrouvent les probiotiques à introduire dans les produits alimentaires ont également une influence sur la viabilité de la culture. Différentes expérimentations ont déjà été réalisées à ce sujet par d'autres équipes de recherche. En effet, les probiotiques peuvent être ajoutés sous plusieurs formes :

- Liquide, par ajout dans la préparation de ferments lactiques (Gardiner *et al.*, 2002b)
- Dans le lait de départ, ce qui entraîne cependant une augmentation du risque de perte des bactéries dans le lactosérum de soutirage et de la mortalité par domination des ferments lactiques, surtout pour les espèces croissant plus lentement dans le lait (Tamime *et al.*, 2005)
- Lyophilisée, par addition au salage, ce qui aurait comme avantage de diminuer énormément la perte de cellules dans le lactosérum et l'effet de compétition avec les bactéries lactiques lors de la fermentation du lait (Dinakar et Mistry, 1994)
- Sur les grains après soutirage, ce qui pourrait avoir pour effet une perte partielle des probiotiques dans le lactosérum égoutté au fil des dernières étapes de fabrication fromagère (Songisepp *et al.*, 2004)
- Autres techniques selon la sorte de fromage testée (Ex : ajout d'une crème enrichie de probiotiques dans le fromage cottage (Tratnik *et al.*, 2000; Blanchette *et al.*, 1996))

Aucune de ces études ne comparait par contre les différentes conditions afin de déterminer la procédure la plus avantageuse pour la survie des probiotiques lors de la fabrication de fromage.

3.2. Le cheddar

Le choix du fromage cheddar frais comme transporteur est intéressant, compte tenu de l'aspect économique. En effet, le fromage cheddar représente un marché énorme au Québec. La production augmente à chaque année, comme en 2007 où l'augmentation a été de 4,9% par rapport à l'année précédente (Statistiques Canada, 2007). Selon Statistiques Canada (2010), une production de 129 436 kg de fromage cheddar a été dénombrée au Canada en 2009 dont plus de la moitié a été produit au Québec. Il s'agit également du fromage le plus fabriqué à travers le monde (Bérubé, 1995).

De plus, le cheddar enrichi de probiotiques a été démontré efficace comme aliment fonctionnel jusqu'à 15 mois d'entreposage, surpassant même le yogourt frais quant à la survie dans l'aliment et le passage dans le tractus gastro-intestinal (Gardiner *et al.*, 1999b). Ce fromage semble donc un excellent véhicule pour les probiotiques, si la souche est favorable aux conditions qu'on y retrouve.

3.3. Les défis

L'enrichissement de tout produit alimentaire représente un défi. Parmi ces défis, on reconnaît que l'enrichissement ne doit pas modifier l'apparence, la texture ou le goût du fromage, car les qualités organoleptiques sont les premières caractéristiques recherchées menant à la satisfaction des consommateurs. De ce fait, il faudra faire attention à certains probiotiques : *Bifidobacterium* sp. dont la fermentation pourrait libérer des concentrations non négligeables d'acide acétique (Caescu *et al.*, 2004), *L. acidophilus* qui pourrait produire de l'acétaldéhyde et de l'acide lactique (Mahdi *et al.*, 1990; La Torre *et al.*, 2003) ou d'autres souches très protéolytiques qui

provoqueraient la libération de petits peptides amers (Rašić et Kurmann, 1983). Cependant, une modification organoleptique positive peut survenir suite à l'ajout de probiotiques dans l'aliment, ce qui ne représente alors pas un défi pour leur incorporation, comme dans le cas d'*Enterococcus faecium*, qui influence positivement la saveur (sensations olfactives et gustatives) du fromage cheddar (Gardiner *et al.*, 1999a).

De plus, les probiotiques ne devraient pas interférer avec l'action normale des microorganismes essentiels à la fabrication du fromage désiré. De ce fait, les probiotiques utilisés ne devraient pas produire d'antibiotiques nuisibles aux microorganismes utiles lors de la fabrication, mais devraient tout de même être en mesure de croître dans un milieu acide de lait fermenté.

Troisièmement, les technologies utilisées pour l'ajout de probiotiques dans la matrice de fromage cheddar doivent permettre une bonne survie bactérienne lors de la production et au cours de la période de conservation. Certaines équipes de recherche notent que les probiotiques semblent présenter des effets biologiques bénéfiques même lorsqu'ils ne sont pas viables (Ouweland et Salminen, 1998; Tabrizi *et al.*, 2004), mais il est considéré par la majorité des chercheurs qu'il est beaucoup plus avantageux que les bactéries soient biologiquement actives pour assurer le maximum d'effets positifs (Champagne et Kailasapathy, 2008). De ce fait, il est préférable de maintenir les bactéries viables dans le fromage.

Donc, tel que précédemment mentionné, il doit y avoir environ 10^7 UFC de probiotiques par gramme de fromage au moment de la consommation, pour que l'effet soit bénéfique, puisque la portion de fromage recommandée quotidiennement est de 100 g (Shah, 2007; Kailasapathy, 2002; CFIA, 2009). Ces quantités ne sont pas toujours respectées dans les produits commercialisés enrichis de probiotiques, contrairement à ce qui peut être indiqué sur les étiquettes (Hamilton-Miller *et al.*, 1999; Iwana *et al.*, 1993). Les études faites à ce jour montrent que les processus industriels utilisés pour l'incorporation de probiotiques dans les aliments entraînent

des stress importants pour les bactéries, ce qui provoque souvent d'importantes pertes de viabilité (Goulet et Wozniak, 2002). À titre d'exemple, certains laits fermentés et yogourts ont été testés et ne contenaient pas d'aussi grandes concentrations de probiotiques que les quantités annoncées sur les emballages, ce qui s'explique par le fait que ces produits ne présentent pas les conditions optimales pour la survie des probiotiques (Phillips *et al.*, 2006). Un défi de l'ajout de probiotiques à des produits alimentaires est de maintenir la viabilité des ces microorganismes durant la fabrication du produit et jusqu'à la date de péremption anticipée.

Différents processus ont déjà été testés afin de permettre une meilleure survie des probiotiques dans le yogourt : arrêt de la fermentation à un pH plus élevé (Varnam et Sutherland, 1994), diminution de la température d'incubation à 3-4°C (Sakai *et al.*, 1987), enrichissement du yogourt avec une préparation à base de protéines de lactosérum, permettant un meilleur pouvoir tampon de la matrice (Supriadi *et al.*, 1994), application d'une pression hydrostatique de 200-300 MPa durant 10 minutes ou d'un choc thermique de 58°C durant 5 minutes, prévenant tous deux une trop forte acidification post-fabrication (Tanaka et Hatanaka, 1992; Marshall, 1992), désoxygénation du lait avant la fermentation (Tamime *et al.*, 1995), embouteillage dans des contenants en verre pour diminuer l'apport en oxygène (Dave et Shah, 1997), addition d'agents réducteurs d'oxygène dans le produit, tels la cystéine et l'acide ascorbique (Dave et Shah, 1997), microencapsulation des cellules probiotiques (Kailasapathy, 2006; Adhikari *et al.*, 2000; Godward, 2000; Khalida *et al.*, 2000), etc.

Compte tenu du fait que certaines équipes de recherche ont obtenu des résultats infructueux lors d'essais d'ajout de probiotiques à du fromage, il semble nécessaire de développer des procédures qui devraient permettre de meilleures survie bactérienne et rétention des probiotiques dans la matrice fromagère. De toutes les avenues ci-haut mentionnées, la microencapsulation est une solution prometteuse et applicable dans le cas d'ajout de probiotiques au fromage. De ce fait, le choix du

fromage cheddar est également bien approprié, considérant que les étapes de fabrication de ce fromage permettent un apport important en oxygène, comparativement à d'autres types de fromages. Cette caractéristique devrait ainsi permettre de mieux distinguer les probiotiques résistants à l'oxygène et de vérifier l'efficacité de la microencapsulation à protéger la viabilité des probiotiques non résistants à l'oxygène.

4. Immobilisation cellulaire

L'immobilisation de bactéries est une avenue intéressante afin d'améliorer la rétention des bactéries dans la matrice fromagère et de les protéger des différentes conditions physiques retrouvées dans ce type d'aliment (acidification graduelle, exposition à l'O₂, grande concentration de sel, etc.), de même que protéger des conditions difficiles retrouvées dans le tractus gastro-intestinal et des changements physiques attribuables à la lyophilisation ou à la réhydratation. En fait, il existe différentes techniques d'immobilisation cellulaire utilisées commercialement ou en laboratoire. Selon l'utilisation qui en est faite, ce procédé peut entraîner, dans différentes situations, un meilleur rendement des expériences, puisque l'immobilisation peut diminuer les pertes en cellules, rendre leurs procédés d'utilisation plus efficaces ou les protéger de facteurs extérieurs (Kühtreiber *et al.*, 1999).

4.1. Un phénomène naturel

En fait, les techniques d'immobilisation recréent les situations que l'on retrouve dans la nature, c'est-à-dire que les cellules possèdent de façon innée les moyens nécessaires pour leur permettre de survivre dans différents types de milieu. De plus, l'immobilisation permet aux cellules de se protéger naturellement de plusieurs façons, soit en prévenant les stress physiques trop importants, les rejets immunologiques, le lessivage du milieu, etc. L'agrégation des cellules, souvent résultante de ce phénomène d'immobilisation, entraîne une interaction des cellules

entre elles, ce qui peut même mener à la création d'organismes multicellulaires (Kühtreiber *et al.*, 1999).

4.2. Types d'immobilisation cellulaire

Il existe trois types d'immobilisation cellulaires observés naturellement et pouvant se retrouver chez différentes espèces de bactéries.

4.2.1. Agrégation, adhésion et adsorption à des transporteurs poreux

Ce type d'immobilisation est caractérisé par l'attachement des cellules entre elles ou entre les cellules et un support, ce qui mène à la création de biofilms. S'il s'agit de transporteurs logés dans une matrice poreuse, les cellules doivent migrer dans la matrice jusqu'aux récepteurs auxquels elles s'adsorbent. L'attachement dans tous ces cas peut être dû à la libération de polymères adhésifs ou par liaisons covalentes ou ioniques (Kühtreiber *et al.*, 1999).

4.2.2. Rétention des cellules à l'aide de structures préformées

Après un premier contact avec une cellule, certains types de cellules sont capables de produire des structures et récepteurs visant à capter ce type particulier d'organismes, donc de les immobiliser, afin d'empêcher leur activité. Cette captation peut alors permettre une élimination plus facile par phagocytose ou autre. Il faut donc un premier contact avec la cellule à immobiliser et un temps défini pour la production de ces structures avant l'utilisation de cette barrière biologique qui, une fois en place, s'avère une première ligne de défense assez efficace pour vaincre une infection (Kühtreiber *et al.*, 1999).

4.2.3. Bioencapsulation

Il s'agit d'un phénomène pouvant se produire naturellement, mais également d'une technique biologique qui sera utilisée dans notre expérimentation et qui est décrite et détaillée dans la section suivante.

5. Encapsulation

L'encapsulation est une technique utilisée depuis de nombreuses années afin d'isoler un certain ingrédient du milieu environnant. En fait, la technique a été proposée dans les années soixante et le concept a été défini comme étant une façon de « protéger les cellules et de prévenir leur destruction et leur participation à des réactions immunologiques par recouvrement d'une membrane perméable à des petites molécules spécifiques » (Kühntreiber *et al.*, 1999). Cependant, l'encapsulation peut agir à plusieurs titres, entre autres comme protection pour différentes molécules dont des peptides, des médicaments, des pesticides, des huiles et des microorganismes vivants (Benita, 2006). Ceci permet parfois d'obtenir une meilleure stabilité de ces ingrédients durant la fabrication et l'entreposage du produit alimentaire et de réduire les interactions avec l'environnement, comme cité par Kühntreiber et ses collaborateurs. L'encapsulation peut même être utilisée afin d'isoler les particules souhaitées pour permettre de masquer couleurs ou odeurs dans un produit (Champagne et Kailasapathy, 2008).

L'encapsulation bactérienne a vu le jour au début des années 1970. À cette époque, on utilisait comme technique d'immobilisation l'attachement des bactéries à un support par adsorption ou liaisons covalentes et la formation de réseaux intercellulaires par réticulation ou floculation (Picot, 2005). Depuis ce temps, plusieurs recherches ont été menées, utilisant chacune une technique et des polymères d'encapsulation différents, ce qui en fait maintenant une méthode de travail flexible, appropriée pour différentes molécules et cellules dans plusieurs domaines de recherche (Kühntreiber *et al.*, 1999).

Il existe différents types d'encapsulation, souvent répertoriés selon les molécules à encapsuler. Lorsqu'il s'agit de cellules vivantes, on peut alors parler de bioencapsulation et, selon la taille des molécules, on peut définir la macroencapsulation (particules d'un diamètre supérieur à 2-3 mm), microencapsulation (particules d'un diamètre de 1 μm à 2-3 mm) et la nanoencapsulation (production de particules d'un diamètre inférieur à 1 μm) (Benita, 2006; Kührtreiber *et al.*, 1999). Dans notre cas, le fait de travailler avec des cellules vivantes est assez implicite, alors nous n'utiliserons que le terme microencapsulation.

5.1. Le principe

Le principe général de la microencapsulation est assez simple : le produit à encapsuler doit se trouver en grande quantité, puis est séparé en fines gouttelettes qui sont recouvertes d'une matrice polymérique, une microcapsule mince, forte et semi-perméable. La forme et la taille de cet enrobage peuvent varier, mais on le retrouve souvent sous une forme sphérique de quelques microns à quelques millimètres. Les métabolites et nutriments peuvent traverser la membrane de polymères, mais celle-ci permet quand même de protéger efficacement contre différents contaminants (Figure 4).

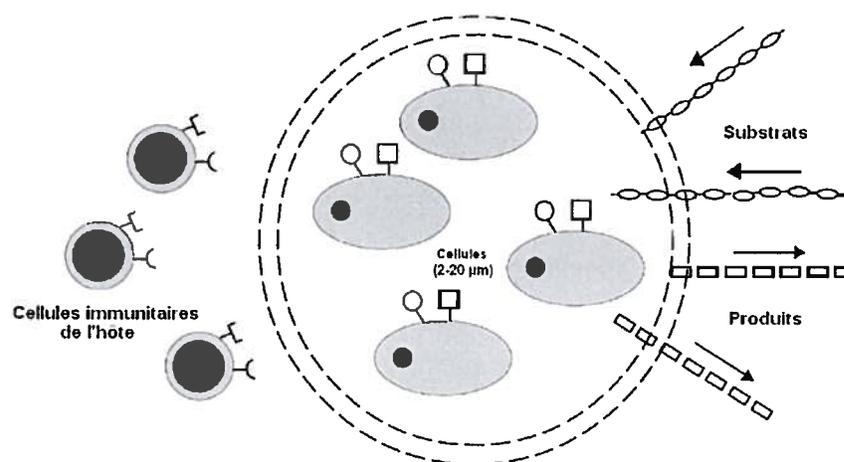


Figure 4 : Principe de l'encapsulation : La membrane isole les cellules encapsulées des défenses immunitaires de l'hôte, tout en permettant le transport des métabolites et nutriments extracellulaires. Les pores de la membrane sont sélectifs à la taille des particules (30-70 kDa) (adapté de Kailasapathy, 2002)

Les produits encapsulés sont libérés lorsque la membrane polymérique (ou le gel de la particule) est brisée, dissoute ou fondue (Kailasapathy, 2002).

La matrice de polymères est liquide au moment de l'enrobage des cellules et peut être solidifiée de différentes façons, dont les trois plus fréquemment utilisées, présentées ci-dessous.

5.1.1. Immobilisation des billes de gel

Cette méthode est la plus utilisée, puisqu'elle est simple et les conditions physiques et chimiques utilisées sont généralement non dénaturantes pour les cellules bactériennes. La gélification peut se faire par liaisons ioniques, changement de température, polymérisation ou interliaisons de pré-polymères (Kühtreiber *et al.*, 1999).

5.1.2. Formation directe de membrane

Cette méthode commence à être plus recherchée pour les avantages de la diminution des coûts d'utilisation et la diminution du risque de contamination, grâce à la réduction du nombre d'étapes requises pour l'obtention des microcapsules. La solidification est faite par coextrusion, cocervation ou polymérisation (Kühtreiber *et al.*, 1999).

5.1.3. Enrobage des billes de gel

Les billes de gel sont poreuses, ce qui peut être un avantage ou un désavantage selon la situation. Dans le cas où une des caractéristiques recherchées pour l'utilisation de ces billes de gel soit une perméabilité réduite, par exemple pour l'immobilisation cellulaire afin de préserver les cellules encapsulées d'échanges avec le milieu ou pour protéger le polymère gélifiant du milieu environnant, les

équipes de recherche doivent recourir à un enrobage subséquent. Les techniques utilisées pour la solidification sont généralement l'atomisation, la transamination ou les liaisons entre polymères de charges opposées (Kühtreiber *et al.*, 1999).

5.2. Avantages de la microencapsulation

Il a été démontré que la microencapsulation est une technique efficace en ce qui a trait à la protection et à la stabilisation des microorganismes contre différents stress, tels la congélation, la conservation de longue durée à température ambiante, la réfrigération, l'entreposage, etc. De plus, cette technologie permettrait aux bactéries de survivre plus facilement aux conditions gastriques, qui entraînent autrement une grande mortalité chez les bactéries probiotiques (Iyer *et al.*, 2004). En fait, certaines études ont démontré que l'encapsulation permet de séparer efficacement les bactéries de leur environnement jusqu'à la libération qui aurait l'avantage d'être contrôlée et soutenue (Kailasapathy, 2002).

Certaines études rapportent déjà de très bons résultats quant à la survie des bactéries probiotiques encapsulées dans des matrices fromagères (voir section 7 du présent ouvrage). De plus, on rapporte que l'encapsulation des bactéries, lors de l'incorporation dans des matrices fromagères, permettrait d'augmenter la viabilité dans les aliments, dont les aliments acides, et que l'apport chez le consommateur serait conséquemment grandement amélioré (Picot, 2005); il s'agit d'un autre avantage appuyant le choix de cette technique pour la présente recherche.

5.3. Désavantages de la microencapsulation

La microencapsulation des cellules pour ajout à des matrices alimentaires peut également comporter certains inconvénients. Souvent, les études permettent d'obtenir de bons résultats à l'échelle laboratoire, mais les techniques utilisées peuvent être très difficiles à reproduire dans un but de commercialisation. En fait, il peut être difficile d'appliquer les mêmes techniques de microencapsulation à grande

échelle, compte tenu de l'appareillage utilisé, du temps requis pour réaliser les différentes étapes et surtout du coût associé aux manipulations et au matériel (Kailasapathy, 2002; Krasaekoopt *et al.*, 2003).

De plus, les polymères utilisés doivent être reconnus comme « GRAS », c'est-à-dire « Generally Recognized As Safe » pour pouvoir être utilisés dans l'industrie alimentaire. Le produit d'encapsulation devrait aussi stabiliser le matériel à encapsuler, ne devrait pas inhiber l'action des ingrédients actifs du matériel encapsulé et devrait permettre la libération du produit encapsulé au site ciblé (Vasishtha, 2003).

Plusieurs autres facteurs sont également à considérer pour l'utilisation d'un polymère d'encapsulation pour l'ajout à des aliments commercialisés. Voici quelques exemples de défis pouvant être rencontrés pour différentes méthodes de microencapsulation :

- Les billes d'alginate sont sensibles à l'acidité et peuvent perdre leur capacité d'encapsulation durant la fermentation lactique (Sun et Griffiths, 2000; Sultana *et al.*, 2000).
- L'utilisation d'ions de potassium dans le cadre de certaines techniques de microencapsulation peut débalancer l'équilibre en électrolytes du corps pour les grands consommateurs (Sun et Griffiths, 2000).
- Le potassium requis pour la formation de billes de κ -carraghénane peut endommager les cellules bactériennes durant une fermentation (Sun et Griffiths, 2000).
- L'alginate de calcium est instable en présence de certains agents chélateurs. (Phillips et Poon, 1988).
- De l'huile résiduelle, des émulsifiants ou surfactants pouvant être retrouvés lors de l'utilisation de certaines méthodes de microencapsulation peuvent être toxiques pour certaines souches bactériennes et/ou interagir négativement avec les composantes de certains aliments. Dans le cas de

l'huile, elle peut également modifier la texture de l'aliment et poser un problème pour l'ajout des cellules microencapsulées à un aliment commercialisé comme pauvre en gras (Godward, 2000).

- Il peut être difficile d'obtenir une taille uniforme des particules encapsulées, ce qui peut entraîner des problèmes pour la texture de l'aliment et la sensation en bouche lors de la consommation de l'aliment (Kailasapathy, 2002).
- Dans certains pays, l'ajout de polysaccharides dans le lait fermenté est interdit (Picot et Lacroix, 2004).

Enfin, la microencapsulation peut parfois s'avérer inefficace, comme certaines études qui ont démontré que l'encapsulation de probiotiques ajoutés dans le fromage cheddar n'était d'aucun effet (Dinakar et Mistry, 1994) ou d'un effet négatif par rapport à des cellules libres (Godward et Kailasapathy, 2003). L'amélioration de la survie de probiotiques encapsulés sous des conditions simulant l'effet des fluides gastriques n'a pas pu être démontrée dans certaines études non plus (Truelstrup-Hansen *et al.*, 2002; Sultana *et al.*, 2000; Koo *et al.*, 2001).

En résumé, la technique de microencapsulation et le polymère utilisé doivent être soigneusement choisis, puisqu'une technique inappropriée, une concentration incorrecte de particules ou de mauvaises tailles de capsules peuvent entraîner de mauvais rendements de survie et/ou de libération intestinale (Sultana *et al.*, 2000; Truelstrup-Hansen *et al.*, 2002).

5.4. Comment choisir une technique de microencapsulation

La première question à résoudre lors du choix d'une technique de microencapsulation est de déterminer le diamètre souhaité de microcapsules, selon l'utilisation visée par le protocole. En fait, le choix de la taille des capsules est de première importance, afin de s'assurer qu'elles seront suffisamment grosses pour contenir les cellules, les agrégats de cellules ou alors pour supporter leur croissance.

Par contre, elles doivent respecter une certaine limite, surtout lors d'ajout dans des produits alimentaires, afin de ne pas être aisément perceptibles au goût et à la vue pour le consommateur et pour ne pas changer la rhéologie de l'aliment. Cependant, le diamètre des capsules est habituellement choisi à la limite supérieure des besoins, puisque les capsules plus grosses sont plus facilement manipulables et qu'il y a de meilleures chances de retrouver au moins une cellule par capsule, selon des calculs réalisés par la loi de Poisson (Kühtreiber *et al.*, 1999). Une fois le diamètre moyen choisi, la technique de microencapsulation sera plus facile à choisir, car on pourra discriminer rapidement les techniques qui permettent l'obtention de capsules de tailles très différentes de ce qui a été établi.

5.5. Techniques de microencapsulation

Plusieurs techniques ont été développées par différentes équipes de chercheurs pour la production des microcapsules, dont voici les principales pouvant être utilisées dans l'industrie alimentaire :

5.5.1. Gélification ionotropique

Le principe de cette technique est basé sur la capacité de certains polymères, entre autres l'alginate, le carraghénane, la gomme de gellane et la pectine, de former un gel en présence de minéraux, dont le calcium et le potassium (Champagne et Kailasapathy, 2008). La production du gel se fait en trois étapes : 1- l'état « sol » où le polymère se trouve sous forme de solution et que l'organisation des molécules n'est pas stable. 2- l'état « gel » qui apparaît lorsque plusieurs chaînes de molécules s'associent pour former un réseau organisé. 3- la rigidification du gel et la synérèse, soit l'exsudation d'une partie de la phase liquide du gel. L'état « gel » est caractérisé par son instabilité. En effet, à cette étape, les gels sont généralement réversibles, ce qui démontre que les chaînes sont liées entre elles par des forces relativement faibles. Ces forces sont plus solides que des liaisons de type coordinence ou hydrogène (sans quoi l'équilibre serait atteint immédiatement

compte tenu de la rapidité à faire et défaire ces liens), mais plus faibles que des liaisons covalentes ou ioniques (sans quoi la gélification serait immanquablement irréversible) (Cochet, 2007).

En fait, la gélification se produit selon un procédé chimique dépendant du produit. Chez les iota- et kappa-carraghénanes et l'agarose, la gélification se produit par l'intermédiaire de doubles hélices, soit l'ordonnance des molécules du polymère en deux hélices imbriquées. Dans le cas de l'alginate et de la pectine, il s'agit plutôt d'un phénomène de gélification par entassement de chaînes, parfois appelé modèle « boîte à œufs ». Un cation divalent ajouté au mélange (tel le Ca^{2+}) permet de neutraliser les charges répulsives des carboxylates du polymère, ce qui permet le rapprochement des chaînes et l'obtention du modèle « boîte à œufs » (Cochet, 2007).

Un exemple typique de la technique de gélification ionique pourrait être le suivant : une solution du polymère choisi est mélangée avec le matériel à encapsuler. Le mélange est dispersé goutte à goutte à partir d'une aiguille ou d'un appareil spécialisé dans un bain de CaCl_2 dilué à 10% dans de l'eau distillée et agité avec un barreau magnétique (pour éviter que les microcapsules formées ne s'agglomèrent). Le polymère créera des liens entre ses molécules et les ions calciques, ce qui provoquera la production d'un gel insoluble. Les billes produites seront sphériques et de taille homogène, soit entre 2 et 5 mm. Ce qui contrôle cette taille, c'est entre autres le diamètre du trou de l'aiguille, la distance séparant l'aiguille et le bain, la viscosité de la solution et la vitesse à laquelle tourne le barreau magnétique dans le bain (Kailasapathy, 2002). Pour réduire ce diamètre, on pourrait utiliser un système de flux d'air coaxial ou de force électrostatique, afin que les gouttelettes tombant dans le bain de chlorure de calcium soient plus fines (Picot, 2005).

Ce processus est très intéressant pour l'utilisation avec des probiotiques, puisqu'il a été démontré que les particules formées étaient résistantes à l'acidité, à la congélation, à l'oxygène et permettaient une libération efficace des molécules

bioactives dans l'intestin (Sun et Griffiths, 2000; Shah et Ravula, 2000; Talwalkar et Kailasapathy, 2003; Le-Tien *et al.*, 2004; Lee et Heo, 2000). Cependant, les rendements sont moins élevés lors de l'utilisation de cette technique par rapport à d'autres et l'utilisation pour ajout dans des produits alimentaires est plus difficile, à cause de la possibilité que les particules encapsulées se dissolvent dans le produit sous l'effet d'agent chélateurs (phosphates, citrates) et qu'elles modifient la texture de l'aliment (Champagne et Kailasapathy, 2008). Ces problèmes de rendement peuvent être améliorés par l'utilisation d'un processus de double encapsulation, c'est-à-dire l'ajout d'une couche supplémentaire de polymère sur les billes, comme du chitosane ou de l'alginate poly-L-lysine.

5.5.2. Atomisation

Il existe trois types de techniques d'encapsulation par atomisation.

5.5.2.1. « Spray-chilling » et « spray-drying »

Ces types d'atomisation sont basés sur la nébulisation d'une solution contenant le polymère et la substance à encapsuler par l'utilisation d'air ou d'azote comprimé. Le tout se déroule dans une chambre à dessiccation dans laquelle on fait passer un courant d'air pour le séchage des capsules qui seront formées. La différence entre ces deux techniques est la température de l'air. Le « spray-chilling » est basé sur l'utilisation d'un polymère possédant un faible point d'ébullition (32 à 42°C) et la solidification des capsules est assurée par un flux d'air froid. Le « spray-drying » peut permettre l'utilisation d'une plus grande variété de polymères, puisque c'est un jet d'air chaud qui est utilisé pour produire la fine poudre de capsules (Champagne et Kailasapathy, 2008). Cependant, les souches bactériennes utilisées doivent être thermorésistantes pour que le processus entraîne un bon rendement (Gardiner *et al.*, 2002b).

Pour les deux techniques, la suite du protocole est la même : les capsules sont récupérées de la chambre par ajout de solvant qui sera par la suite séché. Les

capsules formées ont plusieurs grosseurs, dont la moyenne se situe environ à un diamètre de 10 μm . Le « spray-drying » est la méthode la plus utilisée pour la réduction en poudre du lait ou autres produits du lait, puisque cette technique permet de diminuer l'impact sur la valeur nutritive des produits et améliore le rendement et la qualité de la poudre obtenue (Caric, 1994).

5.5.2.2. « Spray-coating »

Cette technique diffère légèrement des deux autres par le fait que la substance à encapsuler et le polymère d'encapsulation ne sont pas mélangés en une seule solution avant l'utilisation de la chambre de dessiccation. En fait, la substance à encapsuler doit être sous forme solide et maintenue en mouvement, habituellement par jet d'air au bas de l'appareil utilisé, par mouvement rotatif de l'appareil ou à l'aide d'un vaisseau spécialement adapté pour cette utilisation. La solution de polymères d'encapsulation est maintenue liquide et libérée par atomisation sur les particules dans la chambre à dessiccation. Les gouttelettes peuvent être libérées dans l'appareil sous l'influence de jets d'air de différents angles : par lit fluidisé, par technologie « Wurster » et tangentiellement (Champagne et Kailasapathy, 2008).

Les conditions d'utilisation de cette technique doivent être surveillées puisqu'une forte hausse de température peut survenir lors de l'utilisation de l'appareil, ce qui pourrait nuire à la survie de cellules bactériennes. De plus, il est à noter que l'encapsulation des particules augmentera leur volume de 30 à 80%, ce qui pourrait entraîner des différences de texture lors d'ajout des particules dans des produits alimentaires. Le « spray-coating » est la technique d'encapsulation la plus fréquemment utilisée commercialement, et possède également un excellent potentiel lors de double encapsulation. De plus, les particules produites ont démontré une excellente résistance à des conditions acides, humides et à l'oxygène sur de courtes périodes (Champagne et Kailasapathy, 2008).

Bref, l'atomisation est une technique très avantageuse par rapport aux autres méthodes d'encapsulation, puisqu'il s'agit d'une méthode rapide, simple, flexible et

peu dispendieuse. De plus, on peut effectuer le procédé en continu. En fait, tous ces avantages en ont fait la méthode la plus utilisée dans l'industrie alimentaire pour les ingrédients thermorésistants (Kailasapathy, 2002). On dénote cependant certains désavantages, comme la possibilité de dénaturer les composés d'intérêt à la chaleur et l'obtention à la fin du processus de capsules contenant une quantité en solvant résiduel trop élevée pour la commercialisation. Par contre, ce solvant résiduel est retrouvé en plus faible quantité que pour d'autres techniques, dont l'émulsion (Benita, 2006). Les probiotiques étant thermosensibles, cette technique leur est difficilement applicable.

5.5.3. Émulsion

Le principe général est de dissoudre ou disperser le produit ou les microorganismes à encapsuler dans une solution de solvant volatil difficilement miscible dans l'eau où on aura préalablement dissous le polymère d'intérêt. La solution résultante est alors homogénéisée dans une solution aqueuse contenant des molécules tensioactives comme l'alcool polyvinyl, jusqu'à l'obtention de gouttelettes hydrophobes de solvant organique dispersées dans la phase aqueuse (« oil-in-water emulsion »). Le soluté hydrophobe est par la suite éliminé par différentes techniques, puis les particules sont lavées et récoltées par filtration. Cette technique est très efficace pour les molécules apolaires à encapsuler; cependant, lorsqu'il s'agit de molécules polaires, on peut utiliser une variante qui est l'émulsion anhydre. À ce moment, on utilisera comme solvant organique un composé volatil non miscible dans l'huile dans lequel on dissoudra le composé d'intérêt, puis on procédera à l'émulsion dans une huile ou un solvant organique enrichi de surfactant (« oil-in-oil emulsion ») (Benita, 2006). D'autres variantes existent de ce système d'émulsion, dépendant du produit à encapsuler. En fait, la concentration et le type d'ingrédients utilisés lors du processus, de même que les conditions de l'homogénéisation ont une influence directe sur la stabilité et les propriétés physico-chimiques de l'émulsion (McClements, 2005).

L'émulsion présente différents avantages pour l'utilisation industrielle. Entre autres, il s'agit d'une technique simple et plus facile à adapter pour de grands volumes que les autres techniques. De plus, les capsules obtenues sont très petites (Krasaekoopt *et al.*, 2003). Cependant, certains désavantages sont entraînés par cette technique, dont la possibilité de perdre les composés à encapsuler par mortalité à cause des émulsifiants utilisés, par perte dans la phase aqueuse ou dénaturation des protéines aux interfaces entre les solvants (Benita, 2006) et la difficulté de stabiliser les particules dans les produits alimentaires à cause de la coalescence entre les gouttelettes ou le transfert des molécules d'eau de l'intérieur de la capsule vers la couche externe (Garti et Benichou, 2004).

En fait, le principe de l'émulsion est difficilement applicable pour l'encapsulation de cellules. La taille des molécules obtenues par émulsion n'est pas garantie d'un essai à l'autre. Dans le cas de grosses particules, comme des cellules, on peut observer une diminution de l'efficacité de l'encapsulation, dû à la coalescence des gouttelettes, à la forte probabilité qu'un contact se fasse entre la solution interne et la phase d'extraction externe et à la porosité plus élevée des microsphères avec leur environnement (Obeidat, 2009). De plus, l'émulsion ne permet pas d'obtenir une double couche lipidique comme membrane. Les cellules ont besoin de ce type de protection qui leur permet une liberté de mouvement et de changement de forme (Stachowiak *et al.*, 2009). De ce fait, il peut être plus difficile de travailler avec cette méthode dans le but d'encapsuler des cellules. Toutefois, l'émulsion a été utilisée avec succès à quelques reprises comme technique de microencapsulation de probiotiques (Hou *et al.*, 2003; Pimentel-González *et al.*, 2009; Sheu et Marshall, 1993; Adhikari *et al.*, 2000).

5.5.4. Séparation de phase

Cette technique, également appelée la coacervation, peut être utilisée pour des molécules hydrophiles ou hydrophobes. Le principe est simple : on dissout d'abord le polymère choisi dans un solvant organique et on ajoute le produit à encapsuler.

On diminue ensuite la solubilité des polymères en faisant varier la température ou en ajoutant un troisième composé réagissant avec le solvant organique, appelé l'agent de coacervation. Cet agent produit des capsules contenant les composés d'intérêt qui seront solidifiées par l'ajout d'agent solidifiant volatil. Les microcapsules sont alors lavées puis récoltées par filtration. Cependant, il est possible avec cette technique qu'à la fin du processus, les capsules contiennent une quantité de solvant résiduel trop élevée pour la commercialisation (Benita, 2006). Cette technique est souvent utilisée dans le domaine alimentaire pour encapsuler des saveurs dans les aliments devant être soumis à des procédés de cuisson ou des chaleurs drastiques (Soper, 1995). Elle a également été testée pour l'encapsulation de probiotiques, mais rarement et toujours en combinaison avec une autre technique de microencapsulation (Oliveira *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2009).

5.5.5. Techniques « à sec »

Comme le problème de solvant résiduel apparaît pour toutes les méthodes décrites précédemment, des chercheurs se sont tournés vers des techniques réalisées à sec, c'est-à-dire sans solvant organique. Deux de ces techniques sont le moulinage et l'extrusion.

5.5.5.1. Moulinage

Plusieurs techniques font partie de cette catégorie, dont le « jet milling ». Dans ce procédé, les polymères sont fondus et mélangés au composé à encapsuler. Cette solution est alors solidifiée par plusieurs séquences de refroidissements, puis passée dans un type de moulin qui permet une première séparation. Plusieurs cycles de moulinage sont alors réalisés, jusqu'à l'obtention de microcapsules de taille voulue et à la surface lisse. Les désavantages liés à cette technique sont la possibilité de dénaturer les composés d'intérêt à la chaleur et la répartition non uniforme des capsules, c'est-à-dire qu'elles sont de formes et de grosseurs différentes les unes des autres (Benita, 2006).

5.5.5.2. Extrusion

Le processus consiste à mélanger le composé à encapsuler sous forme solide et sèche avec un agent épaississant comme le glycérol ou la cellulose et une faible quantité d'eau. Les granules sont ainsi formées dans une extrudeuse aux pores de diamètre d'environ 1 mm. La solution peut alors être libérée en fines gouttelettes pour séchage à l'air ou utilisation dans la technique du « spray-coating ». Cette technique n'est pas la plus recommandable pour l'encapsulation de probiotiques, puisque les concentrations de poudre encapsulée obtenues ne sont pas très élevées, ce qui peut limiter l'utilisation dans le domaine alimentaire. Ce problème est dû au faible taux de bactéries par rapport à la quantité de polymère d'encapsulation retrouvé dans le produit final. Cependant, un avantage non négligeable est que, contrairement aux autres techniques d'encapsulation, le polymère protecteur utilisé peut être un prébiotique (Champagne et Kailasapathy, 2008).

Toutes ces méthodes d'encapsulation et d'autres encore peuvent être utilisées en industrie alimentaire, mais elles ne sont pas toutes applicables dans le cas de l'encapsulation de probiotiques. Certaines méthodes d'émulsions très fines ou autres méthodes nanotechnologiques comme l'encapsulation en liposomes ou en cyclodextrines, ne sont pas applicables dans le cas d'encapsulation de cellules, compte tenu de leur taille et du procédé d'encapsulation de ces méthodes.

6. Choix des polymères à tester

Le choix des polymères pour la microencapsulation de cellules vivantes est très important pour le bon déroulement d'une expérience et déterminant pour le choix de la technique à utiliser. En effet, un polymère peut s'avérer biocompatible, mais inutilisable pour certains types d'expérimentation à cause de conditions physiques nécessaires pour son utilisation qui ne permettraient pas la survie cellulaire durant le processus de microencapsulation. De plus, certains types de polymères pourraient laisser passer différentes molécules et microstructures du milieu environnant, dont

des particules de solvant, ce qui pourrait entraîner des changements au niveau des caractéristiques des cellules encapsulées (Kühtreiber *et al.*, 1999).

Dans le but d'encapsuler des bactéries, plusieurs polymères doux et non toxiques peuvent être utilisés, qu'on peut classer en 3 catégories (Champagne et Kailasapathy, 2008).

- 1- Lipides : cires (paraffine, cire d'abeille, etc.), acides gras (acides oléiques, palmitiques et stéariques), huiles hydrogénées ou solidifiées, mono- ou diglycérides, gras d'origine animale et phospholipides
- 2- Protéines : gluten, caséine, etc.
- 3- Glucides : cellulose, κ -carraghénane, alginate, chitosane, amidon, etc.

Le choix du ou des polymères (dans le cas d'une double encapsulation) à utiliser doit être basé sur plusieurs points : polymères multibarrières efficaces, économiques et de grade alimentaire, résistants à de hautes températures et à la compression, possédant une faible affinité pour l'oxygène et la vapeur d'eau, une faible hygroscopicité et solubilité, résistants à l'acidité et qui permettront un relargage des bactéries dans le tractus gastro-intestinal (Picot, 2005). En fait, la plupart des polymères lipidiques utilisés plus couramment pour la microencapsulation de probiotiques ont un point de fusion au-delà de 40°C, afin de s'assurer que les particules ne libéreront pas leur contenu dans l'estomac sous l'effet de la chaleur, mais plutôt dans l'intestin, sous l'effet des sels biliaires et lipases pancréatiques (Champagne et Kailasapathy, 2008).

Voici une brève description de certains des polymères les plus couramment utilisés dans le domaine de la microencapsulation.

6.1. Alginate

Il s'agit du polymère le plus fréquemment utilisé pour la microencapsulation bactérienne, dû à son innocuité, à la fermeté de son gel, au fait qu'il permette une

bonne viabilité des bactéries à long terme et à la réversibilité de son gel (le gel est défait lorsque les ions liants sont séquestrés, ce qui libère le contenu des capsules). Ce polysaccharide provenant d'algues marines est formé de résidus d'acide mannuronique 1,4- β -D (bloc M) et d'acide guluronique α -D (bloc G) liés ensemble. La gélification se produit par contact avec des cations divalents et trivalents, généralement des Ca^{2+} , qui se lient avec les blocs G. Les ions divalents lient deux blocs G, formant ainsi plusieurs cavités électro-négatives (Kühtreiber *et al.*, 1999).

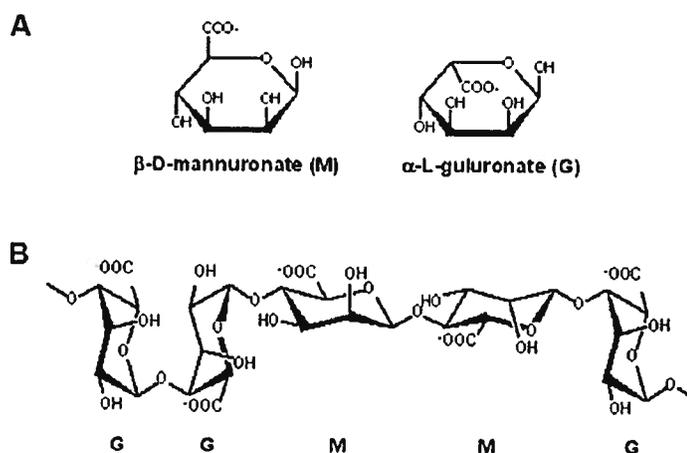


Figure 5 : Structures de l'alginate: (a) les monomères d'alginate; (b) la chaîne d'alginate. (Sriamornsak et Sunghongjeen, 2007)

L'alginate est un groupe de polymères hétérogènes; il faut donc en choisir un type particulier pour les expérimentations. L'alginate possédant un haut pourcentage de blocs G permettra de plus nombreuses liaisons avec les ions, ce qui entraînera la production d'un gel plus ferme, plus stable et plus tolérant aux sels et agents chélateurs (Kailasapathy, 2002). Cependant, les qualités de l'alginate sont limitées comme agent protecteur, puisque ce polymère est plutôt sensible à plusieurs chélateurs de calcium, dont le phosphate, le lactate et l'EDTA, de même qu'à différents cations capables de déloger les Ca^{2+} , comme le sodium et le magnésium. Cette faible résistance peut être améliorée de différentes façons, soit par l'utilisation d'alginate plus riche en blocs G, l'utilisation d'agents gélifiants plus forts comme le baryum ou l'aluminium, des techniques de compression des billes formées ou

encore l'enrobage des billes de gel (Macouzet et Champagne, 2007; Kühtreiber *et al.*, 1999). L'alginate est également sensible à l'acidité, tel que démontré lors d'études de la résistance des billes d'alginate soumise aux conditions de fermentation lactique (Eikmeier et Rehm, 1987; Roy *et al.*, 1987; Ellenton, 1998).

Le diamètre estimé des pores d'un gel d'alginate est d'environ 17 nm, ce qui est intéressant pour l'encapsulation de probiotiques, dont le diamètre se situe généralement entre 1 et 3 μm (Klein *et al.*, 1983). Certaines études tendent à démontrer que l'alginate offrirait une meilleure protection pour les probiotiques que certains autres polymères, mais d'autres recherches doivent être faites à ce sujet (Muthukumarasamy *et al.*, 2006; Kailasapathy et Sureeta, 2003).

6.2. κ -carraghénane

Ce polymère est retrouvé dans la membrane cellulaire et la matrice intercellulaire d'algues marines et possède une masse moléculaire élevée. La molécule de ce polysaccharide est formée par une suite d'unités de D-galactose et de 3,6-anhydro-galactose. La principale différence entre les kappa-, iota- et lambda-carraghénanes est le nombre et la position des groupes ester sulfate, de même que le nombre d'unités 3,6-anhydro-galactose (Porto, 2003).

Le κ -carraghénane a la propriété de former un gel en présence de solution cationique, entre autres à base de cations de potassium (Kailasapathy, 2002). Pour ce type de carraghénane, le gel présente de la synérèse. La quantité de synérèse de même que la force du gel sont directement proportionnelles à la concentration en sels de la solution cationique utilisée. Par contre, une quantité excessive de sel dans la solution aura pour effet d'affaiblir le gel (Porto, 2003).

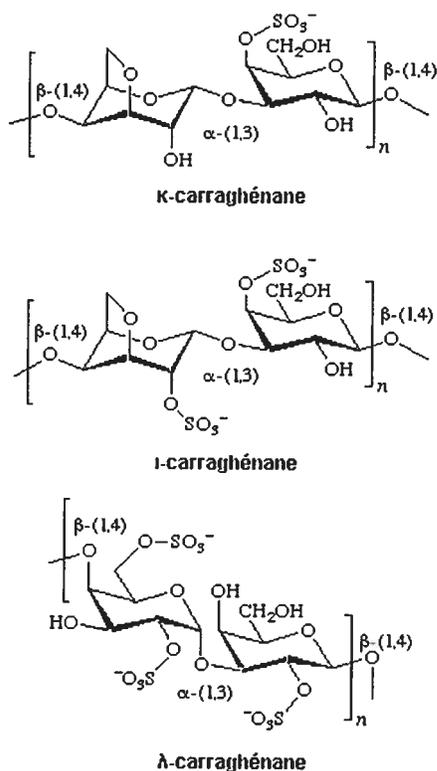


Figure 6 : Structures de différents types de carraghénanes
(adapté de « The Enzyme Database », 2011)

Le κ-carraghénane et l'alginate sont fréquemment utilisés pour l'immobilisation de cellules vivantes pour incorporation à des produits de la fermentation lactique. Le κ-carraghénane possède par contre l'avantage d'être moins sensible à l'acidité que l'alginate. De plus, ce polymère a une propriété d'interaction avec les protéines laitières, dû à la liaison des groupes ester sulfate chargés négativement de la molécule de carraghénane et les micelles de caséines chargées positivement du lait. Cette propriété peut alors être exploitée par les producteurs laitiers, afin d'utiliser les capacités gélifiantes des carraghénanes pour stabiliser ou modifier la texture de leurs produits. La réactivité est cependant dépendante de la concentration du polymère, de la température, du pH et du point isoélectrique des protéines (Porto, 2003).

Il y a également quelques désavantages à l'utilisation de κ -carraghénane. Tout d'abord, le potassium qui est utilisé pour produire le gel ne doit préférablement pas se retrouver en grande quantité dans des produits alimentaires, afin d'éviter tout problème relié à l'équilibre corporel en électrolytes chez les consommateurs (Sun et Griffiths, 2000). De plus, les ions de potassium pourraient entraîner des dommages cellulaires aux cellules de *Bifidobacterium longum* lors de fermentation lactique, ce qui fait de ce polymère un choix moins intéressant dans le cas de notre recherche (Paquin *et al.* 1990).

6.3. Amidon

L'amidon est un composé abondant dans la nature, puisqu'il agit comme réserve glucidique chez les plantes. Ce polymère est synthétisé par les amyloplastes des cellules végétales et est formé de deux polysaccharides : l'amylose et l'amylopectine. Les deux molécules sont des polymères provenant de l' α -D-glucose. L'amylose est une chaîne de molécules linéaires qui adoptent une conformation d'hélice simple ou double, tandis que l'amylopectine est une molécule fortement ramifiée. L'amidon sous sa forme naturelle est formé de 10 à 20% d'amylose et de 80 à 90% d'amylopectine (Averous, 2007).

L'amidon possède un potentiel de polymère de bioencapsulation, puisque ce composé est reconnu pour créer une forte adhésion avec les bactéries (Anderson et Salyers, 1989). Différents aliments ont déjà été utilisés pour vérifier le potentiel de microencapsulation de leur source d'amidon, dont le maïs, la pomme de terre, l'avoine et l'orge (Crittenden *et al.*, 2001).

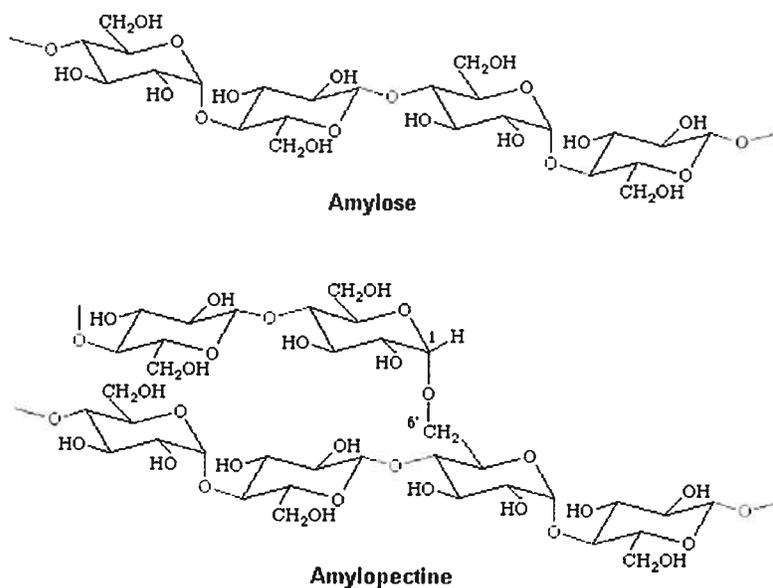


Figure 7 : Structures de l'amylose et de l'amylopectine, les deux molécules formant l'amidon (adapté d'Averous, 2007)

Les résultats obtenus pour le relargage des probiotiques dans l'intestin, lors d'analyses de digestion *in vitro* de microcapsules de probiotiques et d'amidon, ont permis d'obtenir des résultats prometteurs (Crittenden *et al.*, 2001). Cependant, les populations de bactéries encapsulées sont plus faibles lors de l'utilisation d'amidon que lors de l'utilisation d'autres techniques. De ce fait, les concentrations de capsules requises dans les aliments seraient plus grandes pour satisfaire aux standards établis, et un effet sur la texture de l'aliment fonctionnel est probable, ce qui pourrait constituer un désavantage de l'utilisation de ce polymère (Champagne et Kailasapathy, 2008).

6.4. Gomme de gellane

Cet exopolysaccharide provient de la bactérie *Sphingomonas elodea* et est hydrosoluble et très résistant à la chaleur. Lorsque ce polymère est dissous dans un tampon citrate, phosphate ou EDTA, la température requise pour la formation des

billes est moins élevée, ce qui peut permettre l'encapsulation de bactéries mésophiles (Kailasapathy, 2002). Les propriétés physiques de ce polymère en font un bon candidat comme agent gélifiant pour les aliments et le dentifrice (Patil *et al.*, 2010). Ses capacités de relargage contrôlé de molécules bioactives sont déjà exploitées dans l'industrie pharmaceutique pour administration de médicaments (Miyazaki *et al.*, 1999).

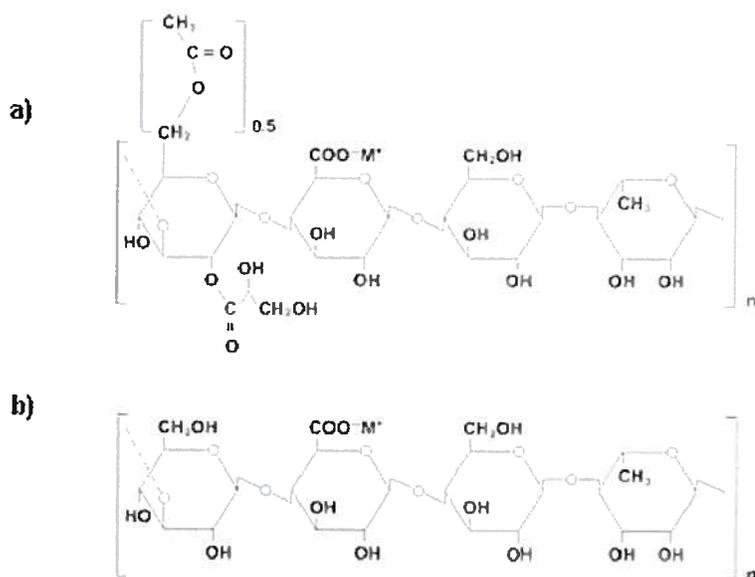


Figure 8 : Structures de la gomme de gellane a) unité tétrasaccharide répétitive dans une molécule de gomme de gellane riche en radicaux acyl b) unité tétrasaccharide répétitive dans une molécule de gomme de gellane pauvre en radicaux acyl (DSM Zhongken Biotechnology Co., Ltd. 2010)

De plus, des billes formées avec gellane et xanthane peuvent présenter des caractéristiques intéressantes pour le domaine alimentaire, comme une forte résistance à l'acidité et la stabilisation par des ions calciums (Norton et Lacroix, 1990). Leur utilisation pour microencapsulation de bifidobactéries incorporées à du yogourt a déjà été démontrée efficace pour améliorer la survie des probiotiques au cours d'une conservation de 5 semaines (Sun et Griffiths, 2000). Des cellules de *Bifidobacterium lactis* encapsulées avec de la gomme de gellane ont également été

démontrées résistantes à une solution enzymatique simulant les conditions retrouvées dans l'estomac, mais sensibles à une solution enzymatique simulant les conditions retrouvées dans l'intestin, ce qui représente la condition recherchée pour la microencapsulation de probiotiques. Cependant, il a également été démontré que ce type de capsule pouvait être facilement brisé par un stress mécanique comme la mastication. L'encapsulation de probiotiques pour ajout à des matrices alimentaires ne devrait donc pas être faite uniquement avec de la gomme de gellane, à moins que l'aliment n'ait pas à être mastiqué, comme dans le cas d'ajout à du jus (Kokott, 2006).

6.5. Carboxymethyl cellulose

La cellulose est un composé végétal auquel on peut faire subir un processus de carboxymethylation pour obtenir le carboxymethyl cellulose. Les groupes carboxyliques de ce polymère peuvent se lier avec des ions métalliques pour former des gels ionotropiques, dont les interactions électrostatiques permettent la stabilisation. De tels gels sont insolubles dans l'eau à cause des interactions des groupes $-OH$ et des ions métalliques.

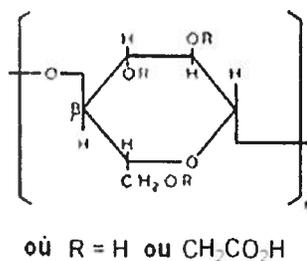


Figure 9 : Structure répétitive dans la molécule de carboxymethyl cellulose (adapté d'Archi Exim Private Limited, 2011)

Ce type de gel a un potentiel pour permettre la libération contrôlée des produits encapsulés, surtout dans un cas de double encapsulation (Patil *et al.*, 2010). Par contre, les composés dérivés de la cellulose ne peuvent pas être dégradés par les enzymes naturellement produites dans le corps humain (Reeves *et al.*, 2010). Ce

composé n'est donc pas un candidat idéal pour la microencapsulation de cellules qui doivent être libérées dans l'intestin, à moins d'également ajouter dans l'aliment une enzyme comme la cellulase, qui serait capable de digérer la paroi des microcapsules.

6.6. Gélatine

La gélatine est un dérivé hydrolysé du collagène. Les collagènes en général se dissolvent à un pH faible. Pour réaliser une gélification de ce type de composé, les molécules à encapsuler doivent être mélangées à température, force ionique et pH faibles. L'augmentation de ces 3 paramètres entraîne la solidification. Dans le cas de la gélatine, les billes sont formées après égouttage dans une solution hydrophobe froide, à laquelle on aura ajouté un réticulateur pour solidifier et stabiliser le gel (Kühtreiber *et al.*, 1999).

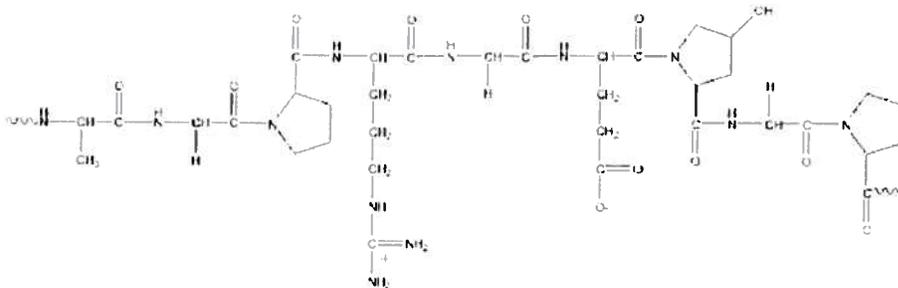


Figure 10 : Structure typique de la molécule de gélatine, faite de plusieurs résidus de glycine, proline et 4-hydroxyproline (Chaplin, 2011)

Des essais d'encapsulation des probiotiques ont déjà été faits avec la gélatine et ont démontré que des lactocoques réussissent à croître dans une microcapsule de ce polymère (Hyndman *et al.*, 1993). Cependant, le gel créé par la gélatine est thermoréversible, ce qui peut être négatif pour l'ajout à des aliments. C'est pourquoi la gélatine est souvent utilisée de pair avec un autre composé comme l'alginate pour créer une microcapsule plus résistante aux conditions retrouvées dans le tractus gastro-intestinal (Li *et al.*, 2009; Annan *et al.*, 2008).

6.7. Pectine

La pectine est un polysaccharide, dont la molécule est une longue chaîne d'acide pectique et d'acide pectinique. Ce polymère provient de la membrane cellulaire de plantes, où son rôle est de joindre les cellules végétales entre elles (Field, 2011).

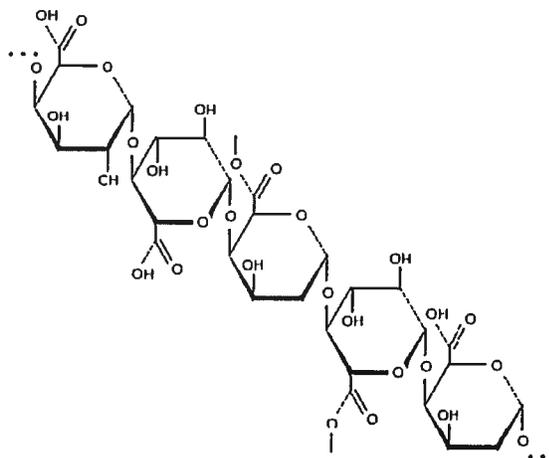


Figure 11 : Chaîne principale d'une molécule de pectine (Field, 2011)

Des gels sont créés par égouttage de pectine dans une solution ionique d'aluminium ou de calcium, de la même façon que l'alginate. Les billes ainsi fabriquées présentent également quelques caractéristiques des billes d'alginate, telles la concentration décroissante du bord de la bille au centre. Cependant, l'avantage des billes de pectine est leur meilleure tolérance à des chélateurs et compétiteurs que les billes d'alginate (Kühntreiber *et al.*, 1999). Des essais d'encapsulation de probiotiques avec de la pectine ont démontré que ce type de microcapsule était plus stable que celles de microcapsules d'alginate, mais que la survie et la croissance des bactéries étaient meilleures pour les billes d'alginate lors d'inoculation en milieu d'enrichissement (Voo *et al.*, 2011).

6.8. Chitosane

Le chitosane est « un polysaccharide polyglucosamine obtenu par la déacétylation de la chitine. » (Kühntreiber *et al.*, 1999). Ce polymère est hydrosoluble et forme un gel en présence de polycations. On peut donc se servir de cette faculté pour produire des billes assez résistantes, en laissant s'égoutter une solution de chitosane dans un bain de solution phosphatée, à titre d'exemple. Cependant, le chitosane possède des propriétés antibactériennes, puisqu'il peut interagir avec les membranes cellulaires menant à la diminution de la viabilité ou de l'activité. Dans l'encapsulation de bactéries, il ne peut donc servir que comme deuxième membrane à l'extérieur des capsules. Cependant, son utilisation dans le domaine alimentaire est prohibée au Canada (Kailasapathy, 2002; Kühntreiber *et al.*, 1999). Par contre la poly-L-lysine pourrait substituer le chitosane dans cette application (Krasaekoopt *et al.*, 2004; Bhatena *et al.*, 2009).

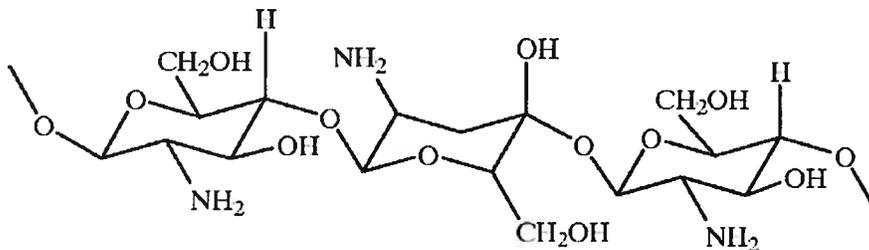


Figure 12 : Structure générale du chitosane, où au moins quelques groupes acétylamine ont été transformés en groupes amine (Fan *et al.*, 2005)

6.9. Alcool polyvinyl

Ce polymère a la particularité de se gélifier par congélation, dû à l'exclusion de l'alcool polyvinyl des cristaux d'eau, ce qui concentre le produit et permet la gélification. Des cycles répétés de congélation/décongélation permettent donc de solidifier le gel. Les avantages de cette procédure sont la stabilité des gels à l'acidité et à de hautes températures, la faible perméabilité de l'oxygène et la possibilité

d'encapsuler des microorganismes thermophiles. De plus, ce polymère est peu coûteux et non toxique.

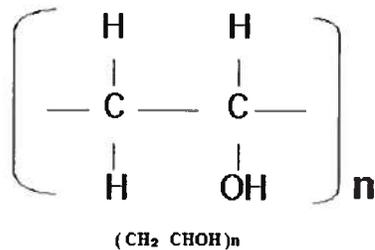


Figure 13 : Structure répétitive d'une molécule d'alcool polyvinyl (Essindustry, 2011)

Le gel peut également être solidifié par réticulation de l'alcool avec de l'acide borique, mais les conditions fortement acides requises par cette méthode la rendent moins accessible pour l'encapsulation de cellules (Kühtreiber *et al.*, 1999).

6.10. Protéines et gras laitiers

L'utilisation de protéines et gras laitiers pour l'encapsulation de probiotiques commence à être étudiée par les chercheurs, puisque lors d'ajout de cellules à des produits alimentaires, il peut être avantageux d'utiliser des molécules qui ne modifieront pas les conditions de l'aliment. L'utilisation de protéines laitières comme agent encapsulant pour l'ajout dans des produits laitiers permet de respecter tout à fait les conditions et ingrédients du produit.

Certaines équipes de recherche ont pu démontrer que l'encapsulation dans des matrices à base de substances laitières peut améliorer la survie de probiotiques à des conditions difficiles comme une forte acidité et à la présence de bile (Reid *et al.*, 2005; Heidebach *et al.*, 2009). Lors d'essais d'ajout de cellules encapsulées à du yogourt, les résultats obtenus varient selon la souche de probiotique encapsulée; de ce fait, certains résultats démontraient une amélioration de la survie (Picot et Lacroix, 2004) et certains n'ont pas démontré d'amélioration (Modler et Villagarcia, 1993). L'utilisation de protéines et gras laitiers pour l'encapsulation de probiotiques est donc une avenue à développer.

7. Aliments enrichis de probiotiques encapsulés

Plusieurs produits alimentaires ont été testés pour l'ajout de probiotiques encapsulés avec vérification des différences de viabilité. Le yogourt est une denrée qui a fait l'objet de plusieurs études. Les résultats de ces différentes recherches sont partagés : certaines présentent des résultats de meilleures survies bactériennes pour les probiotiques encapsulés (Talwalkar et Kailasapathy, 2004; Picot et Lacroix, 2004; Krasaekoopt *et al.*, 2006; Kailasapathy, 2006; Adhikari *et al.*, 2000), et d'autres présentent des résultats moins concluants (Sultana *et al.*, 2000; Ferreira Grosso et Fávoro-Trindade, 2004). Dans le cas de l'étude de Talwalkar et Kailasapathy (2004), il est intéressant de constater que le micro-emprisonnement de probiotiques sensibles à l'oxygène améliorerait la viabilité des cellules davantage à cause de la protection de l'oxygène que des conditions acides du yogourt, du moins à court terme. De plus, un fait tiré des analyses sensorielles a pu être observé par au moins deux équipes de recherche, soit que la texture des yogourts risque d'être modifiée lors de l'ajout de cellules microencapsulées, ce qui n'est évidemment pas souhaitable (Kailasapathy, 2006; Adhikari *et al.*, 2000).

D'autres aliments ont également démontré que la microencapsulation des probiotiques était bénéfique pour la viabilité bactérienne, dont les desserts congelés (Sheu *et al.*, 1993; Shah et Ravula, 2000; Homayouni *et al.*, 2008) Dans le cas de l'équipe de Homayouni (2008), l'encapsulation en billes d'alginate a amélioré de 30% le taux de survie de deux souches probiotiques ajoutées dans de la crème glacée, conservée sur une période de 180 jours. De plus, l'ajout de ces cellules microencapsulées n'a pas affecté les propriétés sensorielles de l'aliment, ce qui démontre que la microencapsulation des probiotiques peut être une avenue très intéressante dans le domaine des aliments congelés. Dans le cas de l'ajout de probiotiques microencapsulés à du lait, les résultats se sont avérés concluants pour l'équipe de Truelstrup-Hansen (2002). Dans le cas de Ferreira Grosso et Fávoro-Trindade (2004), la survie bactérienne était bonne dans du lait et du lait acidifié, mais la différence entre les probiotiques libres et les probiotiques encapsulés n'était pas significative.

Des recherches ont également été menées par différentes équipes pour l'ajout de probiotiques encapsulés à du fromage. Pour la majorité des équipes, les résultats de ces études se sont avérés non concluants. En effet, l'encapsulation des probiotiques dans des billes d'alginate n'a pas amélioré la viabilité de probiotiques pour plusieurs équipes (Gobbetti *et al.*, 1998; Godward et Kailasapathy, 2003; Kailasapathy et Masondole, 2005), ni dans le cas de cultures encapsulées par « spray-coating » dans du fromage en crème (Belvis *et al.*, 2006). Certaines études ont toutefois permis de démontrer que des bactéries probiotiques encapsulées présentaient de bons taux de survie dans des matrices fromagères (Darukaradhya, 2005; Chan et Zhang, 2005; Eisberg, 2009; Sodini-Gallot *et al.*, 1995; Barakat *et al.*, 2009).

Il a également été démontré que la microencapsulation des probiotiques améliorerait la survie dans le fromage en comparaison avec des probiotiques libres, pour au moins deux techniques de microencapsulation. L'équipe d'Özer (2008) a réussi à obtenir de meilleurs taux de survie pour les probiotiques encapsulés lors d'ajout à du fromage kasar entreposé sur une période de 90 jours. De même, l'ajout de cellules de *Bifidobacterium bifidum* encapsulées par émulsion avec du κ -carraghénane a permis l'obtention de meilleurs taux de survie que les probiotiques libres dans du fromage Kareish au cours d'un entreposage de 10 jours (Abou Dawood, 2002).

Plusieurs autres types d'aliments ont également fait l'objet d'études pour l'ajout de probiotiques encapsulés, dont des jus de fruits, où la microencapsulation s'est avérée efficace pour améliorer la survie des bactéries sur une période de 6 semaines (Ding et Shah, 2008). Des essais ont également été menés dans des aliments tels du beurre d'arachides et du pain, où la survie des probiotiques n'était pas améliorée par la microencapsulation. Dans le cas du pain, la mortalité des probiotiques, encapsulés ou non, était majoritairement due à la cuisson de la pâte (Belvis *et al.*, 2006).

De tous ces faits, on peut conclure que la matrice alimentaire de même que les conditions auxquelles seront exposés les aliments ont une forte influence sur la survie de bactéries encapsulées (Champagne et Kailasapathy, 2008).

8. Le fromage cheddar

8.1. Histoire du fromage

Le fromage est un aliment aux origines très anciennes et de découverte incertaine. Plusieurs légendes européennes circulent afin d'expliquer l'origine du fromage, mais aucune ne permet d'être précis quant aux débuts historiques de cet aliment. La date d'invention est également inconnue, mais les historiens évaluent que les premiers fromages étaient fabriqués plus de 4000 ans avant notre ère, dû à des frises découvertes dans un temple d'Ur représentant un prince dégustant un fromage composé de lait de vache et de chèvre datant de cette époque. L'histoire nous apprend encore que le fromage était parfaitement connu des Assyriens, Babyloniens et Égyptiens, de même que les Athéniens qui en nourrissaient leurs athlètes et les Romains, leurs soldats. La *Bible*, l'*Odyssée* d'Homère et des écrits d'Aristote et de Virgile font également allusion à la consommation ou la fabrication de fromage (Selrac, 1964).

Le mot « fromage » est utilisé depuis plusieurs centaines d'années et vient du mot grec « formos » qui désignait un panier d'osier qui était utilisé lors de la fabrication de fromage, afin que le caillé s'égoutte et prenne sa forme, c'est-à-dire ce qu'on appelait le « fromage ». La déformation de ce mot a mené au mot « fromage », utilisé depuis ce temps (Selrac, 1964). La dénomination « fromage » est réservée à un « produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitières suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse ». En fait, le fromage est le produit obtenu suite à la concentration des éléments majeurs du lait sous l'action de l'acidification et/ou d'une enzyme (Mahaut *et al.*, 2000).

8.2. Le cheddar

Malgré la grande popularité du fromage cheddar, le procédé de fabrication de ce produit n'est pas contrôlé. En fait, le nom « cheddar » n'est pas protégé, malgré l'origine de ce fromage, fabriqué depuis au moins l'an 1170 dans le village anglais Cheddar, à Somerset. Cette date a été retenue, considérant que la plus vieille transaction de ce type de fromage répertoriée a été faite par le roi Henri II cette même année.

L'origine du cheddar est incertaine, mais la légende veut que la découverte de grains de caillés dans un contenant de lait qu'on tentait de préserver dans une caverne des gorges de Cheddar aurait été accidentelle. Cependant, l'affinage du procédé de fabrication s'est développé au 16^e siècle, lorsque les fromagers ont découvert que la durée de conservation du fromage augmentait lorsque l'excédent de liquide était extrait des fromages, ce qui a mené au développement des étapes de cheddarisation et de pressage lors de la fabrication de fromage cheddar.

Cependant, certains critères sont communs à tous les fromages cheddar produits universellement, tels qu'il est fait de lait de vache et possède une pâte ferme, le goût passant de doux à fort, selon la période de vieillissement (Marshall, 2008). Chaque pays possède sa propre législation pour l'appellation « cheddar », comme au Canada, où l'appellation demeure contrôlée.

8.3. Définition du fromage cheddar selon Santé Canada

« Produit de la coagulation, à l'aide de bactéries, du lait, de produits du lait ou d'un mélange de ceux-ci, en vue de former un caillé qui est ensuite soumis au procédé cheddar ou à un autre procédé qui donne un fromage possédant les mêmes propriétés physiques, chimiques et organoleptiques que le fromage produit par le procédé cheddar. » (Ministère de la Justice, 2011).

Le cheddar doit contenir au moins 31 % de matière grasse du lait et au plus 39 % d'humidité. Il peut contenir du sel, des cultures bactériennes d'affinage, des agents d'affermissement ou de conservation autorisés et du colorant alimentaire autorisé. Certaines dérogations sont cependant permises « si le fromage modifié conserve la saveur et la texture caractéristiques du fromage cheddar » (Ministère de la Justice, 2011).

Le fromage frais non pressé et non affiné est également commercialisé à certains endroits au Canada, dont majoritairement au Québec, au nord du Nouveau-Brunswick et à l'est de l'Ontario, de même que dans le nord-est des États-Unis. Au Québec, ce type de fromage est appelé fromage en grains. Comme le fromage en grains n'est pas soumis à un procédé d'affinage, les paramètres recommandés par la loi pour l'appellation fromage cheddar ne peuvent pas tous être atteints : le pourcentage d'humidité sera plus élevé pour le fromage en grains (maximum toléré de 41%), et le pourcentage de gras sera plus faible (Éditeur Officiel du Québec, 2009).

8.4. Marché du cheddar

Le cheddar est réputé comme le fromage le plus populaire au monde (Marshall, 2008). En fait, les chiffres démontrent que le cheddar est le fromage à pâte dure le plus fabriqué à travers le monde, majoritairement au Royaume-Uni, au Canada, en Australie, en Nouvelle-Zélande et aux États-Unis. Au Royaume-Uni, sa production atteint annuellement jusqu'à 55% de toute la production fromagère du pays (Donaghy et *al.*, 2004; Bérubé, 1995).

Au Canada, la production augmente d'année en année, suivant la popularité croissante du produit. Près de 143 100 tonnes de cheddar ont été produites au pays en 2007, ce qui représente 40% de toute la fabrication fromagère canadienne. Il s'agit là d'une augmentation de 4,9% par rapport à 2006; de plus, près de la moitié de ce fromage a été vendue au Québec uniquement (Statistiques Canada, 2007).

9. Fabrication du fromage cheddar

9.1. Les ferments

Les ferments utilisés pour la fabrication du fromage cheddar sont des bactéries lactiques mésophiles, comme pour la majorité des fromages, soit des bactéries répondant positivement au test de Gram, microaérophiles ou anaérobies facultatives, capables de fermenter les glucides, en particulier le lactose, en acide lactique. Cette acidification du milieu permet la coagulation du lait (aidée par l'action de la présure (voir définition en page 70)).

Le lait peut passer d'un pH de 6,7-6,8 à 5,5 par l'action des ferments, ce qui entraînera l'inhibition d'une grande quantité de bactéries, dont certains pathogènes. De plus, l'action inhibitrice des bactéries lactiques est souvent décuplée par la libération par certaines souches de peroxyde d'hydrogène, d'acides organiques, de diacétyl, d'acétaldéhyde ou de bactériocines (Bérubé, 1995).

Il est très important d'utiliser plusieurs souches bactériennes en guise de ferments parce que de cette façon, il y a diminution du risque de pertes économiques. En effet, les bactériophages peuvent être un problème important dans l'industrie fromagère puisque leur présence dans une culture bactérienne peut entraîner la mort de la majorité des cellules. Si les bactéries lactiques utilisées en guise de ferment pour la production de fromage meurent, il ne peut donc pas y avoir de coagulation du lait par leur action. En utilisant au moins deux souches bactériennes, on diminue le risque que le bactériophage anéantisse toute la culture, puisque les bactériophages sont souvent spécifiques à un genre bactérien. Si une seule des espèces est affectée, il peut quand même y avoir production de coagulation (Scott, 1986).

Aussi, on veut diminuer le risque que le substrat devienne limitant pour les ferments. En fait, la teneur en acides aminés libres dans le lait est très faible. La façon de libérer les peptides et les acides aminés des caséines du lait est la protéolyse, soit l'utilisation de peptidases et protéinases par les bactéries lactiques.

Selon l'échelle de protéolyse des différentes espèces du ferment, il y aura donc une forte probabilité qu'une plus grande diversité de peptides soient coupés, ce qui favorisera le métabolisme de toutes les bactéries du milieu. En utilisant plusieurs souches différentes de bactéries au départ, on s'assure que toutes les cellules du milieu ne se feront pas compétition pour les mêmes acides aminés, surtout que les bactéries lactiques sont généralement exigeantes du point de vue nutritionnel (Bérubé, 1995).

De plus, la protéolyse contribue à l'assouplissement de la pâte de fromage, puisque le réseau protéique est brisé. Les acides aminés et les peptides libérés par protéolyse contribuent à donner de la saveur au fromage, mais il faut faire attention au rendement, car une trop grande activité protéolytique entraîne un goût amer dans le fromage (à cause de la libération de petits peptides hydrophobes) et diminue donc grandement les qualités organoleptiques, ce qui n'est pas souhaitable (Rašić et Kurmann, 1983).

9.2. L'expérimentation

Les ferments qui seront utilisés lors des fabrications de fromage tout au long de l'expérimentation seront de source commerciale, soit de la compagnie CH-Hansen, Milwaukee, États-Unis. Ce ferment commercial est composé majoritairement de deux souches bactériennes, soit *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* et *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Il est également possible d'y retrouver des traces de *Leuconostoc cremoris*. *Lactococcus lactis* spp. *lactis* est couramment utilisée à titre de ferment pour la production de cheddar, puisque cette souche bactérienne a une grande activité protéolytique. Cette caractéristique est un problème pour la production de la majorité des fromages, mais pas pour le fromage cheddar frais, puisqu'il est nécessaire que la production se déroule rapidement. Une plus grande activité protéolytique entraînera donc une coagulation plus rapide, ce qui peut réduire le temps de production du fromage de plusieurs heures. *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* est également une souche de bactérie lactique couramment utilisée pour la production de fromage cheddar (Bérubé, 1995).

9.3. Procédé de fabrication

La présente section se réfère principalement à deux ouvrages, soit Mahaut *et al.*, 2000 et Bérubé, 1995.

Étape 1 : La préparation du lait

Il s'agit d'une étape caractérisée par la destruction de la flore d'origine du lait pour permettre de n'y retrouver que les bactéries sélectionnées. Elle permet également que la composition chimique du lait soit standardisée pour l'obtention d'un produit final stable d'une fabrication à l'autre.

Les moyens utilisés pour y parvenir :

1. Refroidissement

Freine l'activité de la flore microbienne

2. Clarification

Filtration dans un appareil appelé l'écrémeuse centrifuge, afin d'éliminer les poussières, résidus, leucocytes, cellules épithéliales, etc.

3. Bactofugation

Étape non essentielle. Permet de réduire le nombre de microorganismes du lait par ultracentrifugation dans un appareil appelé bactofuge. Sert principalement à éliminer les spores de *Clostridium tyrobutyricum* qui créent le gonflement de la pâte fromagère.

4. **Standardisation**

Régularise la composition du lait : on peut procéder à l'écémage ou à la concentration en protéines et matières grasses à l'aide d'appareils, comme une centrifugeuse à disques.

5. **Homogénéisation**

Stabilise l'émulsion de matière grasse dispersée dans la phase aqueuse en réduisant le diamètre des globules de gras et ainsi ralentir leur remontée à la surface. On utilise un homogénéisateur.

6. **Thermisation**

Améliore les qualités du lait cru en diminuant la quantité de bactéries, en ralentissant l'activité des psychrotrophes, en prévenant les fermentations indésirables, en favorisant les conditions de croissance pour les ferments et en corrigeant quelques conditions physico-chimiques dont la répartition des micelles de caséines. Traitement de 60 à 65°C pendant 10 à 20 secondes.

7. **Pasteurisation**

Détruit en totalité les agents pathogènes non sporulants, entre 95 et 99% de la flore d'origine du lait et plusieurs substances antibactériennes, ce qui va permettre un meilleur contrôle lors d'ajout de ferments. Traitement soit à 63°C pendant 30 minutes ou à 72,8°C pendant 12 à 40 secondes. Peut être fait dans un pasteurisateur.

8. **Traitements de correction**

Les différents traitements rendent le lait moins apte à la coagulation; il faut donc rétablir les équilibres protéiques et minéraux entre les phases soluble et micellaire. Le taux protéique du lait est habituellement réglé entre 35 et

40 g/L à l'aide de différentes techniques, dont l'élimination de l'eau par osmose inverse, concentration par nanofiltration, ultrafiltration, microfiltration ou par enrichissement en caséinates, afin d'améliorer l'aptitude du lait à la coagulation. La teneur en calcium est également régulée pour améliorer la capacité de coagulation du lait, par ajout de CaCl_2 en dose variant de 50 à 200 mg/L. D'autres traitements possibles sont la standardisation du taux de matière grasse, de la teneur en lactose et de l'équilibre salin.

9. Maturation du lait

Il s'agit d'une étape essentielle durant laquelle les bactéries lactiques sont ajoutées et s'acclimatent au milieu (voir le N.B.). En fait, les bactéries produisent des enzymes protéolytiques pour permettre une meilleure multiplication et production d'acide lactique. Cette étape permet aussi de contrôler le degré d'acidification du lait et contribue au rétablissement de l'équilibre physico-chimique. Pour la fabrication du fromage cheddar, cette étape s'effectue de 30 à 60 minutes à 30-32°C avec agitation constante.

10. Ajout de colorant

Différents colorants naturels peuvent être ajoutés pour pallier à la couleur du fromage qui est directement liée à la couleur du lait, parfois jaunâtre dans le cas du lait de vache et de couleur changeante selon l'alimentation de l'animal. Ces colorants sont souvent jaunâtres et plusieurs font partie de la famille des caroténoïdes, tels la β -carotène et le β -apo-8'-caroténal, utilisés sous une forme synthétique, et des extraits rocou (ou annatto) et de pétales de souci des jardins (ou marigold). Toutes ces molécules sont retrouvées naturellement dans plusieurs plantes et sont utilisées pour colorer les fromages, dont le cheddar. Anciennement, on utilisait beaucoup les pétales de soucis des jardins (*Tagetes erecta*), où on retrouve une forte proportion de lutéine, ayant le pouvoir colorant. L'utilisation de ce produit ajoutait du

coup, une saveur piquante et florale au fromage. Depuis l'importation de graines de rocouyer d'Amérique (*Bixa orenalla*), le « marigold » est toutefois moins utilisé, puisque l'extrait des enveloppes résineuses des graines de rocouyer, le rocou, caractérisé par une couleur rouge, présente l'avantage d'être sans saveur, ce qui est profitable pour l'industrie fromagère. Le pouvoir colorant du rocou est tiré de la forte proportion de bixine qu'on y retrouve, soit jusqu'à 10% du poids sec. D'autres types de molécules, telle la riboflavine (ou vitamine B₂), souvent de source synthétique, sont également utilisées à titre de colorant pour l'industrie fromagère (Britton, 1992). De façon générale, la concentration de colorant ajoutée est d'environ 66 mL par 1000 kg de fromage (Bérubé, 1995).

N.B. Le lait n'est pas un milieu de culture idéal pour les bactéries en raison de la nature des glucides qu'on y retrouve, sa faible teneur en acides aminés libres, sa composition relativement pauvre en certaines vitamines et son contenu en substances antimicrobiennes. Cependant, ces conditions n'empêchent pas bon nombre de microorganismes de coloniser (*Micrococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Streptomyces*, *Clostridium*, des coliformes, etc.).

Étape 2 : Ensemencement des bactéries lactiques

Le choix des bactéries lactiques est primordial afin d'obtenir les qualités organoleptiques recherchées dans le fromage. En effet, l'action de ces bactéries permet de libérer différents glucides, peptides, acides et lipides qui seront très importants pour la flaveur. La flaveur réfère à l'ensemble des perceptions olfactives et gustatives liées à la consommation d'aliments. Les recettes de ferments doivent donc être soigneusement élaborées, puisque le moindre changement de concentration ou de souche bactérienne peut grandement modifier le goût du fromage, comme dans le cas de *Lactobacillus casei* dont certaines souches produisent d'excellents cheddars, alors que d'autres résultent en fromage au goût

acide aux notes amères, ce qui n'est évidemment pas souhaitable (Cogan et Beresford, 2002; Lawrence et Gilles, 1987).

La microflore lactique choisie doit être présente dans le lait avant l'emprésurage, puisque l'action de ces bactéries permet d'abaisser le pH, permettant une coagulation du lait plus rapide. En fait, entre les pH 6,7 et 5,6, la vitesse de coagulation est multipliée par 30. Les bactéries lactiques utilisées pour l'ensemencement du lait sont essentiellement homofermentaires. Cependant, l'atteinte du pH désiré pour l'emprésurage demeure une variable qui n'est pas toujours bien maîtrisée, ce pour quoi certains fromagers utilisent d'autres techniques, comme l'ajout de gluconodelta lactone (GDL), de CO₂, de protéines sériques ou résines échangeuses d'ions.

Le GDL est hydrolysé graduellement en acide gluconique lorsqu'il est utilisé en milieu aqueux, ce qui explique l'acidification du lait dans une fabrication fromagère (De Kruif, 1997). Pour le dioxyde de carbone, l'acidification du lait est produite par la réaction chimique du CO₂ avec l'eau, ce qui permet d'obtenir au final un ion CO₃²⁻ et deux ions H⁺ (Smit, 2003). Dans le cas des protéines sériques, on peut, à titre d'exemple, faire référence à l'ajout au lait d'un lactosérum très acide provenant d'une culture antérieure de bactéries lactiques dans du lait ou du lactosérum (Ramet, 1993). Les résines échangeuses d'ions, quant à elles, permettent d'échanger des cations du lait, comme le calcium, et de libérer des ions H⁺ afin d'entraîner une acidification du milieu (Phillips and Williams, 2000).

L'enrichissement des bactéries fermentaires peut se faire selon 3 types d'ensemencement, soit les ferments traditionnels, l'ensemencement en cuve à ferments ou l'ensemencement direct du lait de fabrication. L'ensemencement direct est la technique la plus souvent utilisée dans le cas des fromages frais.

Étape 3 : La coagulation du lait

La coagulation du lait se produit à cause de la précipitation des caséines suite à la déstabilisation des micelles par acidification à leur point isoélectrique ($pI = 4,6$) ou suite à l'action d'enzymes coagulantes. Les enzymes coagulantes utilisées en fromagerie peuvent être d'origine animale, telles la présure et la pepsine, d'origine végétale, telles les enzymes de figuiers (ficine), d'ananas (bromélaïne), d'artichaut, de chardon, de courge, et autres, ou d'origine microbienne, telles les enzymes de différentes moisissures (*Endothia parasitica*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*) ou de bactéries (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*).

La perturbation des micelles de caséines entraînant la coagulation du lait est due à la baisse de répulsion électrostatique entre elles, leur déshydratation partielle ainsi que la solubilisation du calcium et du phosphore minéral. Il y a donc formation irréversible d'un gel dans lequel sont retenus les matières grasses, l'eau, le lactose, l'acide lactique, les minéraux, les vitamines, etc. Ce réseau protéique est appelé le coagulum. Celui-ci présente les caractéristiques de perméabilité satisfaisante, friabilité élevée, ainsi qu'une élasticité et une plasticité pratiquement nulles en raison du manque de structure du réseau protéique. En fait, les liaisons entre molécules sont de type hydrophobe de faible énergie, ce qui entraîne une faible résistance aux traitements mécaniques. Ce sont ces caractéristiques physicochimiques qui déterminent l'aptitude du coagulum à l'égouttage, et ainsi, les caractéristiques finales du fromage.

Dans le cas du fromage cheddar, l'acidification du lait est produite par l'ajout au lait de présure et de ferments lactiques. La présure est un mélange d'enzymes d'origine animale ou synthétique. Elle est en fait composée de chymosine et de pepsine. L'enzyme active en est la chymosine, une enzyme retrouvée dans le quatrième estomac de jeunes ruminants non sevrés. La chymosine permet tout d'abord d'hydrolyser la caséine κ présente dans le lait et a aussi une action protéolytique lors de l'affinage du fromage. La présure demeure encore aujourd'hui l'agent de

coagulation de choix et le standard pour l'évaluation des autres enzymes potentielles (Kosikowski et Mistry, 1997).

Dans la fabrication de fromage, lorsque le pH d'emprésurage est atteint suite à l'action des ferments lactiques, la présure est ajoutée, généralement à une concentration de 198 mL/1000 kg (pour une présure diluée 1 : 15 000). On laisse l'agitation pendant environ 2 minutes pour permettre à la présure d'être distribuée assez uniformément dans le lait, puis on enlève les pales agitatrices du bassin et on laisse reposer. Après une dizaine de minutes, un test de temps de prise est fait afin de s'assurer que la coagulation est en cours. Ce temps de prise correspond au temps séparant l'addition d'enzymes coagulantes et le début de la floculation. Ce test peut être réalisé de différentes façons par méthode visuelle, physique ou chimique. À titre d'exemple, la coagulation du lait peut être suivie par l'évolution de la teneur en calcium soluble. En effet, l'acidification emmène le phosphate de calcium micellaire à passer dans la phase aqueuse, ce qui crée une relation inversement proportionnelle entre le pH et la teneur en calcium soluble. Industriellement, la méthode visuelle caractérisée par l'observation de petits grains restés sur un objet ou un doigt plongé dans le mélange est la plus souvent utilisée. Le coagulum est alors laissé à incuber pour une période égale à environ 2 fois le temps de prise pour les pâtes pressées et 3 fois le temps de prise pour les pâtes molles. Cet intervalle correspond au temps de coagulation.

Pour la production du coagulum, la température est un facteur d'importance, puisqu'à une température inférieure à 10°C ou supérieure à 65°C, la coagulation ne se fait pas. Dans le cas du cheddar, la température doit varier entre 28 et 32°C, ce qui permet d'accélérer la formation du coagulum et d'augmenter la fermeté du fromage. Le temps de coagulation du lait est inversement proportionnel à la quantité d'enzyme qui lui est ajoutée.

Étape 4 : L'égouttage du coagulum

Cette étape permet de séparer le lactosérum et le coagulum. En fait, le lactosérum est principalement composé d'eau, de protéines (surtout β -lactoglobuline et α -lactalbumine), de glucides (dont le lactose), de vitamines et de minéraux.

L'égouttage du lactosérum se produit lors de toutes les étapes subséquentes de la fabrication. Tout d'abord, c'est l'étape du soutirage où la plus grande proportion du lactosérum est retirée. Cependant, comme le coagulum présure est peu perméable, le lactosérum s'écoule lentement et de façon limitée. Différentes techniques sont appliquées pour permettre une meilleure exsudation, soit le découpage du coagulum (décaillage) et un brassage (lorsque le coagulum a atteint un pH d'environ 6,5). Dans le cas du fromage cheddar, le coagulum est coupé verticalement et horizontalement, à raison de grains d'environ 1 cm³ à l'aide de longs couteaux de cordes métalliques sur un support. Le coagulum peut être découpé à différents degrés de fermeté. Cependant, plus les grains sont découpés dans un coagulum mou, plus le fromage obtenu aura une pâte dure et vice versa, puisque des grains durs ne permettront pas l'exsudation d'autant de lactosérum que les grains mous.

Les grains de coagulum en suspension dans le lactosérum sont brassés à vitesse moyenne jusqu'à l'obtention du pH attendu d'environ 6,1. Le pH a une grande influence au moment du soutirage, puisqu'il influence le degré de minéralisation du coagulum, le pouvoir tampon de la pâte fromagère et son pH final, de même que la rétention du sel. En fait, dans le cas du cheddar, il faudra un pH de 6,1 à 6,2 à l'étape du soutirage, afin que le pH en fin de fabrication corresponde au pH visé de 5,1-5,2 (Kosikowski et Mistry, 1997). Pendant ce temps, c'est également l'étape de cuisson.

Étape 5 : La cuisson et le soutirage

Afin de retirer un maximum de lactosérum, le caillé est cuit à une température maximale de 40°C. La température doit s'élever jusqu'à 38°C pendant 30 minutes

avec légère agitation, puis les grains de caillé sont cuits à cette température pour 45 minutes supplémentaires avec agitation plus vigoureuse. Le lactosérum est exsudé durant l'élévation de la température, ce qui permet de cuire les grains dans le liquide (Kosikowski et Mistry, 1997).

L'égouttage se passe souvent dans un tamis fin pendant 25 minutes ou alors, par retrait du lactosérum d'un bassin de fabrication, alors que le coagulum est retenu par une passoire. Suite au retrait du lactosérum, la pâte fromagère est alors appelée le caillé.

Il existe différents types de caillé, soit le caillé acide, le caillé présure et le caillé mixte. Le caillé retrouvé dans la fabrication du fromage cheddar peut être un caillé présure ou un caillé mixte. Dans notre cas, il s'agira d'un caillé mixte, puisque la coagulation a été créée par l'ajout de ferments lactiques et de présure.

Étape 6 : La cheddarisation

Sous l'effet de la pression, de l'acidité et de la température, les grains de caillé ont tendance à se souder pour créer des blocs, présentant une texture caractéristique caoutchouteuse et lustrée. Quand ces blocs sont recouverts d'environ 2,5 cm de lactosérum, la matrice fromagère peut être coupée en longues tranches (~ 66 × 13 × 10 cm). Ces tranches de caillé sont laissées dans un bassin à 38°C pour un temps de repos de 15 minutes les unes à côté des autres, retournées aux 15 minutes, puis empilées, afin de permettre la libération du maximum de lactosérum qui est récolté au fur et à mesure. La période de cheddarisation se termine lorsque le lactosérum recueilli de cette façon atteint un pH d'environ 5,2 à 5,3 et que les tranches de caillé sont passées d'une épaisseur de 10 à 5 cm. Suite à cette étape, les tranches de caillé sont coupées en petits grains par des moulins industriels (Kosikowski et Mistry, 1997).

Étape 7 : Le salage

Cette étape est essentielle lors de la fabrication de fromage, afin de permettre une nouvelle expulsion de lactosérum, le bon déroulement de l'affinage, de minimiser les risques de contamination et de détérioration, de participer à la formation de la croûte, ainsi que d'amener le goût caractéristique.

Le salage peut se faire à sec ou par la saumure. Dans notre cas, il s'agira de salage à sec qui se pratique bien sur des fromages à pâte ferme. Cette étape peut également être réalisée après le pressage. Les grains de caillé sont saupoudrés de sel à la main, à raison de 2,3 à 3,5 kg par 100 kg de caillé (Kosikowski et Mistry, 1997). Le sel pénètre lentement dans les grains de caillé; l'ajout du sel est donc divisé en 3 étapes pour traiter avec tout le volume requis. Puisque les grains présentent une grande surface de contact, la durée du salage est écourtée. La quantité de sel et l'uniformité du salage doivent cependant être contrôlés, afin d'obtenir une production uniforme à chaque fois.

Étape 8 : Le moulage et le pressage

Les grains de caillé sont ensuite déposés dans des moules puis soumis à des pressions, ce qui a pour but de donner la forme définitive au fromage, d'assurer la soudure des grains de caillé et d'éliminer les dernières fractions de lactosérum. Le volume de caillé déposé dans chaque moule doit être calculé, afin d'obtenir la texture finale souhaitée. Dans le cas du cheddar, le pressage a lieu durant quelques heures, à raison de 1,5 à 2,0 kg/cm². Cette étape peut également s'étaler pour toute la nuit à une pression variant entre 172 et 344 kPa. Cette étape n'a évidemment pas lieu dans la production de fromage cheddar en grains.

Étape 9 : L'affinage

Au cours de cette étape, le caillé au goût acidulé (dû à la fermentation lactique) mature et acquiert des caractères nouveaux au niveau de la présentation, de la texture et de l'arôme. Il s'agit en fait d'une étape de digestion enzymatique de certains constituants du caillé qui se fait chez la plupart des fromages, sauf les fromages frais. Le fromage cheddar frais ne subira donc pas cette étape, mais le cheddar affiné doit passer par cette étape qui, pour ce type de fromage, dure de 1 à 12 mois sous des conditions de 2 à 10°C et une humidité relative de 87 à 95%.

Le fromage cheddar subira un type d'affinage appelé affinage dans la masse, se caractérisant par l'action enzymatique de la flore microbienne déjà présente, des enzymes naturelles du lait et des enzymes coagulantes utilisées. C'est au cours de cette période que les fromages subissent divers traitements comme le retournement, le lavage, le frottage et l'enrobage, qui ont pour but d'assurer l'uniformité dans les productions. Les grands phénomènes biochimiques qui prennent place durant l'affinage sont la fermentation du lactose (où le lactose est transformé en acide lactique, acide acétique, éthanol et CO₂, puis jusqu'en acides organiques), la protéolyse (où les caséines sont transformées en acides aminés, puis jusqu'en amines, acides organiques et composés soufrés) et la lipolyse (où la matière grasse est transformée en acides gras, puis jusqu'en cétones, lactones et alcools secondaires). Il est à noter que les principaux composés impliqués dans la flaveur du fromage cheddar (sensations olfactives et gustatives) sont l'acide lactique, l'acide acétique, les acides aminés soufrés, les acides gras à courte chaîne et l'ammoniac.

L'action des enzymes utilisées lors de ces réactions, tels plasmine, lipases, chymosine et peptidases, est entièrement dépendante de plusieurs paramètres durant l'affinage, soit la température, le pH, l'activité de l'eau, l'aération et la composition de l'atmosphère. La fermentation du lactose et la lipolyse sont très importantes pour le développement des saveurs, grâce aux acides et métabolites produits, et la

protéolyse est très importante pour la saveur, mais primordiale du point de vue textural, considérant entre autres l'hydrolyse des caséines qui est à l'origine de l'assouplissement de la pâte fromagère.

9.4 Analyses fromagères

Plusieurs caractéristiques doivent donc être vérifiées au cours de l'affinage, afin de suivre l'évolution du fromage. Entre autres, des tests de pourcentages d'azote dissous, de matières grasses, de glucides et acides organiques, de sel, d'humidité et des tests de texture sont souvent réalisés afin de vérifier la qualité des fromages produits. La façon appropriée de vérifier le taux de sel dans le fromage est de comparer le taux de sel/humidité, puisque le sel se dissout dans l'eau présente entre les amas de caséines de la pâte fromagère, soit dans l'humidité du fromage. Le taux de sel est d'ailleurs un point important à surveiller lors de production fromagère, considérant qu'il s'agit du facteur majeur influençant la croissance microbienne et les qualités organoleptiques (Cogan et Beresford, 2002).

Le pH du fromage est également un facteur d'importance à surveiller pour les qualités recherchées au goût. Le pH final du caillé dépend largement de sa capacité tampon, qui elle-même dépend de son humidité. Des fromages à l'humidité élevée possèdent généralement une capacité tampon faible et donc, un pH plus bas. La capacité tampon des fromages est probablement influencée principalement par les sels solubles qu'on y retrouve, entre autres le phosphate et le citrate (Cogan et Beresford, 2002).

10. Projet

10.1. Problématique

Un des problèmes qui peut être retrouvé lors de l'ajout de probiotiques à une matrice alimentaire est le faible taux de viabilité de la flore bactérienne au cours de

la fabrication ou de l'entreposage de l'aliment. Dans le cadre de notre recherche, l'aliment à l'étude est le fromage cheddar frais. Certaines équipes de recherche ont démontré que les probiotiques ne résistent pas bien aux périodes de conservation du produit, dû à l'action des ferments lactiques, la salinité, l'acidité et la présence d'oxygène dans le fromage. Ceci variait selon les souches. Une compagnie qui se contenterait d'une allégation santé non reliée à la souche (CFIA, 2009) n'aurait qu'à sélectionner une souche qui est stable dans les conditions particulières de fabrication et d'entreposage du fromage qu'elle produit. Toutefois, une entreprise qui désire utiliser une souche précise, en raison de la disponibilité de données cliniques envers un effet santé défini, pourrait être confrontée à des pertes de viabilité. Dans ce cas, des adaptations technologiques visant à rectifier le problème doivent être explorées.

De plus, le procédé de fabrication du fromage fait en sorte que les bactéries inoculées ne se retrouvent pas entièrement dans le fromage. En fait, une fraction non négligeable des bactéries est perdue dans le lactosérum tout au long de la fabrication. Il faut donc trouver les conditions qui font en sorte qu'une proportion élevée des probiotiques inoculés soit retenue dans la matrice fromagère.

Quatre avenues technologiques ont été explorées au cours de cette étude pour accroître la rétention et la stabilité des probiotiques dans le cheddar : l'encapsulation, le moment d'inoculation, le taux d'inoculation et le pressage combiné à un emballage sous vide.

Bien que les enzymes microencapsulées soient parfois perdues dans le lactosérum en proportion non négligeable (16%) lors de la fabrication de fromage (Braun et Olson, 1986), cette technologie accroît néanmoins de façon importante la rétention des enzymes de maturation accélérée dans le fromage (Kailasapathy *et al.*, 2006). Ceci laisse croire que la microencapsulation pourrait accroître la rétention des bactéries dans le caillé, mais aucune donnée n'est disponible pour les probiotiques. De plus, la microencapsulation présente un deuxième avantage qui pourrait être très

important dans le milieu industriel. Elle pourrait aider à créer une barrière pour protéger les microorganismes anaérobies stricts de l'oxygène lorsqu'ils sont introduits dans des aliments gardés en atmosphère ambiante. La problématique de l'ajout de bactéries anaérobies strictes aux aliments pourrait se présenter éventuellement, puisque de nos jours, les études cliniques sont menées dans le but de dénicher les souches présentant le plus d'avantages sur la santé. Les producteurs d'aliments nutraceutiques se fient à ces recherches pour développer leurs produits (Champagne et Kailasapathy, 2008). Il est très probable que l'on découvre des facultés probiotiques importantes chez certaines souches bactériennes anaérobies strictes. La méthode de microencapsulation que nous aurons développée pourrait alors être utilisée, afin de permettre une meilleure survie des bactéries pour leur utilisation en production alimentaire.

Deuxièmement, une autre avenue à considérer lors de l'ajout de probiotiques à du fromage est le moment d'addition. En effet, ce facteur peut avoir une influence sur la survie des probiotiques en réduisant par exemple leur contact avec l'acidité du milieu ou l'oxygène introduit dans le lait lors du brassage. De plus, le moment d'addition pourrait avoir une influence sur la rétention des probiotiques dans la matrice fromagère, puisque les bactéries inoculées ont tendance à être perdues dans le lactosérum tout au long de la fabrication du fromage. Inoculer les probiotiques après l'étape du soutirage pourrait donc être bénéfique pour améliorer la rétention.

Troisièmement, la densité bactérienne affecte la survie des probiotiques lors de la lyophilisation (Kilara *et al.*, 1976). On ne sait toutefois pas si la densité inoculée lors de la fabrication fromagère affecte la stabilité subséquente des cultures lors de l'entreposage.

Finalement, le cheddar peut être mis en marché sous forme de grains placés dans des sacs ou en bloc pressé et emballé sous vide. Aucune donnée comparative n'est disponible sur la différence entre ces deux méthodes de fabrication et d'emballage en lien avec la viabilité des probiotiques.

10.2. Hypothèses

Nous posons les hypothèses suivantes :

- 1- Les probiotiques varient quant à leur sensibilité à l'oxygène et il sera possible de trouver une culture affectée par l'oxygène lors de la fabrication de fromage.
- 2- L'ajout de ferments et le salage affecteront la viabilité des probiotiques.
- 3- L'inoculation de cellules libres lors de la cheddarisation ou du salage accroîtra la rétention des probiotiques dans le fromage en comparaison à une inoculation dans le lait avant l'emprésurage.
- 4- L'encapsulation augmentera la rétention et la stabilité des probiotiques dans le fromage.
- 5- Pour une culture probiotique sensible à l'oxygène, l'inoculation lors de la cheddarisation ou du salage augmentera la survie lors de la fabrication du fromage.
- 6- Le pressage et l'emballage sous vide augmenteront la stabilité d'une culture probiotique sensible à l'oxygène lors de l'entreposage du fromage.
- 7- Une augmentation du taux d'inoculation augmentera la stabilité des probiotiques lors de l'entreposage.
- 8- L'ajout de cultures probiotiques, et particulièrement celles qui sont encapsulées, pourrait affecter les propriétés physico-chimiques et sensorielles du fromage.
- 9- La procédure de fabrication en laboratoire (mini-fromagerie en 2 L) permet de prédire les résultats à l'échelle 200 L.

10.3. Objectifs du projet

- 1- Développer un protocole pour fabrication de fromage en miniature pour les essais préliminaires.
- 2- Développer une méthode pour déterminer, parmi des souches de probiotiques sélectionnées, la souche la plus sensible à l'oxygène. Pour ce faire, il faudra réaliser des fabrications de fromage sans ferments ni sel, afin d'associer une

mortalité éventuelle à la seule cause de l'oxygène. Il faudra également que la fabrication et l'entreposage du fromage se passent en environnement réduit en oxygène, afin de comparer les viabilités obtenues pour le probiotique dans des matrices fromagères produites en aérobie et en microaérobie.

- 3- Mesurer la résistance de la souche sélectionnée lors de fabrication fromagère, afin de s'assurer qu'elle résiste bien à la compétitivité avec les ferments lactiques et qu'elle résiste à l'acidité et au sel.
- 4- Tester une technique de microencapsulation destinée à protéger les cellules de l'oxygène, ce qui devrait permettre une meilleure viabilité dans le fromage au cours de la fabrication et de l'entreposage.
- 5- Produire en grande quantité un lyophilisat de la souche bactérienne choisie, sous forme libre et sous forme encapsulée.
- 6- Essais de fabrications fromagères en usine en comparant la survie de la souche bactérienne sous forme libre et encapsulée et ajoutée à différents moments lors de la fabrication, soit dans le lait de départ, à la cheddarisation et au salage.
- 7- Prélèvements à différents moments au cours de l'entreposage du fromage et tests sensoriels et biochimiques, afin de déterminer les différences entre les fromages inoculés aux bactéries libres ou encapsulées et selon le moment d'addition.
- 8- Vérifier l'effet de l'inoculation sur la rétention et la viabilité du probiotique.
- 9- Évaluer l'effet du pressage et de l'emballage sous vide sur la viabilité du probiotique.

10.4. Moyens pour atteindre les objectifs

Dans cette étude, nous nous proposons d'étudier des stratégies technologiques qui pourraient permettre d'améliorer la viabilité des probiotiques dans le fromage cheddar et augmenter le taux de bactéries qui coloniseront l'intestin lors de l'ingestion du produit. Nous voulions développer une technique qui permettrait d'augmenter l'efficacité des technologies disponibles à ce jour et serait simple et applicable pour l'industrie alimentaire.

Il fallait tout d'abord procéder à des tests préliminaires de fabrication de fromage en miniature, afin de vérifier les procédés et les hypothèses dans des conditions plus simples et moins dispendieuses. Une méthode a été développée selon le protocole de Morin, Pouliot et Britten (2008). Une souche probiotique a été sélectionnée suite à la démonstration de sa sensibilité dans les conditions fromagères, soit *Bifidobacterium longum* 15708. Cette souche bactérienne a donc été lyophilisée pour utilisation dans les autres essais de fabrication de fromage, afin de recréer le plus possible les conditions retrouvées en industrie alimentaire. Le protocole de lyophilisation utilisé a été tiré d'un protocole déjà développé pour la lyophilisation de bactéries lactiques (Champagne *et al.*, 1992). Tous les calculs qui ont permis de mesurer la viabilité et rétention de la souche probiotique au cours des différentes étapes de fabrication de fromage, de même que la résistance de la souche à ces conditions ont été faits à partir de dénombrements sur milieu gélosé sélectif, dont les détails sont présentés au chapitre suivant.

Pour l'atteinte des objectifs de l'étude, quatre technologies ont été testées. D'abord, une technique de microencapsulation par spray-coating avec un polymère de gras a été développée selon le protocole de Durand et Panes (2003). Cette stratégie avait pour but de démontrer qu'une souche probiotique sensible microencapsulée pouvait présenter une meilleure viabilité lors de l'ajout dans le fromage cheddar frais que des cellules libres. Il était également attendu que la microencapsulation des probiotiques permettrait d'obtenir une meilleure rétention dans la matrice fromagère, ce qui a été testé en réalisant des calculs selon les volumes et les concentrations bactériennes retrouvés pour les différents produits et étapes de la fabrication fromagère.

De plus, trois moments d'addition ont été testés pour l'ajout des probiotiques au cours de la fabrication de fromage : dans le lait peu après l'ajout des ferments, sur le caillé juste avant la cheddarisation et sur les grains juste après le salage. Pour ce faire, différentes fabrications fromagères ont dû être faites afin de modifier le moment d'addition des probiotiques et tester les viabilités obtenues pour chaque

moment d'addition testé. Le taux d'inoculation a également été testé de la même manière, soit en procédant à plusieurs fabrications fromagères et en comparant les concentrations de bactéries viables retrouvées pour chaque taux testé.

La dernière stratégie technologique testée a été de comparer les méthodes d'entreposage des fromages pour déterminer la procédure la plus avantageuse pour permettre une meilleure survie des probiotiques. Les fromages ont donc été entreposés sous forme de bloc pressé dans un emballage sous vide et sous forme de grains dans des sacs scellés sous atmosphère ambiante. Dans le but de comparer ces 2 techniques de conservation sur la survie des probiotiques, le produit final de chaque fabrication de fromage a toujours été séparé en deux pour entreposer le fromage des deux façons et les dénombrements sur milieux gélosés ont également été faits sur les deux conditions.

Des tests préliminaires ont également été faits pour dénicher un milieu de culture gélosé qui permettrait la croissance de la souche probiotique sélectionnée et inhiberait les ferments lactiques et autres microorganismes retrouvés dans le fromage. Les résultats de ces essais sont disponibles au chapitre 2.

Chapitre 2

Mise au point des méthodes
de dénombrement
des cultures bactériennes

1. Choix d'un milieu sélectif aux bifidobactéries

1.1 Essai de croissance

Afin de différencier les ferments des bifidobactéries lors de fabrications fromagères, il était de première importance de trouver un milieu sélectif, puisqu'il s'agit d'une façon simple et économique de faire des décomptes bactériens. Différents milieux réputés pour inhiber les ferments lactiques, mais néanmoins permettre la croissance de *Bifidobacterium longum* ont été testés (Tableau 1).

Tout d'abord, des milieux gélosés ont été sélectionnés après des recherches dans la littérature scientifique, selon la probabilité qu'ils permettent la croissance de bifidobactéries, mais inhibent celles de bactéries lactiques. Ces milieux ont été reproduits au laboratoire et un essai de sélectivité a été fait. En fait, il s'agissait de la première étape de l'essai, soit de vérifier si des cultures liquides des ferments lactiques (les mêmes ferments que ceux utilisés pour les fabrications fromagères) et de *Bifidobacterium longum* 15708 poussaient sur les géloses sélectionnées. Des précultures de ferments lactiques en milieu de lait en poudre 12% (P/V) et de *B. longum* 15708 en bouillon MRS ont été faites et dénombrées sur chacun des milieux.

Les résultats montrent que plusieurs conditions (température d'incubation, composition du milieu) permettaient la croissance sélective ou différentielle sur gélose des ferments lactiques et de *B. longum* lorsqu'ils sont sous forme de précultures (Tableau 1). En général, les comportements étaient en lien avec les résultats attendus selon la revue de littérature, mais certains étaient atypiques. Il y a un grand effet de souche dans le comportement des bactéries lactiques sur milieux différentiels et sélectifs (Darukaradhya *et al.*, 2006; Dave et Shah, 1996). Ces résultats montrent le bien-fondé des essais préliminaires destinés à déterminer les conditions appropriées pour nos propres cultures.

Tableau 1: Milieux testés et résultats obtenus pour l'essai sur la croissance de *B. longum* 15708 et de ferments lactiques

Milieux	Incubation en anaérobiose		Hypothèses (croissance)		Résultats (croissance)		Source
	Température	Temps	Ferments	<i>B. longum</i>	Ferments	<i>B. longum</i>	
MRS pH 5,2	37°C	48 h	-	-	Non	Oui	-
MRS pH 5,2	45°C	48 h	-	-	Oui	Non	-
MRS pH non ajusté	42°C	48 h	-	-	Oui	Oui	-
MRS-Ox-Bile 0,3%	37°C	48 h	Non	Oui	Non	Oui (colonies très petites)	Bibiloni <i>et al.</i> , 2001
MRS-Ox-Bile 0,2%	37°C	48 h	Non	Oui	Non	Oui	
MRS-Ox-Bile 0,1%	37°C	48 h	Non	Oui	Non	Oui	
MRS-X-Gal	37°C	48 h	Oui (blanches)	Oui (bleues)	Oui (blanches)	Oui (blanches)	Harbec, 2010; Ibrahim et O'Sullivan, 2000.
Rogosa	37°C	72 h	Non	Oui	Oui	Oui	Rogosa <i>et al.</i> , 1951
Milieu LP	40°C	48 h	Non	Oui	Non	Oui	Lapierre, <i>et al.</i> , 1992
RAF pH non ajusté	37°C	48 h	Non	Oui	Non	Oui	Roy <i>et al.</i> , 1997
RAF 5,1	37°C	48 h	Non	Oui	Non	Oui	

1.2 Essai de sélectivité en bouillon

Une autre série d'essais a été réalisée afin de tester la sélectivité des milieux qui ont donné les résultats attendus lors des tests de croissance sur gélose. Pour ce faire, des précultures de ferments lactiques et de *B. longum* 15708 ont été préparées comme dans l'essai précédent. Les cultures ont été mélangées à un taux de 50/50 (V/V) et étalées sur les milieux. Les milieux sélectionnés pour cet essai étaient :

- MRS pH 5,2 incubé en anaérobiose à 37°C
- MRS-Ox-Bile 0,2% incubé en anaérobiose à 37°C
- MRS-Ox-Bile 0,1% incubé en anaérobiose à 37°C
- LP incubé en anaérobiose à 40°C (aussi essayé en anaérobiose à 37°C)
- RAF pH non ajusté incubé en anaérobiose à 37°C
- RAF pH 5,1 incubé en anaérobiose à 37°C

Le but de cet essai était de pouvoir retrouver un compte bactérien de *B. longum* équivalent à la culture pure, ce qui signifierait que les ferments lactiques ont bien été inhibés et que leur présence n'a pas nui à la croissance de *B. longum* sur le milieu. De plus, ces essais permettent de vérifier si la présence de bactéries qui ne

gènèrent pas de colonies affecte néanmoins le nombre de colonies de la culture qui s'y développe.

Tableau 2: Milieux testés et résultats obtenus pour l'essai de sélectivité en bouillon d'un mélange de *B. longum* 15708 et de ferments lactiques

Microorga- nisme	Milieux à tester	Incubation		Résultats (log UFC/mL)	Commentaires
		Condition	Température		
Ferments	M17	Aérobie	30°C	8,6	-
	MRS-Ox-Bile 0,1%		37°C	<1	-
	MRS-Ox-Bile 0,2%		37°C	<1	-
	MRS pH 5,2		37°C	<1	Tapis de minuscules colonies
	Milieu LP		40°C	<1	-
	Milieu LP		37°C	<1	-
	RAF pH non ajusté		37°C	2,9	Colonies très petites
	RAF pH 5,1		37°C	<1	-
<i>B. longum</i> 15708	MRS	Anaérobie	37°C	9,3	-
Mélange de ferments et <i>B.</i> <i>longum</i> 15708	MRS-Ox-Bile 0,1%		37°C	8,9	Colonies petites
	MRS-Ox-Bile 0,2%		37°C	~8,0	Beaucoup de petites colonies blanches
	MRS pH 5,2		37°C	9,0	Colonies petites
	Milieu LP		40°C	9,0	-
	Milieu LP		37°C	9,0	-
	RAF pH non ajusté		37°C	9,0	-
	RAF pH 5,1		37°C	9,0	-

Les résultats de ces essais révèlent que :

- Les milieux permettent généralement de bons comptes de *B. longum* 15708, mais les colonies ne sont pas bien définies sur tous les milieux. Ceci rend les décomptes plus fastidieux et moins précis, et nous a incités à éliminer les milieux à la bile et MRS pH 5,2.
- Les décomptes sur milieu LP révèlent que les concentrations de *B. longum* 15708 retrouvées à incubation de 40°C et 37°C ne sont pas statistiquement différentes ($P \geq 0,05$). Ce milieu sera dorénavant incubé à 37°C, dans l'incubateur anaérobie.

- Le milieu RAF a permis la croissance de colonies de ferments lorsque le pH n'était pas ajusté; le milieu n'est donc sélectif pour les bifidobactéries qu'à pH 5,1.
- Les milieux LP et RAF 5,1 sont très efficaces pour la sélection de *B. longum* 15708, puisque les concentrations bactériennes obtenues sont presque égales au témoin sur milieu MRS.

1.3 Essai de sélectivité lors de fabrication en mini-fromagerie

Un nouvel essai a été fait pour déterminer si les milieux RAF à pH 5,1 et LP sont toujours sélectifs lors de décomptes bactériens dans le cadre d'une fabrication fromagère. Pour ce faire, 2 fabrications en mini-fromagerie ont été faites, avec ajout de *B. longum* 15708 dans le lait au départ (inoculation à 1%) et juste avant la cheddarisation (inoculation à 10%) (se référer au protocole décrit au chapitre 3 pour plus de détails).

Les décomptes sur Pétris ont été réalisés sur milieu M17 incubé en aérobie à 30°C, puisque ce milieu permet la croissance des ferments lactiques, mais pas celle de *B. longum* 15708, sur LP incubé en anaérobie à 37°C et sur RAF 5,1 incubé en anaérobie à 37°C. Les décomptes sur LP et RAF pourront ainsi être comparés.

Une gélose de compte total, PCA (plate count agar) a également été utilisée pour avoir un aperçu de la concentration bactérienne totale dans le lait au départ, avant l'inoculation avec les ferments.

Tableau 3: Décomptes obtenus sur les différents milieux pour les essais de fabrication en mini-fromagerie

Échantillon	Milieu testé	Moyenne des UFC pour l'échantillon (log UFC/g ou log UFC/mL)	
		Essai pour ajout de <i>B. longum</i> dans le lait	Essai pour ajout de <i>B. longum</i> avant la cheddarisation
Inoculum des ferments	M17	8,6	8,6
Lait au départ	PCA	3,1	3,0
	LP	1,5	1,3
	RAF 5,1	<1,0	1,8
Lait avant la coagulation	M17	7,2	7,2
	LP	6,6	<5,0
	RAF 5,1	6,9	<5,0
Coagulum	M17	7,6	7,6
	LP	6,9	<5,0
	RAF 5,1	6,9	<5,0
Lactosérum	M17	7,4	7,5
	LP	6,3	7,5
	RAF 5,1	6,5	7,4
Caillé non salé	M17	8,2	-
	LP	7,5	-
	RAF 5,1	7,3	-
Caillé salé	M17	8,3	7,5
	LP	7,3	7,3
	RAF 5,1	7,5	7,5
Caillé jour 1	M17	8,0	7,8
	LP	6,5	6,6
	RAF 5,1	5,7	6,9
Caillé jour 3	M17	7,8	7,4
	LP	4,9	5,1
	RAF 5,1	5,0	6,0
Caillé jour 7	M17	7,8	7,6
	LP	5,0	4,7
	RAF 5,1	4,7	4,8
Caillé jour 14	M17	7,1	6,7
	LP	4,6	<3,0
	RAF 5,1	4,4	3,9
Caillé jour 21	M17	6,9	6,6
	LP	4,5	2,7
	RAF 5,1	4,3	3,4

Une coloration de Gram et l'observation microscopique ont également été faites, afin de s'assurer que les colonies retrouvées sur les milieux ont bien la morphologie de bifidobactéries. Les pourcentages présentés dans le tableau 3 ont été tirés des moyennes en pourcentages des colonies dont la coloration de Gram et la morphologie concordent avec les résultats attendus pour des bifidobactéries. Pour chaque milieu dont la dilution permettait de retrouver entre 20 et 200 colonies, un total de 10 colonies étaient testées en choisissant tous les types de colonies retrouvés sur le milieu. Un ratio a donc pu être fait en considérant les colonies dont la morphologie était typique au microscope et la quantité dénombrée sur Pétri.

Tableau 4: Observations microscopiques des colonies sur milieux LP et RAF après 7 jours d'entreposage

Échantillon	Milieu testé	Dilution testée	Apparence des colonies	Pourcentage retrouvé dans l'échantillon	Pourcentage probable de <i>Bifidobacterium</i> dans l'échantillon
Fromage avec ajout dans le lait	LP	10 ⁻⁴	Coccobacilles Gram + en palissades	75%	91%
			Bacilles Gram + en palissades	6%	
			Coques Gram + miniatures	13%	
			Coques Gram + en chaînes et seules	6%	
	10 ⁻⁵	Coccobacilles Gram + en palissades	50%	50%	
		Bacilles Gram + en palissades	50%		
	RAF 5,1	10 ⁻⁴	Coccobacilles Gram + en palissades	70%	80%
			Coccobacilles Gram + en chaînes courtes	10%	
Coques Gram + miniatures			20%		
Fromage avec ajout à la cheddarisation	LP	10 ⁻⁴	Coccobacilles Gram + en palissades	70%	80%
			Coccobacilles Gram + en chaînes et en grappes	10%	
			Coques Gram + miniatures	10%	
			Coques Gram + en grappes	10%	
	RAF 5,1	10 ⁻⁴	Bacilles Gram + en palissades	66%	58%
			Coques Gram + miniatures	33%	
		10 ⁻⁵	Coccobacilles Gram + en chaînes courtes	50%	
			Coques Gram + miniatures	50%	

En conclusion, on observe des dénombrements très semblables pour les milieux LP et RAF 5,1. Les tests de Gram et l'observation microscopique ont permis d'observer que sur les 2 milieux, il y a possibilité de croissance de quelques contaminants (coques Gram +). Cependant, les contaminants ne réussissent pas à pousser rapidement sur les géloses, ni en grand nombre, et sont plutôt faciles à reconnaître en comparaison avec les colonies de *Bifidobacterium* (elles sont beaucoup plus petites et plus rondes). Le milieu RAF semble permettre une croissance plus rapide et plus importante des contaminants. De plus, les colonies de bifidobactéries sont plus grosses et mieux définies sur le milieu LP. De ce fait, le milieu LP semble plus approprié pour utilisation lors des essais subséquents.

1.4 Essai de sélectivité lors de fabrication fromagère

Lors des premiers essais de fabrication de fromage en usine pilote, des décomptes sur milieu LP ont été faits à partir des fromages témoins, c'est-à-dire non inoculés aux probiotiques, afin de démontrer la sélectivité de ce milieu pour la culture des bifidobactéries.

Lors des analyses préliminaires, il avait été conclu que le milieu LP ne présentait pas une efficacité de 100%, puisque certaines colonies retrouvées lors de la fabrication de fromage en mini-fromagerie réussissaient à pousser. Le milieu a quand même été choisi, puisque les décomptes de ces contaminants ne modifiaient pas les hauts comptes bactériens obtenus pour les bifidobactéries. Les nouveaux tests de décomptes réalisés ont su reproduire ces résultats préalablement obtenus. En effet, au jour de la production, le fromage témoin final présentait des concentrations d'environ 581 UFC/g, ce qui est négligeable en considérant les valeurs obtenues pour les fromages inoculés de probiotiques qui présentaient des concentrations d'environ 1×10^6 UFC/g. Le milieu LP sera donc utilisé pour les décomptes de *B. longum* 15708 dans les fabrications fromagères, sans craindre que les résultats ne soient faussés.

2. Résultats de la recherche

Les différents protocoles et résultats obtenus pour l'atteinte de chacun des objectifs de la recherche sont décrits dans les chapitres 3 et 4, soit les deux articles qui ont été rédigés pour publication. Le chapitre 3 traite des essais de fabrication de fromage en miniature pour déterminer le choix de la souche probiotique et explorer des effets du taux d'inoculation ainsi que de deux moments d'inoculation. Cette étude visait à établir certaines conditions pour les essais subséquents en fromagerie de format industriel. Cet article a été publié dans la revue *International Dairy Journal* en février 2011 (Fortin *et al.*, 2011a).

Le chapitre 4 traite des résultats obtenus lors de la fabrication fromagère avec la souche probiotique *B. longum* 15708 ajoutée dans le fromage sous forme libre et encapsulée à trois différents moments durant la production. Cet article a été publié dans la revue *Dairy Science & Technology* en août 2011 (Fortin *et al.*, 2011b).

Chapitre 3

Article 1

Effect of Time of Inoculation, Starter Addition, Oxygen Level and Salting on the Viability of Probiotic Cultures during Cheddar Cheese Production

Marie-Hélène Fortin^{1,2}, Claude P. Champagne^{1*}, Daniel St-Gelais¹,
Michel Britten¹, Patrick Fustier¹, Monique Lacroix²

¹ Food Research and Development Center, Agriculture and Agri-Food Canada,
3600 boul. Casavant Ouest, St. Hyacinthe Qc, Canada, J2S 8E2

² Research Laboratories in Sciences Applied to Food, INRS-Institut Armand-
Frappier, 531, boulevard des Prairies, Laval (Qc), Canada H7V 1B7

*Corresponding author : claudc.champagne@agr.gc.ca

Tel : 450-768-3238 Fax : 450-773-8461

Key words: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, inoculation, starter, recovery in curds

Short title: Probiotic bacteria in Cheddar

Référence:

Fortin, M.-H., Champagne, C. P., St-Gelais, D., Britten, M., Fustier, P., Lacroix, M.
2011. Effect of Time of Inoculation, Starter Addition, Oxygen Level and Salting on
the Viability of Probiotic Cultures during Cheddar Cheese Production. *International
Dairy Journal* 21. p.75-82.

1. Contribution des auteurs

J'ai développé certains des protocoles avec l'aide d'assistants de recherche, j'ai réalisé les expérimentations, compilé et analysé les résultats, préparé les tableaux de présentation des résultats, effectué certaines analyses statistiques, effectué une revue de littérature et rédigé l'article scientifique en anglais. Dr Champagne est mon codirecteur de recherches. Il a participé à l'élaboration du projet, au développement des hypothèses et des protocoles grâce à son expertise sur l'ajout de bactéries probiotiques et de ferments lactiques dans les aliments et a participé activement à la rédaction de l'article et l'analyse des résultats. Dr St-Gelais a contribué au développement des protocoles et à l'analyse des résultats grâce à son expertise en fromagerie et a participé activement aux discussions concernant le projet et à la correction de l'article. Dr Britten est coordonnateur du projet à Agriculture et Agroalimentaire Canada et a participé aux discussions concernant le projet, à la correction de l'article et à l'élaboration des protocoles par son expertise dans le domaine de la transformation laitière. Dr Fustier est membre de l'équipe et a contribué au projet en participant aux discussions et en corrigeant l'article. Dr Lacroix est ma directrice de recherche et la coordonnatrice du projet. Elle a supervisé l'élaboration des protocoles et les discussions scientifiques entourant ce projet et elle a révisé le manuscrit.

2. Résumés

2.1 Résumé en français

L'effet de l'apport en oxygène, du moment d'inoculation des probiotiques, de l'ajout des ferments et du salage a été étudié sur la viabilité de cinq souches de bactéries probiotiques dans le lactosérum et le caillé obtenus lors de simulation de fabrication de fromage cheddar. Les souches de probiotiques testées croissaient durant la fermentation et une souche (*Bifidobacterium longum* 15708) a été trouvée

sensible à l'oxygène dans ces conditions. Entre 29 et 92% des bactéries probiotiques se retrouvaient dans le caillé et la distribution des cellules entre le caillé et le lactosérum se trouvait influencée par la souche, le moment d'inoculation et le salage. L'inoculation des probiotiques dans le lait avant emprésurage résultait en la perte de près de la moitié des cellules dans le lactosérum, en comparaison avec l'inoculation des cellules juste avant la cheddarisation. L'inoculation des probiotiques dans le lait a amélioré leur stabilité d'environ 1 log sur une période d'entreposage de 20 jours. Le salage a quant à lui entraîné la perte des cellules probiotiques dans le lactosérum en proportion d'environ 13% durant la fabrication de fromage et la diminution de viabilité de *B. longum* de 3 log ufc·g⁻¹ après 3 jours d'entreposage.

2.2. Abstract

The effect of oxygen level, time of inoculation of probiotics, starter addition and salting on viable counts of five probiotic bacteria in curds and whey was examined in simulated Cheddar manufacture. Probiotic bacteria grew little during fermentation, and one strain (*Bifidobacterium longum* 15708) was oxygen-sensitive. Between 29 and 92% of probiotic bacteria were found in curds, and cell distribution between curds and whey was influenced by strain, time of inoculation and salting. Inoculation of probiotics in milk before renneting resulted in almost half the cell losses in whey compared with addition just before cheddaring. Inoculation of probiotics in milk improved their subsequent stability by about 1 log over a 20-day storage period. Salting resulted in approximately 13% loss of cells in whey during processing and in a 3 log cfu·g⁻¹ greater viability loss of *B. longum* after 3 days of storage.

3. Introduction

There is a growing market for foods containing probiotic bacteria, and sales have increased from 7 to 32% each year as a function of products and geographical regions (Heller, 2009; Ohr, 2006). In fact, many consumers prefer probiotic-enriched foods, rather than pills and supplements (Bruhn et al., 2002).

Cheese seems to be a good substrate for the development of new probiotic foods, and particularly fresh cheeses (Starling, 2009). This is partially due to the ability of cheese to improve the survival of probiotic bacteria under gastrointestinal conditions (Kailasapathy, 2002; Saxelin, Korpela & Mayra-Makinen, 2003). Cheddar cheese was selected for this study because of the high popularity of this product. Indeed, Cheddar represents 40% of the total Canadian cheese production market (Statistiques Canada, 2007), and is considered the major type of hard cheese produced worldwide (Donaghy, Totton, & Rowe, 2004).

There are many challenges associated with the addition of probiotics in cheese manufacture. An important one is maintaining the sensory characteristics of the cheese (Bruhn et al., 2002). Another challenge is the survival of bacteria in the cheese matrix during the production and ripening periods. There is no recognized colony forming unit (cfu) level of probiotic bacteria in foods that would guarantee biological activity (Reid, 2008), but it is increasingly recommended to have 10^9 viable cells per portion (Donnet-Hughes, Rochat, Serrant, Aeschlimann & Schiffrin, 1999; CFIA, 2009). Competing starter cultures, salinity and acidity of the matrix are stressful conditions for many probiotics, which can result in viability losses during manufacture and storage (Dinakar & Mistry, 1994; Gomes, Malcata, Klaver & Grande, 1995). Nevertheless, probiotic bacteria have been successfully added to cottage cheese (O'Riordan & Fitzgerald, 1998), Kasar cheese (Özer, Uzun & Kirmaci, 2008), Canestrato Pugliese cheese (Corbo, Albenzio, De Angelis, Sevi & Gobetti, 2001), Gouda (Gomes et al., 1995), goat milk cheese (Gomes & Malcata, 1998), Argentinean cheese (Bergamini, Hynes, Quiberoni, Suárez & Zalazar, 2005),

and Cheddar (Gardiner et al., 2002; Lynch, McSweeney, Fox, Cogan & Drinan, 1996; Ong, Henriksson & Shah, 2007). However, there are numerous instances where significant viability losses occur during Cheddar manufacture and storage (Darukaradhya, Phillips & Kailasapathy, 2006; Gardiner, Ross, Collins, Fitzgerald & Stanton, 1998; Lynch et al., 1996; McBreaty et al., 2001; Ong et al., 2007; Sharp, McMahon & Broadbent, 2008). The major reason for these discrepancies appears to be the probiotic strain. Therefore the effect of strain is of primary importance in evaluating the effect of the cheesemaking process on probiotic viability, and this is why strain evaluation was incorporated in this study.

In the past, manufacturers would simply select a strain that survived processing and storage conditions. Today, this is not always possible, because strains might specifically be selected due to a demonstrated clinical effect. In such instances, manufacturers must find ways to adapt processes to deal with conditions found to be stressful to the designated probiotic culture (Champagne, Gardner & Roy, 2005). Many probiotic bacteria are oxygen-sensitive (Talwalkar & Kailasapathy, 2004) and, in this study, it was decided to target this particular liability. Two processing parameters were selected with the aim of influencing exposure of the strains to oxygen: time of addition during production and adjustment of the dissolved oxygen (DO) level in milk. There are no data in the literature on the effect of milk DO adjustments during Cheddar manufacture on probiotic bacteria viable counts.

With respect to the time of addition in the process, it was our hypothesis that adding oxygen-sensitive probiotics later in the process would be helpful to obtain a higher survival level of the probiotic organism in cheese. The vast majority of studies on probiotic cheeses were done with probiotic cultures added to milk before renneting (Bergamini et al., 2005; Corbo et al., 2001; Darukaradhya et al., 2006; Gardiner et al., 1998; Gomes & Malcata, 1998; Gomes et al., 1995; Kasimoğlu, Göncüoğlu & Akgün, 2004; Lynch et al., 1996; Ong et al., 2007; O’Riordan & Fitzgerald, 1998; Özer et al., 2008; Sharp et al., 2008). The only studies having a

procedure which differed from this time of inoculation were carried out at milling (Dinakar & Mistry, 1994) or into drained curds (Songisepp et al., 2004). There are no data on the effect of probiotic inoculation after whey drainage and just prior to cheddaring.

Some types of cheese are currently produced with little or no lactic acid bacteria culture. Examples include Queso Blanco, Queso Fresco, Italian fresh cheese, and Halloumi. It is well recognized that probiotic bacteria do not compete well with starter cultures (Champagne et al., 2005). Cheddar is typically manufactured with lactococcal starters, but no data are available on the effect of starter addition on the development of probiotic bacteria in this specific manufacturing process. The aim of this study was therefore to evaluate the effect of four processing parameters of Cheddar cheese manufacture on viability of various probiotic cultures: starter addition, time of addition of the probiotic culture, dissolved oxygen level and salting.

4. Materials and methods

4.1 Cultures

Lactobacillus helveticus R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 were obtained from Institut Rosell-Lallemand Inc. (Montréal, Qc, Canada) and *Bifidobacterium lactis* BB-12 from Chr. Hansen Ltd. (Barrie, ON, Canada). These three strains were selected because they are commercially available cultures having documented health benefits (Salminen & Isolauri, 2009; Jandu, Zeng, Johnson-Henry & Sherman, 2009; Wagar, Champagne, Buckley, Raymond & Green-Johnson, 2009). The other cultures were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA): *B. longum* ATCC 15708 and *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. They were selected to widen the range of

bifidobacteria strains, which are reputed to be sensitive to oxygen (Bolduc, Raymond, Fustier, Champagne & Vuilleumard, 2006).

Stock cultures were obtained by mixing MRS-grown (Difco; Detroit MI, USA) cell suspensions with sterile BHI media (Difco) containing 15% (w/v) of glycerol (Sigma; St-Louis, MO, USA) in a 1:5 ratio, adding 1 mL of the cell suspension in Cryovials (Nalgene; Rochester, NY, USA) and freezing at -80°C.

Fresh liquid inocula of probiotic bacteria for the assays without starter were prepared by adding 1 mL of a thawed stock culture to 100 mL MRS-AC medium and incubating at 37°C until a pH of 4.5 was reached. The MRS-AC medium was prepared by adding 1 mL of a filter-sterilized solution of 10% (w/v) ascorbic acid (Bioshop Canada Inc.; Burlington, ON, Canada) and 5% (w/v) L-cysteine hydrochloride (Sigma Aldrich) to 100 mL of sterile MRS. The fermentation times required to attain pH 4.5 and the viable counts attained varied as a function of the strain (Table 1). The cultures were then centrifuged at $5300 \times g$ for 20 min and suspended in sterile peptone water 0.1% (w/v) (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ, USA), to prevent ingredients of the MRS growth medium from influencing the growth of probiotics in milk.

A freeze-dried culture of *B. longum* 15708 was also prepared. First, a liquid culture was grown in MRS-AC, centrifuged at $6000 \times g$ for 20 min at 4°C and the cell pellet re-suspended in one tenth of its original volume in a cryoprotective medium composed of 20% (w/w) of skim milk powder (Agropur; Granby, Qc, Canada) and 5%, (w/v) of sucrose to which 2% (v/v) of an ascorbic acid solution (17.5% w/v) was added (Champagne et al., 1992). The cell suspension was poured in metal trays and frozen at -20°C for 18 h. Trays were placed in a freeze-dryer (FTS Systems; Stone Ridge, NY, USA) to lyophilise under the following program: -40°C for 4 h under atmospheric pressure, 16 h at 0°C and 100 mTorr vacuum, 16 h at 20°C and 100 mTorr vacuum, 60 h at 20°C and under 10 mTorr vacuum. The powder obtained was then grinded and sieved (Canadian Standard Sieve Series

from W.S. Tyler; St. Catherines, ON, Canada) to retain particles of size 150-250 μm . This powder had a viable count of 4.80×10^{10} cfu·g⁻¹.

In assays where a starter culture was added, the lactococci were prepared by inoculating 0.2% (w/w) of a thawed commercial culture of lactic acid bacteria (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* and *L. lactis* ssp. *lactis* H-102) from Chr. Hansen (Milwaukee, WI, USA) into rehydrated skim milk (12%, w/w), previously sterilized at 110°C for 10 min. The culture was incubated to 21°C for 15 h and used within 2 h after this incubation time.

4.2 Laboratory-scale Cheddar manufacturing system

The laboratory-scale procedure for Cheddar cheese curd production was developed, following typical steps and temperature schedules used for commercial Cheddar manufacture (Gardiner et al., 1998; Morin, Pouliot & Britten, 2008). The assays were carried out in 2 L double-walled jars (Schott Duran; Mainz, Germany). Adjustment of temperature during the process was ensured by circulating water in the vessel's outer wall. A valve was installed on the side of the jar, to enable recovery of whey. Special helicoidally vanes were designed for stirring during cheese production and agitation speed was controlled by air motors (Arrow Engineering Co.; Inc, Hillside, NJ, USA).

The milk used was a commercial 3.25% fat (Lactantia Purfiltre; Victoriaville, Qc, Canada) homogenized, pasteurized and microfiltered product. Homogenized milk is rarely used in cheesemaking, but the low bacterial contamination level obtained through microfiltration served the purpose of this experimental plan. The first step consisted of the inoculation of 1% (w/v) of freeze-dried *B. longum* 15708 cells and 1.55% (w/w) of the fresh starter culture in milk adjusted to 32°C. Following 1 h of stirring, CaCl₂ and double-strength rennet (Danisco; Copenhagen, Denmark) were added at levels of 0.0075% (v/v) and 0.01% (v/v) respectively, and vanes were taken out of milk. When a proper coagulum was

formed (approximately 30 min after rennet addition) the curd was cut by the rotation of a cutting blade assembly designed specifically to fit into the 2 L beakers. The curds were allowed to settle for 10 min, at which time the cooking was initiated. Gentle stirring was carried out during cooking, in which the temperature was initially increased to 38°C, and then decreased to 35°C over 30 min. Wheying off was carried out when the pH reached 6.1. A simulated cheddaring step was made by incubating the curds at 37°C and repeatedly turning the curd mat over every 30 min, until a pH of 5.2 was reached. The cheese was cut in 0.5 cm cubes with a specially designed apparatus and curds were separated into two sterile containers. One half was salted at 2.25% (w/w) with iodine-free salt. Curds were then put in small cheese moulds and pressed with equal weights of 1.4 kg overnight. These cheeses were placed into sealed plastic bags under vacuum and incubated at room temperature for one day. They were subsequently stored at 4°C for 20 days. These parameters were used to simulate the commercial marketing practice of fresh Cheddar cheese (Kosikowski & Mistry, 1997; Mahaut, Jeantet & Brulé, 2000; Morin et al., 2008).

Throughout the productions, whey and curds were sampled at different steps and weighed, to ascertain the masses required to calculate the distribution of the bacteria. Temperature (Cole-Parmer; Vernon Hills, IL, USA), dissolved oxygen concentrations (Thermo Electron Corporation, Model Orion 850Aplus; Marietta, OH, USA), pH and titratable acidity (Radiometer A/S; Copenhagen, Denmark) were followed. Every piece of equipment used was sanitized in 200 ppm chloride solution.

4.3 Effect of dissolved oxygen level

To select the most oxygen-sensitive probiotic strain during cheese production, a laboratory procedure had to be adapted to produce cheese with the minimum of oxygen, while limiting other factors that could have an impact on viability of bacteria, such as acidity and salinity. Thus, the addition of lactic acid

bacteria (starter) was not carried out in this series of experiments. Coagulation of milk was achieved only by the addition of rennet, following the adjustment of milk to pH 6.2 with 40% (v/v) lactic acid (American Chemicals Ltd.; Montréal, Qc, Canada). Milk was first de-aerated under vacuum for one hour before use. It was also supplemented with ascorbic acid to a final concentration of 0.1% (v/v), to lower the dissolved oxygen level in milk, which has been shown to increase bifidobacteria survival (Dave & Shah, 1997; Klaver, Kingma, & Weerkamp, 1993).

For these assays, five strains were tested. In addition to mild deaeration and supplementation with ascorbic acid, the head space of the jars was continuously flushed with gaseous nitrogen at approximately 10 kPa pressure. As pH did not fluctuate, due to the absence of starter, time was tracked to follow the different steps of cheese production previously described. Cheese curds were neither salted nor pressed and were placed into hermetic sterile bottles. Bottles containing curds from low DO production were incubated during one hour in an anaerobic environment (85% N₂ / 10% H₂ / 5% CO₂ atmosphere) before being capped. The bottles were then incubated at room temperature (22°C) for one day, and then stored at 4°C.

4.4 Effect of time of inoculation of the probiotic cultures

Two inoculation times were tested in this experiment, in normal cheese production with starters where DO was not adjusted. Three lots of lyophilised bifidobacteria were prepared. For each assay, one lot was used and added directly in milk or after the first whey drainage, prior to cheddaring. In the latter case, when cells were added just prior to cheddaring, curds were delicately mixed after inoculation. Two inoculation concentrations were also tested at this time. When added to milk, the concentration added was 1×10^7 cfu·mL⁻¹, which represented 1.5×10^{10} cfu per 1.5 L of milk. However, to follow concentration rates during normal cheese productions, when bifidobacteria were added after curd drainage, the same quantity of cells (1.5×10^{10} cfu) was added to the curds. In a second series of

assays aimed at testing the effect of probiotic inoculation level after curd drainage on cell recovery in the curds, the inoculation level was ten times higher (1.5×10^{11} cfu total in the curds obtained from 1.5 L of milk).

4.5 Analyses

To ascertain viable bacteria in the freeze-dried cultures, rehydration was first carried out by adding 1 g of powder in 4 mL of a rehydration medium composed of 1.5% (w/v) bactopectone (Becton Dickinson), 1% (w/v) bactotryptone (Becton Dickinson) and 0.5% (w/v) of meat extract (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England). The suspension was homogenized using Ultra-turax-type generator probes (OMNI TH International, Model TH-115; Marietta, GA, USA) at high speed for 30 s. Cell suspensions were incubated at 37°C for 15 min, to help dissolution and rehydration. A second homogenization with probe was carried out in the first dilution's test tube to break down chains. Serial dilutions were subsequently carried out in 0.1% peptone water with homogenization simply carried out by vortexing the test tube for 10 s. Cell suspensions were dispensed in Petri dishes and plated with MRS medium.

For viable counts (cfu) in solid samples of cheese, curds were mixed with 2% (w/v) sodium citrate broth (Anachemia; Montréal, Qc, Canada) kept at 45°C and homogenized in a Stomacher unit (Seward, model 400 Circulator; Worthing, West Sussex, UK) at 260 rpm for 1 min (Health Canada, 1983). Liquid samples (milk, whey) were homogenized with Omni-Tips generator probes for 30 s, and diluted with serial 0.1% peptone water tubes. When starters were not used for curd production, concentrations of probiotics were followed on MRS agar pH 6.5, anaerobically incubated for 48 h at 37°C (85% N₂ / 10% H₂ / 5% CO₂ atmosphere), since they were expected to be the only source of lactic acid bacteria. When both starters and probiotics were inoculated, selective media were used. Concentrations of *Lactococcus* spp. were followed on M17 agar (Becton Dickinson), aerobically incubated for 48 h at 30°C (Turcot, St-Gelais, & Turgeon, 2002) and concentrations

of *B. longum* were followed on LP agar, incubated for 48 h at 37°C in an anaerobic (85% N₂/ 10% H₂/ 5% CO₂) atmosphere (Lapierre, Undeland, & Cox, 1992).

Cheeses were sampled on the production day as well as at days 1, 3, 7, 14 and 21 of storage. At day 7, cheeses were tested for moisture and salt concentration. Moisture was measured by gravimetry following drying at 100°C for 24 h, and salt was tested using a chloride-meter salt analyzer Corning (Nelson-Jameson Inc., Marshfield, WI, USA). All the conditions were tested at least three times in different cheese productions. Thus, data are the average of three independent assays.

4.6 Calculations

To evaluate the yields in cheese, total viable bacterial population and distribution of probiotics in the cheese matrix, calculations were carried out using bacterial counts, masses and volumes sampled during cheese productions.

Yields in cheese represent the mass (g) of cheese obtained per 100 mL of milk. Other equations were as follows:

“Total viable population variation” when probiotics were added in milk was calculated by:

$$[\text{Log} ((\text{Curds mass} \times \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1} \text{ in curds}) + (\text{Total whey mass} \times \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1} \text{ in whey}))] - [\text{Log} ((\text{Milk mass} + \text{starters culture mass}) \times \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1} \text{ in inoculated milk})] \quad (1)$$

“Total viable population variation” when probiotics were added after whey drainage was calculated by:

$$[\text{Log} ((\text{Curds mass} \times \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1} \text{ in curds}) + (\text{Cheddarization whey mass} \times \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1} \text{ in whey}))] - [\text{Log} (\text{Freeze-dried probiotic mass} \times \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1} \text{ powder})] \quad (2)$$

Distribution of probiotics (% in curds) was calculated by: (3)

$$\frac{[\text{Curds mass} \times \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1} \text{ in curds}]}{[(\text{Curds mass} \times \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1} \text{ in curds}) + (\text{Total whey mass} \times \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1} \text{ in whey})]} \times 100$$

4.7 Statistical analyses

For all experiments, three independent assays were carried. This implied different milk lots, different lots of freeze-dried cultures, different days of production and fresh starters. Statistical analyses were carried out using InStat (GraphPad; La Jolla, CA, USA) software. An analysis of variance (Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test) was carried out to see the effect of strain on cell distribution in the curds as well as on inoculum lots. Unpaired t-test were used for the analysis of the effects of the time of inoculation, starter addition, oxygen level and salting on the viability of probiotic cultures. Unless otherwise stated, differences between means were considered significant when P value was lower or equal to $P \leq 0.05$.

5. Results and discussion

Since two of the parameters tested were expected to affect oxygen-sensitive cultures (dissolved oxygen level and inoculation time), it was decided first to evaluate the strains' sensitivity to oxygen.

5.1 Effect of dissolved oxygen level

In assays carried out at pH 6.2 without starters, the average dissolved oxygen (DO) level of milk obtained throughout production was $7.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ during the control assay and an average of $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ during the low DO production. The low DO process had three times less DO, but still could not be considered as

anaerobic. The low DO could, rather, be considered as microaerophilic. Complete anaerobiosis would have offered a better glimpse of the effect of oxygen on viable counts during a Cheddar process, but it would not have had as much industrial applicability. Indeed, due to the many agitation and cutting steps in the process, it is doubtful that complete anaerobiosis could be achieved industrially. Thus, although this methodology did not completely remove oxygen, it had the advantage of being representative of what could be achieved with gas flushing. Such an approach was also used by Klaver et al. (1993).

Having expected cfu levels of the fresh cultures (Table 1), attempts were made to inoculate milk at 10^7 cfu·mL⁻¹. To have independent assays, different lots of fresh probiotic inocula were used for each treatment. This explains why the inoculation levels between strains and treatments, which are presented in Table 2, were not always identical. Statistical analysis revealed, however, that these variations were too small to be significant ($P > 0.05$).

Table 1 : Incubation time required to prepare the various inocula and populations obtained in the cultures. Adapting the incubation time aimed the preparation of cells having similar physiological states.

Strain	Culture	
	Incubation time needed to reach pH 4.5	CFU·mL ⁻¹
<i>L. helveticus</i> R0052	8h30	2.29×10^9
<i>B. longum</i> R0175	~ 11h ^a	1.47×10^9
<i>B. lactis</i> BB12	14h – anaerobic ^b	1.19×10^9
<i>B. longum</i> 15708	~ 15h	1.74×10^9
<i>B. infantis</i> 15697	14h30	3.92×10^8

^a With *B. longum*, there were small variations in time (± 1.5 h) required to reach the target pH. Therefore the time indicated is an approximate value.

^b The BB-12 culture test tubes were incubated in a 85%N₂/10%H₂/5%CO₂ atmosphere.

The first series of assays was carried out to find cultures which could be influenced by the DO level during the starter-less Cheddar process. In these assays,

since no starter was added, pH was adjusted to a value of 6.2 to enhance rennet activity. Results showed that, in most cases, cfu counts in curds and whey were not affected by the DO level (Table 2). The only probiotic strain showing a significant difference between the low DO during cheese production and the high DO control cheese productions was *B. longum* 15708 (Table 2).

Table 2: Viable probiotic counts, distribution and ratio from tests for the selection of an oxygen sensitive strain in starter-less cheese production (Log CFU·mL⁻¹ or CFU·g⁻¹)

Strain	Condition	Viable Count (log CFU·mL ⁻¹ or ·g ⁻¹)			Total population variation (log CFU·mL ⁻¹) ^a	Distribution (% in curds) ^b
		Initial Milk	Curds	Whey		
<i>B. lactis</i> BB12	Control	7.18 (0.03)	7.88 (0.01)	6.15 (0.07)	-0.09 (0.03)	90 (2)
	Low DO	7.18 (0.01)	7.89 (0.06)	6.09 (0.13)	-0.08 (0.05)	92 (1)
<i>B. longum</i> R0175	Control	7.30 (0.01)	8.01 (0.08)	6.61 (0.07)	-0.03 (0.07)	81 (2)
	Low DO	7.30 (0.01)	8.04 (0.02)	6.55 (0.04)	-0.02 (0.02)	84 (2)
<i>L. helveticus</i> R0052	Control	7.08 (0.03)	7.84 (0.04)	6.15 (0.06)	-0.01 (0.05)	90 (1)
	Low DO	6.82 (0.2)	7.74 (0.11)	6.07 (0.11)	0.14 (0.11)	89 (2)
<i>B. longum</i> 15708	Control	7.34 (0.03)	8.07 (0.02)	6.73 (0.13)	0.02 (0.06)	78 (4)
	Low DO	7.23* (0.05)	8.18** (0.03)	6.85 (0.01)	0.23* (0.07)	79 (1)
<i>B. infantis</i> 15697	Control	6.90 (0.04)	7.65 (0.09)	6.16 (0.06)	-0.01 (0.07)	84 (2)
	Low DO	6.91 (0.05)	7.68 (0.07)	6.28 (0.09)	0.04 (0.04)	82 (1)

^a Obtained using equation (1).

^b Obtained using equation (3).

Results are the average of three independent assays. Values in brackets represent standard error of the means (SEM). Unpaired t tests were done for each sample of each strain in order to compare means of the low DO productions with their corresponding control. The probability (P) of a significant difference between the two values is identified with the following symbols: * represents $P \leq 0.1$, while ** represents $P \leq 0.05$. All other comparisons had $P > 0.1$.

When comparing the total population inoculated and the total viable counts recovered at the end of the fermentation (curds and whey), it is possible to ascertain growth or mortality during the 5 h process (Eqs. (1) and (2)). Generally, very little growth was noted during the process (Table 2). The greatest increase for total population in cheeses and whey was with *B. longum* 15708 and was 0.23 log in cheese for the low DO treatment (Table 2). These data are in line with those of Klaver et al. (1993), who showed that some strains of bifidobacteria grow better in milk with a low oxygen level. Therefore, lowering the DO level enabled more

extensive growth of the bifidobacteria during the Cheddar cheese manufacturing process, which suggested that this was the most oxygen-sensitive strain of the various cultures examined. A previous study in unfermented milk had indeed found this strain to be negatively affected by the oxygen level (Bolduc et al., 2006). Thence, *B. longum* 15708 was chosen for subsequent assays with starters. The absence of an effect of DO on the other strains, combined to an absence of growth during processing suggests that parameters other than oxygen level control their growth in cheese.

There was no significant effect of DO level ($P > 0.05$) on cell distribution between curds and whey (Eq. (3)) for any of the probiotic strains used (Table 2). However, a significant difference between strains with respect to distribution in curds was observed ($P \leq 0.05$). Thus, a lower percentage of *B. longum* 15708 was noted in curds as compared with *B. lactis* BB-12 ($P \leq 0.05$ for control curds and $P \leq 0.001$ for low DO ones) or *L. helveticus* R0052 ($P \leq 0.05$ for control curds and $P \leq 0.01$ for low DO ones). It was examined if the distribution of probiotics between whey and curds at the end of production (Eq. (3)) could be a reflection of cell recovery in curds following rennet coagulation. This is an important economic parameter to manufacturers. Since very little growth occurred during production (Table 2), it could be argued that the distribution levels of probiotics in curds in this study are in fact indicative of the recovery level of probiotics in curds, following coagulation and cutting. However, the highest total population increase was obtained with *B. longum* 15708, which also had the lowest percentage of probiotics in curds. This raised the possibility that the lower percentage of probiotics in curds for some strains could be due to better growth of the cultures in whey rather than in the curds during cooking, cheddaring and salting. A regression analysis showed that there was no significant relationship between the percentage of probiotics in curds and the “total viable population variation” data (Eqs. (1) and (2); $R^2 = 0.20$, $P = 0.19$). Therefore, under these experimental conditions, the various probiotic bacteria distribution levels in curds at the end of processing do seem to be strain-related and to reflect cell recovery in the curd during rennet coagulation.

As mentioned previously, strains are now selected on the basis of demonstrated clinical benefits and manufacturers might be faced with viability issues during processing and storage. In this study, these first series of assays were designed to find a strain which showed viability problems in a Cheddar cheesemaking process. Two such problems were identified with *B. longum* 15708. First, it was the most sensitive strain to oxygen. It was our hypothesis that technological adaptations, such as the time of addition of the culture, could be carried out to reduce the detrimental effect of oxygen. Secondly, the apparently lower levels of *B. longum* 15708 in curds added to the interest of using this strain for the subsequent trials on the effects of the time of addition of probiotics, since one of the parameters to be tested was cell retention in the curds.

5.2 Effect of starter addition

In the second series of assays, the addition of starters enabled the laboratory method to more closely resemble a Cheddar cheesemaking process than the original trials, aimed at selecting the probiotic culture as a function of DO level. Another difference between this second series of assays with the starter and the previous one was that freeze-dried probiotics were inoculated instead of the fresh cultures. This more closely resembled industrial practices as well.

Chemical analyses were carried out to ascertain if the curds obtained were similar in composition to typical Cheddar cheese. The moisture levels varied between 44 and 51%, which is higher than the 41% maximum tolerated by law for fresh Cheddar cheese curds (Éditeur Officiel du Québec, 2009). Evidently, wheying-off steps of curd (stirring, cheddaring and pressing) were not as effective in the laboratory scale as on the industrial scale. The higher moisture in the laboratory-made products should have resulted in high yields but this was not the case. Yields in our assays varied between 7.6% and 9.4%, which was much lower than expected. Indeed, typical Cheddar yield should be approximately 11.3% for such a moisture level (Mahaut et al., 2000). This could partially be due to increased

losses of milk fat in whey because commercial homogenized milk was used in the study. There could also be greater losses of curd solids in the whey in this laboratory process. The pH in the curds at the end of the fermentation was of 5.3, which is adequate for this process. Salting was carried out as expected, with salt content in the curds ranging between 2.0% and 2.3%. The unsalted curds gave readings of 0.12% salt. In summary, readers must keep in mind that the laboratory process used in this study incorporated all the Cheddar steps (rennet coagulation, cutting, wheying off, cheddaring, cutting of blocks and dry-salting) and generated products with correct salt and pH levels; however they were more moist and had lower yields than what would be seen in commercial products.

The viable counts of *B. longum* 15708 during process and storage are found in Table 3 and Fig. 1 respectively. In the first series of assays, inoculation with *B. longum* 15708 at a level of 1.5×10^{10} cfu directly into 1.5 L of milk, should have resulted in 10^7 cfu·mL⁻¹. However, the cfu count ($6.75 \log$ cfu·mL⁻¹; Table 3) suggests that only 56% of these microbial levels were actually detected 5 min after inoculation. In assays where 1.5×10^{10} cfu were directly added to the curds prior to cheddaring, the total viable counts obtained in curds and in whey after 30 min of cheddaring only represented 9% of the viable cells added. This suggested that considerable viability loss of *B. longum* 15708 occurred during the first 30 min of cheddaring. It was not investigated if this was linked to the direct inoculation of freeze-dried cells rather than a fresh liquid culture. It has been shown that cfu counts following rehydration are highly influenced with the osmolarity of the reconstitution fluid (Choate & Alexander, 1967), the rehydration temperature (Morichi, Irie, Yano, & Kembo, 1967) as well as by the rate and volume of medium used for rehydration (De Valdez, De Giori, De Ruiz Holgado & Olivier, 1985). Although viability losses upon inoculation occurred, the use of lyophilised cells was maintained for our assays because it is the usual procedure used in industry. Indeed, it makes probiotic addition easier, as well as enabling more stable inoculation levels between different food productions. These high viability losses calculated at rehydration in the curds might also be caused by an acid stress. At the cheddaring

step, pH was lower than in milk (means of pH 6.0 versus pH 6.7, respectively). A pH of 6.0 is arguably not a very acid environment, but Kheadr, Dabour, Le Lay, Lacroix and Fliss (2007) have found that *B. longum* 15708 is very sensitive to acid conditions (Kheadr et al., 2007). To our knowledge, this is the first observation of losses in viability directly after inoculation of a freeze-dried probiotic culture in a Cheddar cheese process. This suggests that a rehydration step prior to inoculation might be desirable, and further studies need to be done on this aspect.

The total population variation (Eq. (1)) of *B. longum* 15708 at the end of the fermentation with starters without salting was of only 0.09 log when the milk was inoculated with culture (Table 3). This was similar to the control treatment in the absence of starters (pH 6.2; Table 2). Thus, the fermentation did not significantly affect ($P > 0.05$) the viability of this *B. longum* strain during the production. However, very little growth or viability losses seemed to occur during the 5 h-Cheddar fermentation with *B. longum* 15708, which is in agreement with results of Klaver et al. (1993) in a yoghurt-type fermentation with bifidobacteria and *Streptococcus thermophilus*. This could be due to sub-optimum growth temperatures or a low growth rate in milk. Indeed, bifidobacteria do not grow much over 5 h in milk even at 37°C (Klaver et al., 1993).

Manufacturers are obviously interested in the % of recovery in curds of the probiotics inoculated. We were unable to calculate this with high precision. This is because the population that is ultimately found in the cheese curds is a result of three elements: 1) retention of the cells at renneting 2) cell losses during wheying off, cheddaring or salting and 3) viability loss (or growth) during the 3-5 h processing time. However, since data suggest that little growth has occurred, the % of distribution (Tables 2 and 3) provides a reasonably good picture of the % of retention in curds throughout the process.

Table 3: Effects of inoculation moment of *B. longum* 15708 and salting of the curds on viable counts in model cheese productions (bifidobacteria counts are in Log CFU·mL⁻¹ or CFU·g⁻¹)

Samples	Production conditions			
	Salted curds		Unsalted curds	
	Addition in milk	Addition prior to cheddarization	Addition in milk	Addition prior to cheddarization
Inoculated milk	6.75 (0.07)	-	6.75 (0.07)	-
Curds prior to cheddaring	6.90 (0.06)	-	6.90 (0.06)	-
Whey prior to cheddaring	6.42 (0.02)	-	6.42 (0.02)	-
Residual whey at cheddaring step	6.52	7.43 (0.03)	6.52	7.36 (0.13)
Curds at end of fermentation	7.48 (0.13)	6.67** (0.15)	7.63 (0.03)	6.85*** (0.05)
Total population variation (Log CFU·mL ⁻¹)	0.01 (0.02)	-0.75** (0.17)	0.09 (0.08)	-0.74** (0.19)
Distribution (% in curds)	56 (8)	29** (6)	70 (7)	41* (9)

Results are the average of three independent assays. Values in brackets represent standard error of the means (SEM). Unpaired t tests were done to compare the two moments of inoculation (milk VS cheddarisation) in products that were salted or not. The probability (P) of a significant difference between the two values is identified with the following symbols: * represents $P \leq 0.1$, ** represents $P \leq 0.05$ and *** represents $P \leq 0.01$. All other comparisons had $P > 0.1$.

5.3 Effect of the moment of inoculation

Addition of rennet to milk is accompanied by strong agitation and, hence, oxygenation of milk. It was our hypothesis that such incorporation of oxygen to milk at this step might be detrimental to oxygen-sensitive cells, and it was hoped that the addition of the probiotic culture at a later stage of the manufacturing process would reduce exposure to oxygen. Furthermore, it was hoped that inoculation at the beginning of cheddaring would improve recovery yields in curds, because of lower losses in whey.

Results were the opposite, since a significantly higher population of *B. longum* was found in curds when the probiotic culture was added to milk (Table 3). This is the first study where inoculation was done just prior to cheddaring, but the results obtained in this study are in agreement with those of Songisepp et al. (2004), who concluded that addition of lactobacilli into milk should be the preferred method of incorporation when compared with inoculation into

drained curds. The first explanation is the lower viable counts of bifidobacteria in the curds at the end of production is due to a greater loss in viability following inoculation when done at the cheddaring stage, as previously mentioned. The second reason is the very high losses of the probiotic bacteria in whey (Table 3). Although the quantity of whey generated during cheddaring is much lower than that obtained after the first cutting, the population of probiotics in the cheddaring whey was ten times higher than in the whey obtained after the first cutting when probiotics were added to milk. Evidently, cells were not as well entrapped in the curd mass at cheddaring than at renneting.

There was a significant effect of the time of inoculation on both cfu in curds and total population variations, and this occurred for salted curds and unsalted curds (Table 3). Distribution of *B. longum* cells between whey and curds was also affected by the time of inoculation and for both salting treatments (Table 3). In both instances, the fraction of probiotic cells recovered in the curds when the culture was added to milk was almost twice that observed when inoculation was carried out before cheddaring. Several studies have reported on cheeses with different salt concentrations (El-Gendy, Abdel-Galil, Shahin & Hegazi, 1983; Prodanski, 1970) with the aim of studying the effect on survival of probiotics (Gomes & Malcata, 1998; Kasimoğlu et al., 2004). These authors have concluded that probiotics survive better in cheese with lower salt concentrations. Our results are thus in line with the literature.

In light of these data, a series of assays was carried out using a ten times higher inoculation level, *i.e.* 1.5×10^{11} cfu in the curds obtained from 1.5 L of milk. This enabled us to generate curds having approximately 10^8 cfu·g⁻¹ (Fig. 1). However, there was no effect ($P > 0.05$) of the higher inoculation rate during cheddaring on the distribution (% in curd). Losses in whey were also ten times higher (data not shown). These assays showed that inoculation level did not significantly affect ($P > 0.05$) the distribution of probiotics between curds and whey.

The fraction of *B. longum* 15708 cells in the curds was 78% when fresh cultures were inoculated (Table 2) but 70% when freeze-dried cultures were used (Table 3; unsalted curds). In our study, this difference was not found to be statistically significant, but further assays are warranted to see if the form of the inoculum (dried or liquid) can indeed affect retention of the cells in the curd.

5.4 Stability during storage

Viable counts during storage showed that *B. longum* 15708 withstood storage better in unsalted curds than in salted ones, irrespective of the time of inoculation or its level. The detrimental effect of salting on *B. longum* viability is particularly strong during the first three days of storage (Fig. 1). In the province of Québec (Canada), legislation authorises the storage of fresh curds on retail counters at room temperature for 24 h. Hence, to simulate this commercial practice, the storage conditions were 1 day at 25°C and 20 days at 4°C. High losses in viability during the first day might partially be due to the high incubation temperature. Indeed, it has frequently been noted that lower storage temperature improves the stability of probiotics (Higl et al., 2007; Kailasapathy, Harmstorf & Phillips, 2008). However, after 21 days of storage, differences between salted and unsalted cheeses were not statistically significant ($P > 0.05$).

The pH of the medium is critical to the stability of probiotic cultures during storage (Kailasapathy et al., 2008). It was therefore examined if the effect of salting on viable counts was related to variations of the pH. Over the 21 day storage period, the pH dropped from 5.3 to 4.9 in salted curds, whereas in unsalted ones, it was lowered to 4.8. This larger drop in pH with unsalted curds was found to be statistically significant ($P \leq 0.03$). Kailasapathy et al. (2008) showed that lower pH results in lower bacterial stability during storage. Since salted curds actually had higher pH values than the unsalted ones it can therefore be concluded that the detrimental effect of salting on viability during storage was not linked to pH.

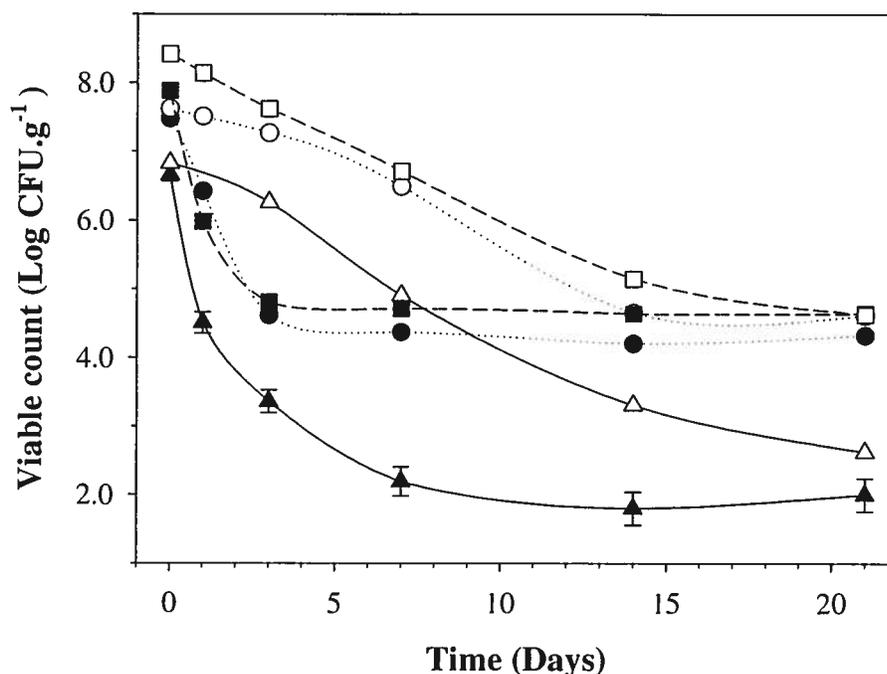


Figure 1 : Viable counts of *B. longum* 15708 in model cheese throughout storage (1 day at 22°C and 20 days at 4°C).

Legend:

- Inoculation in milk/salted curds (····●····),
- Inoculation in milk/unsalted curds (····○····),
- Inoculation prior to cheddarization/salted curds (—▲—),
- Inoculation prior to cheddarization/unsalted curds (—△—),
- Inoculation at 10× prior to cheddarization /salted curds (---■---),
- Inoculation at 10× prior to cheddarization /unsalted curds (---□---)

Results are the average of three independent assays. For reasons of clarity, error bars (standard error of the means) are presented only for the treatment for salted curds inoculated at cheddarization¹; the variations presented were typical of other curves.

Survival of *B. longum* 15708 during storage was higher when cells were initially inoculated in milk, rather than at cheddaring. Thus, after 21 days of storage, the average drop in microbial counts in cheeses initially inoculated in milk was 3 logs ($\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$), whereas the equivalent product inoculated at cheddaring was 4 logs ($\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$). With yoghurt, it has been shown that survival of *Lactobacillus acidophilus*

¹ Un graphique présentant tous les écarts-types des résultats de ces essais est présenté dans l'appendice A du présent document.

during storage is better if the probiotic is added at the same time as the starter, rather than at the end of the fermentation (Hull, Roberts, & Mayes, 1984). This observation of the effect of the time of inoculation on the subsequent stability of yoghurt during storage also seems to apply to bifidobacteria in Cheddar manufacture.

There was no significant difference ($P > 0.05$) in *B. longum* viable population decline during storage when comparing the two inoculation ratios prior to cheddaring. These results are in line with the identical mortality percentages during production itself.

5.5 Perspectives

In the past, probiotic cultures were selected for their ability to survive processing steps but, today, clinical health effects dominate the selection process. This means that manufacturers might attempt to add some highly sensitive strains to their food, such as *B. longum* 15708, and experience high viability losses. Health Canada (2009) recommends a quantity of 10^9 cfu of probiotic bacteria per portion. Considering a cheese portion to be approximately 30 g, only two of the three inoculation methods tested in this study would attain this level after products left the manufacturing plant. However, the rapid population decline with *B. longum* 15708 would require the product to be marketed within three days. As a result, developing a Cheddar cheese with *B. longum* 15708 would require another approach to enable sufficient survival throughout production and cheese storage. Microencapsulation has been shown to improve bacterial survival during storage in yoghurt, by protecting cells against acidity and oxygen (Ding & Shah, 2007; Talwalkar & Kailasapathy, 2004). It remains to be determined if the approach could also benefit *B. longum* 15708 in the production and storage of fresh Cheddar cheese.

6. Conclusion

A laboratory-scale Cheddar cheese process was used to evaluate the viability of *B. longum* 15708 during manufacture and storage of fresh Cheddar cheese. Some results obtained in this study confirmed data in the literature: 1) *B. longum* 15708 is sensitive to oxygen levels found in dairy processing conditions, 2) there is generally little growth of probiotics during Cheddar cheese production, and 3) salting has a detrimental effect on the stability of probiotics during storage of cheese. Furthermore, many findings in this study were novel: 1) lowering the oxygen level in milk during Cheddar manufacture does not strongly affect viable counts of probiotics in cheese curds but variations occur as a function of strain, 2) since *B. longum* 15708 does not grow much during the Cheddar process, addition of lactic starters have little effect on bifidobacteria multiplication in the cheesemaking process, 3) recovery of probiotics in the cheese curds when the culture was added in the milk before renneting was almost twice that observed at cheddaring, 4) when probiotics are added at the cheddaring step, inoculation level did not affect the distribution of probiotics between curds and whey, 5) salting increased losses of probiotics from curds, 6) addition of probiotics in milk improved their subsequent stability by about 1 log over the 20-days storage period as compared with cells added at cheddaring, 7) the detrimental effect of salting on stability of probiotics principally occurred during the first three days of storage, 8) the detrimental effect of salting on cell viability during storage was not linked to a lower pH; on the contrary, pH was higher by 0.01 unit in salted curds and 9) probiotic population level, resulting from different inoculation rates, does not affect the rate of viability loss during storage.

Microencapsulation could potentially be able to improve bacterial survival during the process and storage. Further studies are ongoing on this aspect.

7. Acknowledgments

The scientific and technical expertise of Yves Raymond, Sophie Turcot, Gaéтан Bélanger, Annie Caron, and Hélène Giroux is gratefully acknowledged. This study was supported by a grant from the Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies, the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Novalait, Inc. as well as Agriculture and Agri-Food Canada. Marie-Hélène Fortin was also recipient of an Excellence Grant from Commission Canadienne du Lait, Novalait Inc as well as a grant from the Fondation Armand Frappier.

8. References

- Bergamini, C. V., Hynes, E. R., Quiberoni, A., Suárez, V. B. & Zalazar, C. A. (2005). Probiotic Bacteria as Adjunct Starters : Influence of the Addition Methodology on their Survival in a Semi-Hard Argentinean Cheese. *Food Research International*, 38, 597-604.
- Bolduc, M. P., Raymond, Y., Fustier, P., Champagne, C. P. & Vuillemard, J. C. (2006). Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential of non-fermented pasteurized milk. *International Dairy Journal*, 16, 1038-1048.
- Bruhn, C. M., Bruhn, J. C., Cotter, A., Garrett, C., Klenk, M., Powell, C., Stanford, G., Steinbring, Y. & West, E. (2002). Consumer Attitudes Toward Use of Probiotic Cultures. *Journal of Food Science*, 67, 1969-1972.
- Champagne, C. P., Gardner, N. & Roy, D. (2005). Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 61-84.
- Champagne, C. P., Morin, N., Couture, R., Gagnon, C., Jelen, P. & Lacroix, C. (1992). The Potential of Immobilized Cell Technology to Produce Freeze-Dried, Phage-Protected Cultures of *Lactococcus lactis*. *Food Research International*, 25, 419-427.
- Choate, R. V. & Alexander, M. T. (1967). The Effect of the Rehydration Medium on the Recovery of Freeze-Dried *Spirillum atlanticus*. *Cryobiology*, 3, 419-422.
- Corbo, M. R., Albenzio, M., De Angelis, M., Sevi, A. & Gobetti, M. (2001). Microbiological and Biochemical Properties of Canestrato Pugliese Hard Cheese Supplemented with Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 84, 551-561.
- Darukaradhy, J., Phillips, M. & Kailasapathy, K. (2006). Selective Enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., Starter Lactic Acid Bacteria and Non-Starter Lactic Acid Bacteria from Cheddar Cheese. *International Dairy Journal*, 16, 439-445.

- Dave, R. I. & Shah, N. P. (1997). Effectiveness of Ascorbic Acid as an Oxygen Scavenger in Improving Viability of Probiotic Bacteria in Yoghurts Made with Commercial Starter Cultures. *International Dairy Journal*, 7, 435-443.
- De Valdez, k. G. F., De Giori, G. S., De Ruiz Holgado, A. P. & Olivier, G. (1985). Rehydration Conditions and Viability of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria. *Cryobiology*, 22, 574-577.
- Dinakar, P. & Mistry, V. V. (1994). Growth and Viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*, 77, 2854-2864.
- Ding, W. K. & Shah, N. P. (2007). Acid, Bile, and Heat Tolerance of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria. *Journal of Food Science*, 72, 446-450.
- Donaghy, J. A., Totton, N. L. & Rowe, M. T. (2004). Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during Manufacture and Ripening of Cheddar Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4899-4905.
- Donnet-Hughes, A., Rochat, F., Serrant, P., Aeschlimann, J. M. & Schiffrin, E. J. (1999). Modulation of Nonspecific Mechanisms of Defense by Lactic Acid Bacteria : Effective Dose. *Journal of Dairy Science*, 82, 863-869.
- Éditeur Officiel du Québec (2009) Règlement sur les aliments. Loi sur les produits alimentaires. Québec, QC, R.Q. c. P-30, r.2
<http://www.canlii.org/fr/qc/legis/regl/rq-c-p-29-r1/derniere/rq-c-p-29-r1.html>
- El-Gendy, S. M., Abdel-Galil, H., Shahin, Y. & Hegazi, F. Z. (1983). Use of Salt-Tolerant Lactic Acid Bacteria for Manufacture of White Pickled Cheese (Domiat) Ripened without Salted Whey in Sealed Polyethylene Pouches. *Journal of Food Protection*, 46, 335-338.
- Gardiner, G., Ross, R. P., Collins, J. K., Fitzgerald, G. & Stanton, C. (1998). Development of a Probiotic Cheddar Cheese Containing Human-Derived *Lactobacillus paracasei* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2192-2199.
- Gardiner, G. E., Bouchier, P., O'Sullivan, E., Kelly, J., Collins, J. K., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. & Stanton, C. (2002). A Spray-Dried Culture for Probiotic Cheddar Cheese Manufacture. *International Dairy Journal*, 12, 749-756.
- Gomes, A. M. P. & Malcata, F. X. (1998). Development of Probiotic Cheese Manufactured from Goat Milk: Response Surface Analysis via Technological Manipulation. *Journal of Dairy Science*, 81, 1492-1507.
- Gomes, A. M. P., Malcata, F. X., Klaver, F. A. M. & Grande, H. J. (1995). Incorporation and Survival of *Bifidobacterium* sp. Strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* Strain Ki in a Cheese Product. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 49, 71-95.
- Health Canada (1983) Microbiological examination of cheese. Official method MFO-14. At: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume1/mfo14-01-eng.php>
- Health Canada (2009). Guidance Document - The Use of Probiotic Microorganisms in Food *Food Directorate - Health Products and Food Branch*, http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-gpsa/pdf/legislation/probiotics_guidance-orientation_probiotiques-eng.pdf 8 pp.
- Heller, L. (2009). Danisco breaks down probiotics market. USA: Nutra Ingredients. www.nutraingredients-usa.com/content/view/print/245558

- Higl, B., Kurtmann, L., Carlsen, C. U., Ratjen, J., Forst, P., Skibsted, L. H., Kulozik, U. & Risbo, J. (2007). Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. *Biotechnology Progress*, 23, 794-800.
- Hull, R. R., Roberts, A. V. & Mayes, J. J. (1984). Survival of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 39, 164-166.
- Jandu, N., Zeng, Z.J., Johnson-Henry, K.C. & Sherman, P.M. (2009) Probiotics prevent enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-mediated inhibition of interferon-gamma-induced tyrosine phosphorylation of STAT-1. *Microbiology*, 155(Pt 2): 531-40,
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3, 39-48.
- Kailasapathy, K., Harmstorf, I. & Phillips, M. (2008). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* in stirred fruit yogurts. *Food Science and Technology*, 41, 1317-1322.
- Kasimoğlu, A., Göncüoğlu, M. & Akgün, S. (2004). Probiotic White Cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *International Dairy Journal*, 14, 1067-1073.
- Kheadr, E., Dabour, N., Le Lay, C., Lacroix, C. & Fliss, I. (2007). Antibiotic Susceptibility Profile of Bifidobacteria as Affected by Oxgall, Acid and Hydrogen Peroxide Stress. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 169-174.
- Klaver, F. A. M., Kingma, F. & Weerkamp, A. H. (1993). Growth and Survival of Bifidobacteria in Milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 47, 151-164.
- Kosikowski, F. V. & Mistry, V. V. (1997). Cheese and Fermented Milk Foods Vol. II, 3rd Edition. F.V. Kosikowski L.L.C., Connecticut, 330 p.
- Lapierre, L., Undeland, P. & Cox, L. J. (1992). Lithium Chloride-Sodium Propionate Agar for the Enumeration of Bifidobacteria in Fermented Dairy Products. *Journal of Dairy Science*, 75, 1192-1196.
- Lynch, C. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M. & Drinan, F. D. (1996). Manufacture of Cheddar Cheese with and without Adjunct Lactobacilli under Controlled Microbiological Conditions. *International Dairy Journal*, 6, 851-867.
- Mahaut, M., Jeantet, R. & Brulé, G. (2000). Initiation à la Technologie Fromagère. TEC & DOC Editions, Paris, 194 p.
- McBrearty, S., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., Wallace, J. M. & Stanton, C. (2001). Influence of Two Commercially Available Bifidobacteria Cultures on Cheddar Cheese Quality. *International Dairy Journal*, 11, 599-610.
- Morichi, T., Irie, R., Yano, N. & Kembo, H. (1967). Death of Freeze-Dried *Lactobacillus bulgaricus* During Rehydration. *Agricultural and Biological Chemistry*, 31, 137-141.
- Morin, P., Pouliot, Y. & Britten, M. (2008). Effect of Buttermilk Made from Cream with Different Heat Treatment Histories on Properties of Rennet Gels and Model Cheeses. *Journal of Dairy Sciences*, 91, 871-882.

- O'Riordan, K. & Fitzgerald, G. F. (1998). Evaluation of Bifidobacteria for the Production of Antimicrobial Compounds and Assessment of Performance in Cottage Cheese at Refrigeration Temperature. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 103-114.
- Ohr, L. (2006). Beyond Gut Health. *Food Technology*, 60, 63-66.
- Ong, L., Henriksson, A. & Shah, N. P. (2007). Proteolytic Pattern and Organic Acid Profiles of Probiotic Cheddar Cheese as Influenced by Probiotic Strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. *International Dairy Journal*, 17, 67-78.
- Özer, B., Uzun, Y. S. & Kirmaci, H. A. (2008). Effect of Microencapsulation on Viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 During Kasar Cheese Ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 61, 237-244.
- Prodanski, P. (1970). Procedure for Production of White Pickled Cheese with Low Cooking Salt Content or without Salt. *Nauchni Trudove*, 17, 29-35.
- Reid, G. (2008). Probiotics and prebiotics - Progress and challenges. *International Dairy Journal*, 18, 969-975.
- Salminen, R.S. & Isolauri E. (2009) Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy--a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *British Journal of Nutrition*. 101(11):1722-1726.
- Saxelin, M., Korpela, R. & Mayra-Makinen, A. (2003). Introduction: classifying functional dairy products. In T. Mattila-Sandholm & M. Saarela (Eds.) *Functional Dairy Products*. pp. 1-15). CRC Press / Woodhead Publishing Ltd, Boca Raton.
- Sharp, M. D., McMahon, D. J. & Broadbent, J. R. (2008). Comparative Evaluation of Yogurt and Low-Fat Cheddar Cheese as Delivery Media for Probiotic *Lactobacillus casei*. *Journal of Food Microbiology and Safety*, 73, 375-377.
- Songisepp, E., Kullisaar, T., Hütt, P., Elias, P., Brilene, T., Zilmer, M. & Mikelsaar, M. (2004). A New Probiotic Cheese with Antioxidative and Antimicrobial Activity. *Journal of Dairy Science*, 87, 2017-2023.
- Starling, S. (2009). Give (probiotic) cheese a chance, says probiotic big cheese. *Food Navigator*. USA. www.foodnavigator-usa.com/content/view/print/237113
- Statistiques Canada, 2007. Statistiques Laitières : Troisième trimestre 2007. Catalogue 23-014-X.
http://www.statcan.ca/francais/freepub/23014XIF/2007002/technote5_f.htm
- Talwalkar, A. & Kailasapathy, K. (2004). A Review of Oxygen Toxicity on Probiotic Yoghurts: Influence on the Survival of Probiotic Bacteria and Protective Techniques. *Complete Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 117-124.
- Turcot, S., St-Gelais, D. & Turgeon, S. L. (2002). Affinage de fromages allégés de type Cheddar fabriqués à partir de laits enrichis en phospholipides. *Lait*, 82, 209-223.
- Wagar, L.E., Champagne, C.P., Buckley, N.D. , Raymond, Y. & Green-Johnson J.M. (2009) Immunomodulatory properties of fermented soy and dairy milks prepared with lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*. 74(8), M423-430.

Chapitre 4

Article 2

Viability of *Bifidobacterium longum* in Cheddar Cheese Curd during Manufacture and Storage: Effect of Microencapsulation and Point of Inoculation

Marie-Hélène Fortin^{1,2}, Claude P. Champagne^{1,3,4,*}, Daniel St-Gelais^{1,3,4},
Michel Britten^{1,3,4}, Patrick Fustier¹, Monique Lacroix^{2,3,4}

¹ Food Research and Development Center, Agriculture and Agri-Food Canada, 3600 boul. Casavant Ouest, St. Hyacinthe Qc, Canada, J2S 8E2

² Research Laboratories in Sciences Applied to Food, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval (Qc), Canada H7V 1B7

³ Member of STELA dairy research center, Université Laval, Département des sciences des aliments et de nutrition, Pavillon Paul-Comtois, Québec, Canada, G1K 7P4

⁴ Member of the Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), Université Laval, Pavillon des Services, 2440 boul. Hochelaga, Québec, Canada, G1V 0A6

*Corresponding author : claudio.champagne@agr.gc.ca

Tel : 450-768-3238 Fax : 450-773-8461

Référence :

Fortin, M.-H., Champagne, C. P., St-Gelais, D., Britten, M., Fustier, P., Lacroix, M. 2011. Viability of *Bifidobacterium longum* in Cheddar Cheese Curd during Manufacture and Storage: Effect of Microencapsulation and Point of Inoculation. *Dairy Science & Technology* 91. p.599-614.

1. Contribution des auteurs

J'ai réalisé les expérimentations, compilé et analysé les résultats, préparé les tableaux de présentation des résultats, effectué les analyses statistiques, effectué une revue de littérature et rédigé l'article scientifique en anglais. De plus, j'ai supervisé une stagiaire qui m'a assistée lors des fabrications fromagères et des différents tests de dénombrement et tests biochimiques. Dr Champagne est mon codirecteur de recherches. Il a participé à l'élaboration du projet, au développement des hypothèses grâce à son expertise sur la microencapsulation et sur l'ajout de bactéries probiotiques dans les aliments et a participé activement à la rédaction de l'article et à l'analyse des résultats. Dr St-Gelais a contribué à l'analyse des résultats grâce à son expertise en fromagerie et a participé activement aux discussions concernant le projet et à la correction de l'article. Dr Britten est coordonnateur du projet à Agriculture et Agroalimentaire Canada et a participé aux discussions concernant le projet et à la correction de l'article par son expertise dans le domaine de la transformation laitière. Dr Fustier est membre de l'équipe et a contribué au projet en participant aux discussions et en corrigeant l'article. Dr Lacroix est ma directrice de recherche et la coordonnatrice du projet. Elle a contribué au projet par son expertise en sciences alimentaires, a supervisé les discussions scientifiques entourant ce projet et elle a révisé le manuscrit.

2. Résumés

2.1 Résumé en français

L'objectif de cette étude était de démontrer l'effet de différentes méthodes d'inoculation de bactéries probiotiques au cours de la fabrication de fromage cheddar sur la viabilité des cellules dans le produit frais, ainsi que la stabilité au cours de l'entreposage. La souche *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 a été lyophilisée et microencapsulée par spray-coating. L'inoculation des cellules libres et de la culture microencapsulée a été testée à trois différentes étapes de la fabrication fromagère (lait avant emprésurage, à la cheddarisation ou au salage) et l'effet de ce moment d'inoculation sur les décomptes viables dans le fromage et le lactosérum a été suivi. Il n'y avait pas d'effet de la microencapsulation sur les décomptes viables dans le fromage au cours de la fabrication ou durant un entreposage de 14 jours, ni sur les propriétés chimiques (lactose, acide lactique, azote total, azote soluble dans le TCA, humidité) et sensorielles du fromage. Lorsque l'on compare l'inoculation des bifidobactéries dans le lait avant emprésurage, à la cheddarisation et au salage, les meilleurs taux de viabilité sont retrouvés pour les essais avec inoculation dans le lait. Les bifidobactéries ajoutées à l'étape du salage ayant survécu au pressage étaient subséquemment plus stables au cours de l'entreposage que celles ajoutées dans le lait. La stabilité de *B. longum* 15708 durant l'entreposage s'est avérée plus élevée dans le fromage pressé en bloc, plutôt que dans les grains. Cette étude a démontré aux producteurs de fromage, avec des données technologiques, les meilleures conditions d'inoculation de probiotiques pour ajout à du fromage et qu'il est préférable de faire le pressage des grains, afin d'obtenir de plus hauts taux de probiotiques viables dans le cheddar frais.

2.2 Abstract

The goal of this study was to assess the effect of methods of inoculation on the viability of probiotic bacteria during cheddar cheese manufacture as well as their stability during storage. *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 was freeze-dried and microencapsulated by spray-coating. The effect of inoculation of free whole cell or microencapsulated cells at three points during manufacture (milk before renneting, at cheddaring or at salting) on the viable counts in cheese and whey was investigated. Microencapsulation had no effect on viable counts, chemical parameters (lactose, lactic acid, total nitrogen, nitrogen soluble in TCA, moisture) or sensory properties during manufacturing or storage of the fresh cheeses for 14 days. Inoculation of the bifidobacteria in milk before renneting resulted in higher viable counts in comparison to other points of inoculation. Bifidobacteria added at the salting step, which survived pressing, were subsequently more stable during storage than those inoculated in milk. The stability of *B. longum* 15708 during storage was greater in the pressed cheeses than in the free curds. The results of this study provides technological data for cheese makers on the optimum point of inoculation as well as the benefit of pressing the curds in order to ensure high levels of probiotics in fresh cheddar cheese.

1. Introduction

The market for products containing probiotic bacteria is in expansion throughout the world principally because of the growing number of clinical studies concluding that these microorganisms may be linked to beneficial health effects (Ouwehand *et al.*, 2003). There is a growing consumer interest for functional foods enriched with these bacteria, in preference to powder supplements or pills (Bruhn *et al.*, 2002). Although yoghurt has been the main food matrix to which probiotics have been incorporated, cheese is increasingly considered as a valuable delivery vehicle (Gomes da Cruz *et al.*, 2009).

Cheddar cheese is most commonly consumed in the form of pressed blocks of ripened cheese. A niche market in Canada is non-pressed salted cheddar curds obtained after milling. Immediately after manufacturing, these curds are placed in bags and shipped to retailing points, which are allowed to place the product on the shelf at room temperature for 24 h. Subsequently, the cheese curds must be refrigerated. This type of product is typically consumed within 1 week. In some cases, the curds are pressed and also sold immediately under the same conditions. It was our hypothesis that such a fresh product would constitute a good matrix for highly sensitive probiotic bacteria which otherwise lose viability during the ripening period of cheddar. This hypothesis constitutes the rationale for the manufacturing and storage conditions used in this study as well as for the selection of a highly sensitive probiotic strain.

In cheddar cheese, many studies report severe declines in viable counts of probiotics during storage (Godward and Kailasapathy, 2003; Lynch *et al.*, 1996; Sharp *et al.*, 2008), but some studies report more successful results (Daigle *et al.*, 1999; Stanton *et al.*, 1998). Viability losses seem to be mostly related to the probiotic strain (McBrearty *et al.*, 2001; Ong *et al.*, 2007). In the past, manufacturers used to select probiotic cultures which were stable in their particular product. However, strain selection is increasingly based on purported health

benefits, and a desired culture might show viability problems during manufacture and storage. Thus, there is still a need to develop technological strategies to protect probiotic bacteria in cheddar cheese.

Technologies can be adapted to prevent viability losses of probiotic bacteria in foods. In yoghurt, such adaptations include carrying out lactose hydrolysis, modifying the starter strains and inoculation levels, adding antioxidants, packaging in anaerobic environments and microencapsulating the probiotic cultures (Champagne *et al.*, 2005; Stanton *et al.*, 2005). Much less has been done in this area in cheese, but selection of compatible starter, probiotic inoculation practices, microencapsulation and packaging (Gomes da Cruz *et al.*, 2009) have been proposed. In most studies, only one treatment has been applied at a time, and little data are available on combined treatments. There is a need to examine interactions between technological adaptations on the survival of probiotics in cheese. In this study, it was hypothesized that targeting a fresh cheese, using a novel microencapsulation technology and carrying out novel inoculation points, would provide such technological tools. Furthermore, the combined effects of microencapsulation and inoculation practices were examined.

Microencapsulation has been suggested as a potential solution to losses in viability due to salting or extended storage (Gomes da Cruz *et al.*, 2009). In most cases, the microencapsulation technology was based on microentrapment in gel particles, particularly alginate. Contrary to yoghurt, microencapsulation of probiotics in alginate beads does not seem to improve their stability during cheese storage or ripening (Gobbetti *et al.*, 1998; Godward and Kailasapathy, 2003). Although microencapsulation by spray-coating is the main technology used by the industry, only one study has examined the benefits of this microencapsulation methodology on bacterial stability during storage. There is no data on the benefits of microencapsulation by spray-coating on stability of probiotics during cheese processing or on cell retention in the curds.

Inoculation practices are an important means of adapting a milk fermentation process to enhance probiotic survival. Most data on the benefits of inoculation strategies are found in yoghurt manufacture, and little is known in cheesemaking. In cottage cheese, it was suggested to add the probiotic culture in the cream dressing rather than in the curds (Blanchette *et al.*, 1996). Other studies have examined inoculation at the cheddaring step or at salting (Dinakar and Mistry, 1994; Fortin *et al.*, 2011; Gomes da Cruz *et al.*, 2009). With free cells, these inoculation practices raise the concern of cell losses in whey. However, no study has examined the effect of microencapsulation by spray-coating on cell recovery and stability in the cheese curds under various inoculation procedures.

The goal of this study was to examine the combined effects of microencapsulation of *Bifidobacterium longum* by spray-coating and the processing step chosen for inoculation on the viable counts of the bifidobacteria in cheddar cheese curds during production and storage. The effects of these technological adaptations on cheese composition and sensory properties were also examined.

2. Materials and Methods

2.1 Cultures

B. longum ATCC 15708 was purchased from the American Type Culture Collection. Stock cultures were obtained by mixing MRS-grown (Difco, Detroit MI, USA) cell suspensions with sterile BHI media (Difco) containing 15% (w/v) of glycerol (Sigma, St-Louis, MO, USA) in a 1:5 ratio, adding 1 mL of the cell suspension in Cryovials (Nalgene, Rochester, NY, USA) and freezing at -80°C .

The starter used for pilot-scale cheese manufacture was prepared by inoculating 0.2% (w/w) of a thawed commercial culture of lactic acid bacteria (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* and *L. lactis* ssp. *lactis* H-102 from CH-Hansen,

Milwaukee, WI, USA) into rehydrated skim milk (12% w/w), previously sterilized at 110°C for 10 min. The culture was incubated to 21°C for 15 h and used within 2 h after this incubation time.

2.2 Production of freeze-dried and microencapsulated probiotic cultures

B. longum was grown in MRS broth (Becton, Dickinson and Company, France) supplemented with 1% (v/v) of a sterile solution of 10% (w/v) ascorbic acid (Bioshop Canada Inc., Burlington, ON, Canada) and 5% (w/v) L-cysteine hydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The culture was concentrated by centrifugation at 6000 × g for 20 min at 4°C. The cell pellet was resuspended in one tenth of its original volume in a cryoprotective medium composed of 20% (w/w) rehydrated skim milk powder (Agropur, Granby, Canada) and 5% (w/v) of sucrose to which 2% (v/v) of an ascorbic acid solution (17.5% w/v) was added. The cell suspension was poured in metal trays and frozen at -20°C for 18 h. Trays were placed in a freeze-dryer (FTS Systems, Stone Ridge, N.Y., USA) to lyophilise under the following programme: -40°C for 4 h under atmospheric pressure, 16 h at 0°C and 100 mTorr vacuum, 16 h at 20°C and 100 mTorr vacuum, 60 h at 20°C and 10 mTorr vacuum. The powder was grinded using a Ultra Centrifugal Mill ZM-1 unit (Retsch Inc. Newtown, PA, US) equipped with a sieve size of 1 mm and then filtered in stainless steel mesh (W.S. Tyler Canada Ltd, St. Catharines, Ontario, Canada) to only retain the particles sizes varying between 53 and 250 µm. The powders were subsequently placed in hermetic glass bottles and kept at 4°C. The final powder had a concentration of 2.2×10^9 CFU·g⁻¹ and this product was referred to as the “free-cell culture”.

Microencapsulation was carried out by spray-coating as described by Durand and Panes (Durand *et al.*, 2003) in a STREA-1 fluid bed system (GEA, Columbia, MD, USA) equipped with a bottom-coating Würster vessel assembly. The air used for fluidization was previously dried (relative humidity of

approximately 5%) and injected at room temperature. The spraying air was injected at a velocity of $30 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. The fat used for coating was the DP108 blend of fractionated palm kernel oil and palm oil from Aarhus United (Port Newark, NJ, USA). The fat was heated at 80°C and distributed at $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ over 400 g of the free-cell culture. In all, 160 g of fat was sprayed over the 400 g of powder. The resulting spray-coated product of *B. longum* ATCC 15708 will be referred to as the “ME culture”. The viable count was of $1.1 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$. This was half the bacterial density of the free-cell culture (per g of powder) because of the addition of fat and because a small loss of viability occurred during the spray-coating process. As a result, a greater quantity of ME culture powder was required to carry out the same CFU inoculation level as the free cell culture.

2.3 Cheese production

Cheese vats having a 270-L capacity equipped with double-wall, adjustable outlet and stirrer blades (Kusel Equipment Co., Watertown, WIS, USA) were used. Raw milk was provided by Agropur (Granby, Qc, Canada). On each production day, milk was pasteurized using a continuous flow plate exchanger at 73°C for 16 s.

The starter was inoculated at 1.5% (w/w). Addition of 0.026% (v/v) of a 30% (w/v) CaCl_2 solution and 0.01% (v/v) double force rennet Maxiren (Danisco, Copenhagen, Denmark) was done 1 h after starter addition. The coagulum was cut after 30 min and curds were cooked at 38°C until pH reached 6.0 to 6.1. After whey drainage, curds were piled in order to carry out the cheddaring step, until the pH dropped to 5.2 ± 0.1 . Finally, the cheese was cut in small pieces and salted at 1.8% (w/v) with iodine-free salt, which resulted in a salt-in-humidity level of 4.5%. Some free curds were kept separately, and the rest of the salted cheddar curds were then put in moulds and pressed under 0.205 MPa for 1 h. During cheese making, temperature, pH and titratable acidity were followed at defined intervals for ascertain reproducibility of the fermentation. The packaged blocks were then stored

at 4°C for up to 14 days. At days 1, 4, 7 and 14, bags were opened and 500 g portions were taken for chemical, microbiological or sensory analyses.

2.4 Incorporation of probiotics during cheese manufacturing

Since three cheese vats were available and since seven treatments were carried out, two series of productions were carried out. In the first series, the following treatments were done: vat nos. (1) inoculation of 20 g free cells in 150 L of milk (0.13%), just before rennet addition, (2) inoculation of 40 g ME cells in 150 L of milk (0.27%), before rennet addition, (3) no inoculation in milk nor at the cheddaring step; the unsalted curds obtained after milling were divided in three; at the salting step, one third was kept as control, one third was inoculated with 6.7 g of free cells and one third was inoculated with 13.4 g of the ME culture. In the second series of productions, the same pattern was carried out except that for vats #1 and #2, instead of inoculation in milk prior to rennet addition, the free (20 g) or ME (40 g) cultures were blended into the small grains obtained after the first whey drainage prior to cheddarization.

These inoculation levels were expected to result in curd viable counts around 10^6 CFU · g⁻¹, which is rather low since the laboratory-made culture obtained had only 2.2×10^9 CFU · g⁻¹. Such a viable count in a powder is much lower than commercial products, which typically have between 10^{10} and 10^{11} CFU · g⁻¹ of powder. In the attempt to duplicate industrial conditions, it was decided to add the quantity of culture powder that would apply under commercial conditions. Thus, the quantity of bifidobacteria-containing powder added at the various steps followed the quantities of freeze-dried powder that would currently be inoculated in industry. It was considered that the quantity of powder added would affect distribution properties in the curds as well as texture and that applying industrial parameters was critical to the value of the experimentation. Although

viable counts in cheese were lower than what would be expected or commercially recommended, it still enabled the evaluation of the hypotheses.

In each assay, the pasteurized milk was distributed in three cheese vats. In experimental treatments based on inoculation in milk or at cheddaring step, vats filled with 150 L of milk were inoculated with free cell or ME *B. longum*. For the treatment of addition at salting step, a vat was filled with 270 L of milk, and fabrication was followed normally without inoculation of bifidobacteria until salting step. Curds were salted all together and then divided in three equal masses: one third was inoculated with free bacteria, one third with ME bacteria and the other was not inoculated and represented the control treatment. Three independent repetitions were done using three separate culture batches and milk lots.

One of the aims of this study was to examine the effect of air on *B. longum* viability in products having free and ME cells. Thus, individual salted curds and pressed cheese blocks were analyzed separately, except for inoculation at the salting step where only blocks were analyzed. In this latter treatment, the decision was taken not to test curds, because powder particles might not adhere to the surface, and cells would be lost in the packaging.

The individual curds (portions of approximately 250 g) were kept in sealed plastic bags in an air atmosphere. They were placed at 23°C for 24 h and then stored at 4°C for up to 14 days. A portion of the curds was pressed in 10 kg blocks that were subsequently cut and vacuum-wrapped in 500 g portions and kept for 16 h at 23°C.

2.5 Analyses

Milk, curds and whey were analyzed for viable counts throughout cheese manufacturing as well as at days 1, 4, 7 and 14 of storage. For microbiological analyses, homogenization of the casein matrix was carried out by adding 4 g of

curds to 36 g of a 2% sodium citrate solution (Anachemia, Montreal, Canada) kept at 45°C and blending them with sterilized Polytron-type high-shear generator probes (OMNI TH International, Model TH-115, Marietta, GA, USA) for 30 s at high speed (20 000 rpm). When liquid samples were analyzed, 1 mL of milk or whey were mixed with 9 mL of sodium citrate solution and homogenized with Omni-Tips generator probes (Omni TH unit; Marietta GA, USA) at high speed for 30 s. For both liquid and solid samples, serial decimal dilutions were done in 0.1% peptone water tubes (w/v) (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada). Viable counts of *B. longum* were determined by plating on LP medium pH 6.7 since this medium was found to effectively select *B. longum* from lactic acid bacteria (Lapierre *et al.*, 1992). The LP medium contained, per L of medium: 35 g liver infusion, 10 g lactose, 10 g bacto-peptone, 2 g NaCl, 2 g LiCl and 3 g sodium propionate. The appropriateness of LP medium for selective counts of *B. longum* 15708 in whey and curds, in the presence of the cheese starter cultures, was confirmed in a previous study (Fortin *et al.*, 2011). Colonies of bifidobacteria were counted after a 48 h incubation period at 37°C in an anaerobic incubator (85% N₂ / 10% H₂ / 5% CO₂). Lactococci populations from the starter were obtained on M17 medium (Becton, Dickinson and Company, France) following 48 h incubation at 30°C under aerobic conditions.

Carbohydrates and organic acids of interest (acetic acid, lactic acid, glucose, lactose) were analyzed at days 1 and 14 by ion exchange HPLC (Dionex, Model DX-500; Oakville, ON, Canada), following the procedure of St-Gelais *et al.* (1991). Total protein and soluble nitrogen in trichloroacetic acid (TCA-SN) were analyzed at days 1, 7 and 14 with the Kjeldhal technique (Christensen *et al.*, 1991; Turcot *et al.*, 2002), using a Kjeltac 1030 distillation unit (Foss, Eden Prairie, MN, USA). For practical reasons, not all analyses could be done on day 1. Since cheeses were packaged in sealed bags, some parameters were not expected to change throughout the 14-day storage period. Thus, total lipid concentrations were analyzed at day 7 by the Mojonnier technique (Mojonnier Bros. Co., Chicago, IL, USA) (Atherthon *et al.*, 1977), salinity was ascertained at day 6 with a Chloride Analyzer 326 unit from

Corning (Nelson-Jameson Inc., Marshfield, WI, USA) and humidity was measured at day 6 by gravimetry following drying at 100°C for 24 h (Fortin *et al.*, 2011).

A sensory analysis was also carried with 20 panellists at the 4th day of storage. The sensory analysis was delayed a few days in order to carry out microbiological analyses (coliforms, *Staphylococcus aureus*) ensuring safety for the tasters. This was a requirement from the ethics committee. Tasters had to smell and taste pressed cheese only and compare it to the control cheese in order to monitor any difference in appearance (particles of ME cultures), texture, mouth-feel and flavour between the various pressed cheeses produced. Free curds were not tested by the sensory panel.

2.6 Calculations

On average, from 100 L of milk, we obtained 83 L of whey at the first drainage, 5 L of whey during cheddarization and 1 L of whey during pressing. Final cheese curd mass varied between 10 and 11 kg. The CFU were measured at every processing step, which enabled the estimation of total bacterial populations in the whey and curd products.

The following equations were used to evaluate cheese yield and bacterial balances.

Equation 1. Yields for cheese production:

$$[(\text{Pressed cheese final mass} + \text{Curds final mass}) \div (\text{Milk mass})] \times 100$$

Equation 2. Ratio of cells recovered to those inoculated (ratio R/I)

$$\frac{[(\text{g of final curd mass} \times \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}) + (\text{g of whey recovered} \times \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1})]}{\div [(\text{g of culture added} \times \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1})]}$$

Equation 3. Distribution of probiotics between curds and whey:

$$\frac{[(\text{Final curds mass}) \times (\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1} \text{ of probiotics in curds})]}{[(\text{Final curds mass}) \times (\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1} \text{ of probiotics in curds}) + ((\text{Total whey mass}) \times (\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1} \text{ of probiotics in whey}))]} \times 100$$

It must also be kept in mind that the distribution of cells between curds and whey (Equation 3) is only an indicator of a percentage or recovery in curds; indeed CFU values in whey and cheese at the end of processing are the result of cell recovery (or loss in whey) as well as potential growth or viability losses in each matrix.

2.7 Statistical analyses

Statistical analyses were done with InStat (GraphPad, La Jolla, CA) on Log10 values of viable counts. When comparing multiple treatments, the ANOVA test was carried out. In some instances where the specific effects of ME or pressing were examined, paired *t* test were used. Differences between means were considered significant when *P* value was lower or equal to 0.05.

3. Results and discussion

A preliminary study had been carried out on a laboratory scale (2 L) where inoculation points of probiotics in milk and at cheddaring had been compared (Fortin *et al.*, 2011). This study expanded the preliminary work by verifying the observations on a 100-fold larger scale, by including a microencapsulated culture, by adding the cells at salting and by examining the effect of curds pressing.

3.1 Effect of ME on viable counts during production

Spray-coating efficiency in delaying the release of probiotic cells was studied in a previous work (Champagne *et al.*, 2010), and its application to this

condition was first examined. This was carried out by evaluating the rates and levels of solids released in water after addition of the powder. Commercial powders of ME cultures obtained from spray-coating technology show ~50% of their non-fat solids released after 15 min dispersion, while the ME powders prepared in our lab released 85% of their non-fat solids (Champagne *et al.*, 2010). Therefore, the ME culture prepared in this study was not as well coated as that of commercial products. It is well known that spray-coating is a difficult technology to master and that the products are only partially microencapsulated. It was tested nevertheless since viability losses can reach four logs during storage (Fortin *et al.*, 2011) and partial ME could still have a significant benefit, especially since ME protects cells against oxygen (Talwalkar and Kailasapathy 2004), and *B. longum* 15708 is sensitive to oxygen (Bolduc *et al.*, 2006; Fortin *et al.*, 2011).

When ME cultures were incorporated into milk before renneting, greater CFU losses in whey were observed at most steps during the production cycle than with the free-cell cultures (Table 1). A greater loss of cells in whey would suggest that lower CFU values would be obtained in the curds ultimately resulting from milk inoculation with the ME culture. However, viable counts in curds were not significantly affected by the form of the probiotic inoculated (Table 1). This is explained by the observation that between 64% and 72% of the cells inoculated in milk are recovered in curds (Table 2). Consequently, the fraction that ends up in whey is only a minor portion of the cells added; as a result, the different cell losses in whey did not ultimately affect the viable counts in the curds. When the ME culture was inoculated in milk, it was observed that particles were floating at the surface of milk and oil at the surface of whey. This could partially explain the higher losses of the ME cells in whey. There was no further effect of ME on viable counts in whey or curds when the inoculation was carried out at cheddaring or at salting (Table 1).

Table 1 : Effect of microencapsulation (ME) and of the point of inoculation on viable counts of *B. longum* 15708 (Log CFU·mL⁻¹ or ·g⁻¹) during cheddar cheese production

Cheddar production step or sample	Point of inoculation					
	Milk		Cheddaring		Salting	
	Free cells	ME cells	Free cells	ME cells	Free cells	ME cells
Milk before renneting	5.3 ^a	5.2 ^a	-	-	-	-
Coagulum before cutting	5.1 ^a	5.9 ^a	-	-	-	-
Whey after cutting	4.8 ^a	6.2 ^b	-	-	-	-
Coagulum after 30 minutes cooking	5.6 ^a	5.8 ^a	-	-	-	-
Whey after 30 minutes cooking	4.9 ^a	5.3 ^a	-	-	-	-
Curds after drawing off whey	6.3 ^a	6.2 ^a	-	-	-	-
Whey draw off	4.7 ^a	5.4 ^b	-	-	-	-
Curds after inoculation of probiotics	-	-	5.6 ^a	5.6 ^a	-	-
Curds after 30 minutes cheddaring	6.3 ^a	6.6 ^a	5.9 ^a	5.6 ^a	-	-
Residual whey at cheddaring	3.9 ^a	4.0 ^a	6.6 ^b	6.2 ^b	-	-
Curds before salting	6.8 ^a	6.7 ^a	5.9 ^b	5.8 ^b	-	-
Salted curds	6.6 ^a	6.8 ^a	5.4 ^b	5.6 ^b	5.3 ^b	5.6 ^b
Residual whey after pressing	4.6 ^a	4.9 ^{ab}	4.7 ^{ab}	5.3 ^{bc}	5.7 ^c	5.9 ^c
Cheese after pressing	6.6 ^a	6.7 ^a	5.6 ^b	5.0 ^b	5.0 ^b	5.2 ^b

In a given row, values which are followed by the same letter are not significantly different ($P \geq 0.05$)

Irrespective of the distribution of the viable cells between curds and whey, calculations were made to examine the evolution of total bacterial populations during the processing steps. As the cells recovered to those inoculated (Ratio R/I) show, in many cases, there were lower CFU counts in whey and curds at the end of the cheddar manufacture than there were bifidobacteria cells inoculated (Table 2). This would suggest viability losses during production. There was no statistically significant effect of ME on the growth or mortality of the probiotic bacteria during cheddar manufacture ($P < 0.05$).

Table 2 : Effect of the point of inoculation on cell distribution and on the evolution of the ratio of *B. longum* 15708 cells recovered to those inoculated (Ratio R/I) during cheddar cheese production.

Production parameter		Viable counts	
Curds	Point of inoculation	Distribution (% of probiotics in curds) ¹	Ratio (R/I) ²
Pressed cheese	Milk	72 ^a	1.7 ^a
	Cheddaring	18 ^b	1.1 ^{ab}
	Salting	83 ^a	0.12 ^b
Free curds	Milk	64 ^a	1.4 ^a
	Cheddaring	12 ^b	0.98 ^{ab}

For a given column, means that are followed by the same letter are not significantly different ($P \geq 0.05$).

¹ Calculated with Equation 3

² Calculated with Equation 2.

3.2 Effect of point of inoculation on viable counts during cheddar manufacturing

When *B. longum* cultures were inoculated in milk, higher viable counts were obtained in cheese curds than when inoculation was carried out at cheddaring (Table 1). These data confirmed the results from a previous study (Fortin *et al.*, 2011).

In addition to the viability losses, which occurred immediately at the moment of inoculation, there might also be continued viability losses during the final processing steps. Indeed, when the probiotic bacteria were added in milk, there was an increase in curds CFU counts of about 0.2 log between the “30 min after cheddaring” and in the “salted curds” (Table 1). No such increase was noted when the bifidobacteria were added at cheddaring, and in fact, a 0.5 log decrease was even noted in one instance (free cells; Table 1). Since curds expel whey and contract during cheddaring, an increase in CFU would normally occur due to gel contraction. All these data point to a loss of viability of the cells inoculated at cheddaring during the final processing steps and particularly at salting (Table 1). The detrimental effect of salting on viability had already been observed (Fortin *et*

al., 2011), but this is the first observation on the effect of inoculation point on subsequent viability during processing. Apparently, the potential benefit of reducing exposure to oxygen by adding the cells at a later processing stage was outweighed by the detrimental effects of rehydration in more acidic and salty environments. The literature reports variable situations with respect to viable counts of bifidobacteria added during cheddar cheese making. In one instance, no growth was noted (Daigle *et al.*, 1999), as in this study, while in other instances, significant CFU increases occurred (Ong *et al.*, 2007). Evidently, this is strain-related, and the fact that we selected an oxygen-sensitive culture (Bolduc *et al.*, 2006; Fortin *et al.*, 2011) might explain our results.

Little information is available on the recovery level of probiotics in curds. The more cells are entrapped in the curd, the less is lost in the whey. Ong *et al.* (2007) observed differences between CFUs in whey and those in curds ranging from 0.6 and 4.6 log with an average of 1.8 log CFU. Data from this study tend towards a 2 log CFU difference (Table 1), which is therefore in line with the literature.

Data show that the highest proportion of cells in curds was observed when they were added at salting (Table 2). This would erroneously suggest that the best inoculation point for high cell recovery in curds is at salting. This is not the case. High losses in viability occur at this inoculation point as evidenced by the lowest R/I ratio (Table 2). The high % of viable cells in pressed curd is presumably due to the very small quantity of whey produced during pressing (about 1% of original milk volume) as well as higher loss of viability of the probiotic culture during rehydration in this salted and acid whey.

3.3 Viable counts during storage

Microencapsulation in alginate beads was shown to reduce viability losses due to oxygen in yoghurt (Talwalkar and Kailasapathy, 2004), and it was hoped that

ME by spray-coating would also reduce viability losses during storage by reducing the exposure to both acidity and oxygen. Paired *t* tests between comparative viability data during storage showed that there was no significant difference ($P = 0.08$) in viability patterns between products inoculated with free or ME cultures. This was in line with the data of Belvis *et al.*, (2006). The limited effect of ME might be due to the low encapsulation level of the product used in this study, which was estimated to be less than 10% (Champagne *et al.*, 2010). Further studies are required to determine the benefits of using encapsulated cultures similar to those currently marketed by industry, which have up to 50% coating efficiency.

In the province of Québec (Canada), a fraction of cheddar cheese is marketed as fresh curds. The cheese curds are packed in plastic bags and marketed fresh, instead of being pressed and sold in blocks. Viable counts of these two products during storage showed important viability losses of *B. longum* 15708 (Fig. 1). They were much higher when curds were not pressed into typical cheddar blocks but packaged in plastic bags as free curds; paired *t* tests showed this difference to be statistically significant ($P = 0.002$). A lower oxygen level is expected in pressed curds, which were subsequently packaged under vacuum than in the free curds packed in plastic bags. The probiotic strain used in the present study is sensitive to oxygen (Bolduc *et al.*, 2006; Fortin *et al.*, 2011), and it is presumed that exposure to oxygen was much lower in pressed cheese. In addition, the level of salt in moisture was higher in the free curds than in the corresponding pressed cheese ($P \leq 0.01$ for both inoculation points) (Table 3). It has been shown that the stability of this strain was lower in salted cheese than in unsalted curds (Fortin *et al.*, 2011). It must be kept in mind that the salt distribution in the cheese matrix varies initially. During the first hours following salting, it is high at the surface of the grains and it gradually decreases as the minerals diffuse towards the core. It could be argued that cells at the surface of the grains suffer a salt shock. It is unknown if the effect of salt on viability which was observed is linked to these initial differences in salt distribution throughout the food matrix.

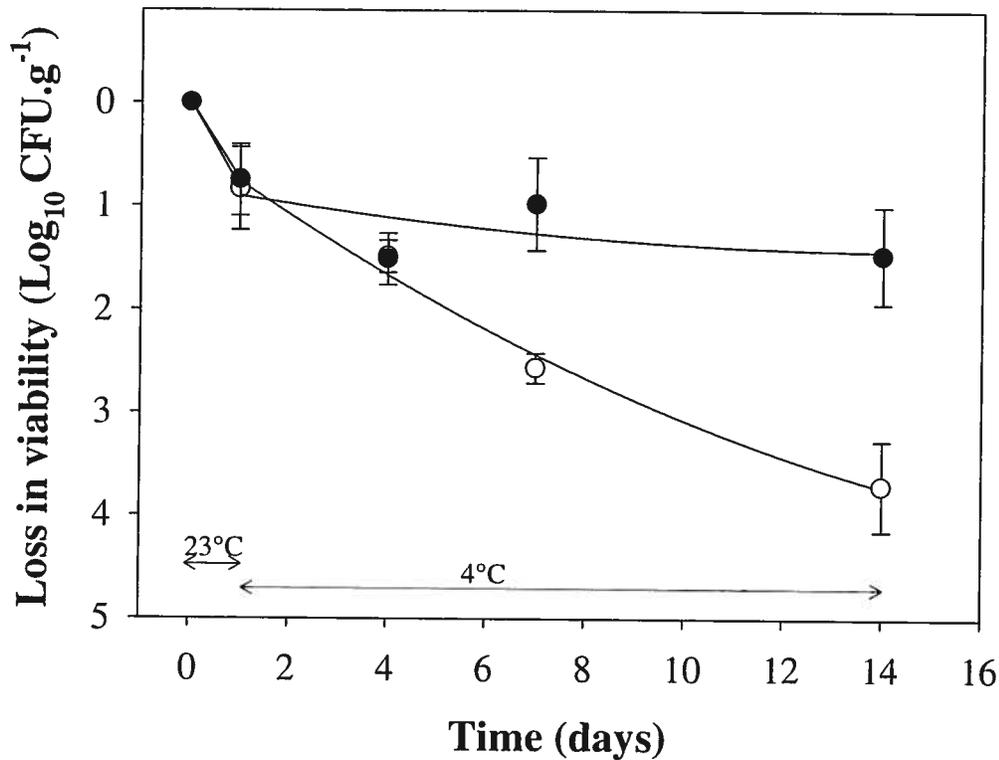


Figure 1. Effect of pressing of curds on the subsequent viability of *B. longum* 15708 during storage. (○) Free cheese curds; (●) Pressed cheese. Results obtained from free cell and ME cultures added to milk or during cheddarization were averaged. Error bars represent Standard Error of the Means (SEM).

The effect of the point of inoculation on subsequent stability during storage is not clear. A reduction of 0.4 log CFU · g⁻¹ during pressing was noted in products inoculated at salting while no such loss in viability was noted in cheeses inoculated in milk (Table 1). However, during storage, the products inoculated at salting were more stable than those inoculated in milk (Fig. 2), and paired *t* tests showed this difference was statistically significant ($P = 0.03$). A previous study had also shown that cells added at salting were stable during storage (Dinakar and Mistry, 1994), but no comparison with other points of inoculation had unfortunately been carried out. The cultures inoculated at the cheddaring step basically had the same pattern as

Table 3: Effect of the point of inoculation of *B. longum* 15708, the pressing of curds as well as storage time on some cheese chemical characteristics.

%	Day	Pressed cheese Control	Pressed cheese inoculated at			Free curds inoculated at	
			Milk	Cheddaring	Salting	Milk	Cheddaring
WSN/TN	1	8.0 ^a	7.9 ^a	7.4 ^a	7.4 ^a	9.2 ^a	8.1 ^a
	7	9.7 ^a	9.9 ^a	9.5 ^a	9.3 ^a	10.6 ^a	10.8 ^a
	14	12.7 ^a	12.4 ^a	11.5 ^a	12.4 ^a	13.7 ^a	14.0 ^a
TCA-SN/TN	1	4.6 ^a	4.5 ^a	4.1 ^a	4.1 ^a	4.7 ^a	4.3 ^a
	7	5.3 ^a	5.3 ^a	5.6 ^a	5.3 ^a	5.7 ^a	5.7 ^a
	14	6.4 ^a	6.0 ^a	6.7 ^a	6.5 ^a	6.2 ^a	6.8 ^a
TN	7	23.8 ^a	23.1 ^b	24.0 ^a	23.8 ^a	21.7 ^c	22.1 ^c
Moisture	6	37.9 ^a	38.8 ^a	37.4 ^a	38.2 ^a	42.0 ^b	41.4 ^b
Salt in moisture	6	4.0 ^a	3.6 ^a	3.9 ^a	4.1 ^{ab}	4.4 ^b	4.6 ^b
Total lipids	7	32.8 ^a	31.4 ^a	32.7 ^a	32.6 ^a	28.6 ^b	29.8 ^b
Lactose	1	0.46 ^a	0.38 ^a	0.41 ^a	0.40 ^a	0.45 ^a	0.43 ^a
	14	0.40 ^a	0.29 ^a	0.29 ^a	0.27 ^a	0.31 ^a	0.34 ^a
Lactic acid	1	0.99 ^a	1.05 ^a	1.07 ^a	1.00 ^a	0.98 ^a	0.99 ^a
	14	1.20 ^a	1.16 ^a	1.18 ^a	1.13 ^a	1.08 ^a	1.09 ^a

WSN: water-soluble nitrogen, TN: total nitrogen, TCA-SN: nitrogen soluble in trichloroacetic acid
 For a given row, means that are followed by the same letter are not significantly different ($P \geq 0.05$) using ANOVA. The average values presented are from the combined data of free and ME cultures.

those inoculated at salting (data not shown). Therefore, different patterns in viability losses were noted as a function of inoculation point and storage period. More data are needed to clarify these observations.

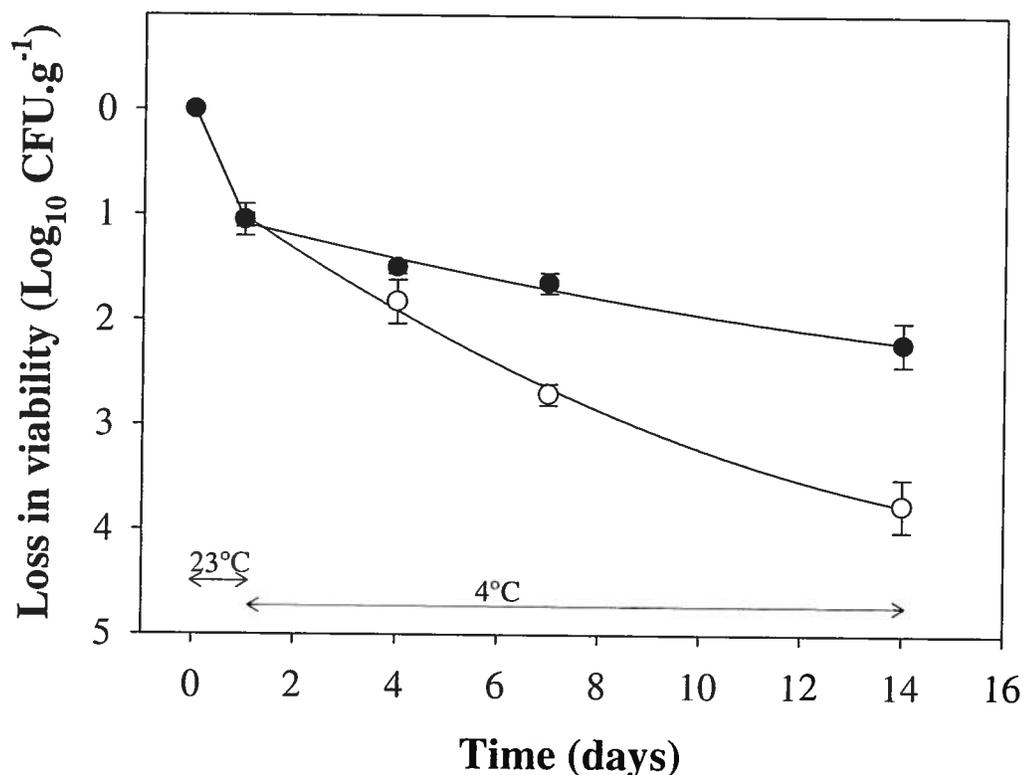


Figure 2. Effect of the point of inoculation of *B. longum* 15708 during manufacture on the culture's stability during cheese storage. (○) Inoculation in milk before renneting; (●) Inoculation at salting, prior to pressing. Data are the average of results obtained with free cell and ME cultures, as well as those from curds and pressed cheeses. Error bars represent Standard Error of the Means (SEM).

A common observation was the high loss of viability during the first day of storage (Figs. 1 and 2) likely due to the higher temperature (23°C). It has frequently been observed that refrigeration improves the stability of probiotics during storage (Champagne *et al.*, 2005). This distribution and marketing practice is carried out to obtain desirable texture and flavour of the curds. Clearly, however, the 24-h room temperature storage practice provides a challenge in maintaining probiotics

viability. Interestingly, other studies without this particular storage pattern also show initial viability losses, which are then followed by stabilization (Daigle *et al.*, 1999) or even growth (Ong *et al.*, 2007). Therefore, although the high storage temperature on day 1 might have accelerated the initial loss in viability of the bifidobacteria, high rates of viability losses during the first few days or weeks of ripening/storage seem to be a common occurrence in cheddar.

The fresh curds are typically consumed within 1 week, while the pressed cheese can be stored and marketed over many weeks. Whatever the product, fresh or pressed, this high initial viability loss limits the application of probiotics to cheese with such a strain. The Canadian Food Inspection Agency (2009) requires that one billion (10^9) viable cells per portion be present in the product when consumed in order to allow a general non-strain-specific claim. Even considering a cheese portion to be 50 g, none of the experimental conditions used in this study (ME, inoculation point) enabled reaching this population level. Therefore, strain selection, inoculation in milk and high inoculation level still appear to be the best methods of achieving high viable counts of probiotics in cheddar.

3.4 Effect of inoculation methods on the chemical composition of cheeses

Yields in cheese varied between 10.3 and 10.7 kg cheese per 100 L of milk, but these differences were not found to be statistically significant. Cheddar cheese productions typically give yields around 9.5% (Mahaut *et al.*, 2000). Since our humidity levels (~39%) were higher than those typically obtained for cheddar cheese undergoing ripening (~37%) (Mahaut *et al.*, 2000), these yield values were anticipated. There was a relationship between yields and moisture in cheese ($R = 0.6$). It must also be kept in mind that both curds and pressed cheese were used in calculating the overall yield in this study while the typical calculation is based on pressed cheese.

Cheese composition is presented in Table 3. Paired *t* tests showed that the cheeses produced with the ME culture did not significantly differ from those produced with free-cell cultures (data not shown). In all cheeses, glucose and acetic acid concentrations were below $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (data not shown). A high acetic acid level would have indicated fermentative activity by the bifidobacteria (Ong and Shah, 2009). However, since the population in probiotic cultures was only around one million cells per gram of cheese (Table 1), it was presumably insufficient to generate significant changes in the chemical composition.

Statistical analysis showed no significant effect of the point of inoculation of *B. longum* on the chemical parameters in both products tested: pressed cheese and free curds (Table 3). However, moisture and salt-in-moisture readings were significantly higher in the free curds than in the pressed cheese while the opposite was observed for TN and fat (Table 3). A higher moisture level in the free curds indicates higher whey content. As a result, higher levels of compounds mainly found in whey (soluble nitrogenous fractions, lactose and lactic acid) were expected to be detected in the free curds. When individually comparing all six treatments in the ANOVA analysis, the higher levels of lactose, lactic acid and soluble nitrogen in free curds were not found to be statistically significant from those in the pressed cheese (Table 3), but paired *t* tests did detect the difference. As a rule the higher WSN, TCA-SN, lactose and lactic acid values observed in free curds, as compared to pressed cheese, were in correlation with the curds' higher moisture content.

Chemical composition of the cheeses was altered during storage. Thus, an increase in lactic acid concentration during storage ($P < 0.05$) was accompanied by a decrease in lactose (Table 3). There were also increases in various soluble nitrogenous fractions during the 14-day storage period (Table 3) ($P < 0.05$) as previously reported for cheese ripening (Lacroix *et al.*, 2010). This is attributed to proteinase and peptidase activities of the mesophilic starter culture (Lane and Fox, 1997). The population in lactococci was around $10^9 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ of cheese, which was at least 100 times higher than that of the bifidobacteria. Therefore, the changes in

nitrogenous fractions, lactose and lactic acid were probably due to the action of the starter culture.

3.5 Sensory analyses

The panel did not find any significant difference in texture between any of the pressed cheese samples. This suggested that the addition of ME particles at a 0.27 g/L of milk did not influence sensory properties, whatever its addition time. This is noteworthy because the ME cultures average particle size was above 250 μm (Champagne *et al.*, 2010). The addition of alginate-encapsulated cultures with particle size above 100 μm was shown to affect sensory properties of ice cream (Sheu *et al.*, 1993), and it was a concern that cheese made with the ME culture would suffer the same defect. The low level of powder used during cheese making might explain the absence of defect. It should be kept in mind that such a low level of powder addition is typical of that encountered in industrial practice.

The addition of probiotics had no effect on flavour attributes of the pressed cheeses, which was in line with the absence of a significant effect on cheese composition (Table 3). This observation was expected because the concentration of probiotics inoculated was low. At such CFU levels, another study also showed that bifidobacteria do not influence the sensory properties of cheddar (Ong and Shah, 2009). It can then be concluded that addition of free or ME *B. longum* 15708 to cheese does not alter its sensory qualities, still keeping in mind that further experiments with higher bacterial concentrations need to be done.

4. Conclusion

This study confirmed various data in the literature with respect to the addition of probiotics to cheese: (1) the highest CFU levels in cheese curds were obtained when inoculation was carried out in milk rather than at the cheddaring step,

(2) when milk was inoculated with bifidobacteria before renneting, the viable cells recovered at the end of cheesemaking increased, suggesting that growth occurred during processing; however, the opposite was noted when inoculation was carried out at the cheddaring step and (3) salting of the cheddar curds is detrimental to the viability of bifidobacteria.

In addition, many new observations were made: (1) there were increased cell losses in whey when ME cultures of the bifidobacteria were added before renneting, (2) inoculation with probiotics at the salting stage resulted in lower CFU counts in pressed cheese than when they were added to milk prior to renneting, (3) ME did not affect cell recovery in curds, (4) the 1-day storage period at room temperature of fresh cheddar cheese is highly detrimental to the viability of *B. longum*, (5) viability losses during a 14-day storage were lower when the curds were pressed and vacuum-packed than when marketed as free curds in bags, (6) bifidobacteria added at the salting step which survived pressing were subsequently more stable during storage than those inoculated in milk and showed similar behaviour to bifidobacteria added at the cheddaring step, (7) addition of probiotics did not significantly affect pressed cheese composition, (8) addition of ME culture particles did not affect sensory properties of pressed cheese.

In the past, probiotic cultures were selected for their ability to survive in the food product. Today, strain selection is mostly based on demonstrated clinical effects. Data from this study show that the fresh cheddar cheese environment can be highly detrimental to probiotics viability, particularly during storage. As a result, CFU decreased more than 1 log, which arguably, is the limit for commercial acceptability. The point of inoculation is an important technological parameter to ensure recovery and stability of the cultures in cheese. However, for some strains, improvements in microencapsulation or additional technological means to prevent viability losses still need to be developed.

5. Acknowledgments

The scientific and technical expertise of Yves Raymond, Gaétan Bélanger, Sophie Turcot and Annie Caron is gratefully acknowledged. Special thanks are also expressed to Gabrielle Gagné for technical support. This research was supported by grants from the Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies, the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Novalait, Inc. as well as Agriculture and Agri-Food Canada. Marie-Hélène Fortin was also a recipient of an excellence grant from Commission Canadienne du Lait, Novalait Inc as well as a grant from the Fondation Armand Frappier.

6. References

- Atherthon HV, Newlander JA (1977) Test for Fat: Babcock, Gerber and Mojonnier, Chemistry and testing of dairy products. AVI, New York, pp 71–116.
- Belvis J, Tompkins T, Wallace T, Casavant L, Fortin C, Caron C (2006) Stability of probiotic bacteria in foodstuffs. CIFST Meeting, Montréal, May 30.
- Blanchette L, Roy D, Bélanger G, Gauthier SF (1996) Production of cottage cheese using dressing fermented by Bifidobacteria. *J Dairy Sci* 79:8–15.
- Bolduc MP, Raymond Y, Fustier P, Champagne CP, Vuilleumard JC (2006) Sensitivity of Bifidobacteria to oxygen and redox potential of non-fermented pasteurized milk. *Int Dairy J* 16:1038–1048.
- Bruhn CM, Bruhn JC, Cotter A, Garrett C, Klenk M, Powell C, Stanford G, Steinbring Y, West E (2002) Consumer attitudes toward use of probiotic cultures. *J Food Sci* 67:1969–1972.
- CFIA (Canadian Food Inspection Agency) (2009). Probiotic claims. <http://www.inspection.gc.ca/english/fssa/labeti/guide/ch8ae.shtml>, Chapter 8, Section 8.7.
- Champagne CP, Gardner N, Roy D (2005) Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45:61–84.
- Champagne CP, Raymond Y, Tompkins TA (2010) The determination of viable counts in probiotic cultures microencapsulated by spray-coating. *Food Microbiol* 24:1104–1111.
- Christensen TMIE, Bech A-M, Werner H (1991) Methods for crude fractionation (extraction and precipitation) of nitrogen components in cheese. *IDF Bulletin* 261:4–9.
- Daigle A, Roy D, Bélanger G, Vuilleumard JC (1999) Production of probiotic cheese (Cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. *J Dairy Sci* 82:1081–1091.
- Dinakar P, Mistry VV (1994) Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. *J Dairy Sci* 77:2854–2864.

- Durand H, Panes J Particles containing coated living micro-organisms, and method for producing same. Unites States Patent (2003) US 0109025 A1.
- Fortin M-H, Champagne CP, St-Gelais D, Britten M, Fustier P, Lacroix M (2011) Effect of inoculation moment, starter addition, oxygen level and salting on the viability of probiotic cultures during Cheddar cheese production. *Int Dairy J* 21:75–82.
- Gobbetti M, Corsetti A, Smacchi E, Zocchetti A, De Angelis M (1998) Production of Crescenza cheese by incorporation of Bifidobacteria. *J Dairy Sci* 81:37–47.
- Godward G, Kailasapathy K (2003) Viability and survival of free and encapsulated probiotic bacteria in cheddar cheese. *Milchwirst Forschung* 58:624–627.
- Gomes da Cruz A, Alonso Buriti FC, Batista de Souza CH, Fonseca Faria JA, Isay Saad MI (2009) Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends Food Sci Technol* 20:344–354.
- Lacroix N, St-Gelais D, Champagne CP, Fortin J, Vuillemard JC (2010) Characterization of aromatic properties of old-style cheese starters. *J Dairy Sci* 93:3427–3441.
- Lane CN, Fox PF (1997) Role of starter enzymes during ripening of Cheddar cheese made from pasteurized milk under controlled microbiological conditions. *Int Dairy J* 7:55–63.
- Lapierre L, Undeland P, Cox LJ (1992) Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *J Dairy Sci* 75:1192–1196.
- Lynch CM, McSweeney PLH, Fox PF, Cogan TM, Drinan FD (1996) Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *Int Dairy J* 6:851–867.
- Mahaut M, Jeantet R, Brulé G (2000) Initiation à la technologie fromagère. TEC and DOC Editions Paris. p 194.
- McBrearty S, Ross RP, Fitzgerald GF, Collins JK, Wallace JM, Stanton C (2001) Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on Cheddar cheese quality. *Int Dairy J* 11:599–610.
- Ong L, Shah NP (2009) Probiotic cheddar cheese: influence of ripening temperatures on proteolysis and sensory characteristics of Cheddar cheeses. *J Food Sci* 74:S182–S191.
- Ong L, Henriksson A, Shah NP (2007) Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. *Int Dairy J* 17:67–78.
- Ouwehand AC, Salvadori BB, Fonden R, Mogensen G, Salminen S, Sellars R (2003) Health effects of probiotics and culture-containing dairy products in humans. *International Dairy Federation (IDF)*, Brussels 380:4–19.
- Sharp MD, McMahon DJ, Broadbent JR (2008) Comparative evaluation of yogurt and low-fat Cheddar cheese as delivery media for probiotic *Lactobacillus casei*. *J Food Microbiol Safety* 73:375–377.
- Sheu TY, Marshall RT, Heymann H (1993) Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *J Dairy Sci* 76:1902–1907.

- St-Gelais D, Doyon G, Rolland JR, Goulet J (1991) Sugar and organic concentrations during ripening of Cheddar cheese-like Products. *Milchwissenschaft* 46:288–291.
- Stanton C, Gardiner G, Lynch PB, Collins JK, Fitzgerald G, Ross RP (1998) Probiotic cheese. *Int Dairy J* 8:491–496.
- Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF, Sinderen DV (2005) Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Cur Opin Biotechnol* 16:198–203.
- Talwalkar A, Kailasapathy K (2004) A Review of oxygen toxicity on probiotic yoghurts. *Reviews Food Sci Food Safety* 3:117–124.
- Turcot S, St-Gelais D, Turgeon SL (2002) Affinage de fromages allégés de type Cheddar fabriqués à partir de laits enrichis en phospholipides. *Lait* 82:209–223.

Chapitre 5

Discussion et conclusions
générales de toute l'expérimentation

Discussion générale

Cette étude avait pour objectif global de développer un protocole afin d'améliorer la viabilité et la rétention de bactéries probiotiques dans le fromage cheddar frais. Plusieurs stratégies technologiques ont été testées au courant de l'étude : l'ajout des bactéries à trois différents moments lors de la fabrication fromagère, la microencapsulation, le taux d'inoculation et l'entreposage des fromages sous deux formes différentes, soit les grains et les blocs. Un autre objectif de la recherche était de démontrer que la microencapsulation est une technique appropriée pour améliorer la viabilité de probiotiques sensibles à l'oxygène, lorsqu'ils sont ajoutés à une matrice fromagère. La recherche qui a été menée a bien répondu à ces objectifs, par l'entremise de différents moyens.

L'hypothèse 1 stipulait que « les probiotiques varient quant à leur sensibilité à l'oxygène et il sera possible de trouver une culture affectée par l'oxygène lors de la fabrication ». La première étape de la recherche était donc de dénicher une souche probiotique sensible à l'oxygène lors de la fabrication de fromage. Pour atteindre cet objectif, il s'avérait nécessaire de trouver une façon de simuler une fabrication fromagère sous atmosphère réduite en oxygène. De ce fait, un protocole de fabrication de fromage à l'échelle du laboratoire a été élaboré, basé sur d'autres études ayant utilisé des fabrications de fromage miniatures pour vérifier certaines hypothèses (Morin *et al.*, 2008). Le protocole respectait les différentes étapes de la fabrication de fromage cheddar, les températures et les temps de cuisson et d'incubation requis. Par contre, afin de s'assurer que la mortalité des bactéries serait bien attribuable à l'oxygène et non à un autre facteur, les fabrications de caillé ont été faites sans ajout de ferments lactiques pour éviter l'acidification du lait et sans ajout de sel. Ces essais de mini-fromagerie sont décrits dans le chapitre 3 et ont révélé que, pour *Bifidobacterium longum* 15708, les comptes microbiens dans les caillés étaient affectés positivement par une teneur réduite en oxygène. L'hypothèse 1 fut donc confirmée dans des essais réalisés en absence de ferments.

Des travaux supplémentaires à l'échelle laboratoire ont été réalisés en présence des ferments lactiques et avec salage afin de tester l'hypothèse 2 (l'ajout de ferments et le salage affecteront la viabilité des probiotiques). En effet, *B. longum* 15708 devait être en mesure de résister aux conditions acides et à la salinité du fromage, car la microencapsulation utilisée dans le cadre de cette étude visait la protection de l'oxygène et non de ces autres facteurs. Des essais de mini-fromagerie ont été faits avec la souche choisie, qui ont permis de démontrer la résistance du probiotique lors de la fabrication fromagère. *B. longum* ne croît pas beaucoup au cours de la fabrication, donc la présence des ferments lactiques n'a pas une grande influence sur elle. D'ailleurs, ce résultat était attendu, puisque l'espèce *B. longum* est réputée comme plus résistante à l'acidité que d'autres probiotiques (Lankaputhra et Shah, 1996). Par contre, la souche a présenté une importante sensibilité au sel. L'hypothèse 2 a donc été confirmée pour l'effet du salage, mais pas pour l'action négative de la fermentation lactique.

Ces essais se voulaient également des essais préliminaires afin d'observer les différences de viabilité et rétention des probiotiques lors de l'ajout dans le lait au départ et à la cheddarisation. En résumé, on peut tirer de cette expérience que *B. longum* a beaucoup de difficulté à survivre à de hauts taux dans le fromage. Une mortalité importante a été observée durant la fabrication fromagère et surtout au cours de l'entreposage. Malgré cela, différentes observations ont pu être faites au sujet du moment d'inoculation. Entre autres, il a été démontré que l'addition des probiotiques dans le lait semble plus efficace pour assurer une meilleure viabilité des cellules au cours de l'entreposage du fromage, en comparaison avec l'ajout des cellules à la cheddarisation. L'addition des cellules dans le lait permet également d'obtenir une meilleure rétention des probiotiques dans le caillé fromager. Ces conclusions semblent bonnes, puisque les mêmes observations ont été faites par l'équipe de Songisepp (2004), qui avait également testé les deux moments d'addition. Le résultat de meilleure rétention des cellules lors d'ajout dans le lait infirme par contre l'hypothèse 3. Même une inoculation des cellules à plus forte concentration dans le caillé avant la cheddarisation ($2,7 \times 10^7$ UFC/g ou

$2,7 \times 10^8$ UFC/g) n'a pas permis une distribution différente des probiotiques entre le caillé et le lactosérum ni de différence de taux de viabilité.

Suite à ces expérimentations, la microencapsulation de *B. longum* 15708 s'est avérée une avenue intéressante pour protéger la souche lors de la fabrication fromagère. Il fallait donc développer une technique de microencapsulation simple et efficace qui pourrait être utilisée en industrie alimentaire. La technique choisie a été le spray-coating par enrobage avec un polymère de gras, un protocole basé sur la méthode utilisée par Durand et Panes (2003). Pour réaliser la technique d'encapsulation, les probiotiques à encapsuler devaient être sous forme lyophilisée. De ce fait, une grande quantité de culture liquide du probiotique a été produite et réduite en poudre par un procédé de lyophilisation décrit dans le chapitre 4. Une grande quantité de lyophilisat de *B. longum* devait être obtenue afin d'avoir suffisamment de culture pour tous les essais de fromagerie sous forme libre et encapsulée. En effet, il a été décidé d'utiliser un seul lot de lyophilisat de bactéries libres et de bactéries microencapsulées afin de réduire la variabilité entre les essais. La procédure pour la microencapsulation est également décrite dans le chapitre 4.

Une fois les cultures de probiotiques prêtes, nous avons pu passer aux fabrications fromagères. Ces fabrications avaient plusieurs objectifs principaux. Nous voulions en fait démontrer que plusieurs stratégies technologiques peuvent être utilisées afin d'améliorer la viabilité d'une bactérie probiotique sensible aux conditions retrouvées dans le fromage comme *B. longum* 15708. Notre hypothèse 4 était que la microencapsulation permettrait d'augmenter la viabilité du probiotique au cours de la fabrication fromagère et de l'entreposage du fromage. Il était également attendu que la microencapsulation permettrait d'améliorer le taux de rétention des probiotiques dans la matrice fromagère.

De plus, trois moments pour l'addition des cellules ont également été testés pour l'inoculation au cours de la fabrication de fromage. L'hypothèse 5 au départ était qu'un ajout plus tardif des bactéries permettrait d'améliorer la viabilité et la

rétenion des probiotiques dans le fromage. Les essais préliminaires ont toutefois démontré que l'ajout dans le lait semblait plus approprié pour l'amélioration de ces facteurs. Comme il s'agissait d'essais préliminaires, réalisés à l'échelle laboratoire, il était nécessaire de répéter les conditions de cette stratégie technologique lors de fabrications de fromage en usine pilote. De plus, un autre moment d'addition a été testé, soit l'ajout lors du salage des grains. Les essais de mini-fromagerie ayant démontré que *B. longum* 15708 est sensible au sel, il était probable qu'il ne s'agirait pas du moment d'addition le plus approprié pour assurer une meilleure viabilité des cellules libres, mais l'effet de ce moment d'addition dans le cas des cellules microencapsulées pouvait être prometteur. Les trois moments d'addition ont été testés et ont permis d'observer les différences de viabilité et de rétenion pour les cellules libres et les cellules microencapsulées. Il était attendu (hypothèse 3) que la rétenion des probiotiques encapsulés serait meilleure dans le fromage lors d'un ajout plus tardif au cours de la fabrication, puisque la perte dans le lactosérum serait moins importante.

Les résultats de l'étude préliminaire (rejet de l'hypothèse 3) ont pu être confirmés avec cette nouvelle série d'essais pilotes. En effet, les probiotiques qui ont été ajoutés dans le lait présentaient une meilleure viabilité et présentaient même une légère croissance au cours de la fabrication de fromage. De plus, le sel s'est encore avéré dommageable pour *B. longum*, plus que tout autre facteur dont la présence d'oxygène (confirmation de l'hypothèse 2). Ces résultats sont très intéressants puisqu'ils confirment l'hypothèse 9 à l'effet que le protocole de mini-fromagerie élaboré pour l'étude préliminaire fonctionne et permet d'obtenir des résultats semblables à la fromagerie traditionnelle pour l'étude de l'ajout des probiotiques au fromage.

Les résultats de ces essais démontrent également que la méthode de microencapsulation utilisée lors de cette recherche ne permet pas d'obtenir de meilleurs taux de rétenion des cellules dans le fromage. Il semble même y avoir une perte plus importante du probiotique dans le lactosérum lors de l'ajout dans le

lait dans le cas des cellules microencapsulées, ce qui infirme l'hypothèse 4. Par contre, les effets de la microencapsulation s'arrêtent avec ces constatations, puisque les autres effets se sont avérés non significatifs selon les tests statistiques.

Deux causes peuvent entrer en jeu pour ces résultats moins concluants. En fait, des tests de dissolution des cellules microencapsulées ont permis de démontrer qu'un taux de moins de 10% de ces bactéries est totalement encapsulé. La protection des cellules est donc moins grande et l'effet de la microencapsulation devient moins important. Ce problème était à prévoir, puisqu'il peut être assez difficile d'utiliser la technologie du spray-coating; même les poudres microencapsulées vendues commercialement n'ont qu'un pourcentage d'encapsulation complète d'environ 50% (Champagne *et al.*, 2010). On ne peut donc pas statuer définitivement sur le bénéfice de la microencapsulation pour protéger des cellules sensibles lors de la fabrication de fromage cheddar, puisque plusieurs autres technologies, polymères d'encapsulation ou même un autre lot de cellules auraient peut-être donné des résultats différents quant à la viabilité et rétention des probiotiques dans la matrice fromagère.

Concernant le moment d'addition des probiotiques, plusieurs conclusions ont pu être tirées. Tout d'abord, il semble y avoir une mortalité assez rapide de *B. longum* lors de l'inoculation au salage. En effet, on observe un déclin dans la population après le pressage du fromage. Cette différence s'est même avérée statistiquement significative en comparaison avec le fromage à l'étape du pressage dans lequel les probiotiques ont été ajoutés dans le lait, ce qui s'explique par la légère croissance observée pour la population de probiotiques de ces fromages. Par contre, les probiotiques ajoutés au salage sont très résistants lors de l'entreposage du fromage et survivent même en plus forte proportion que ceux des fromages où l'ajout a été fait dans le lait. Enfin, il a été démontré que l'effet de la réhydratation des probiotiques lyophilisés est très important sur la population de probiotiques. Il semble que la réhydratation d'un lyophilisat de *B. longum* en milieu acide et salé est très dommageable, puisqu'une forte proportion des cellules est perdue uniquement à

ce moment pour les trois moments d'addition testés. Ces résultats étaient attendus, puisqu'il est connu que la réhydratation et les conditions de réhydratation de cellules probiotiques lyophilisées peuvent grandement influencer la viabilité des cellules (Meng *et al.*, 2008). Ces résultats entraînent le rejet de l'hypothèse 5.

Pour tester l'hypothèse 6, des décomptes des probiotiques viables ont été réalisés sur une période de 14 jours d'entreposage des fromages en blocs et des fromages en grains pour tous les traitements. Les résultats ont démontré que le premier jour d'entreposage est très néfaste pour la population de *B. longum*. Effectivement, une forte proportion de la culture probiotique est perdue uniquement dans les premières 24 heures d'incubation, probablement à cause de la température élevée d'entreposage. Cette pratique est toutefois nécessaire à l'obtention de la texture désirée du produit, ce qui crée un défi pour la production de fromage enrichi de probiotiques. Il a également été observé que la viabilité de *B. longum* est meilleure sur une période de 14 jours pour les fromages en blocs gardés dans des paquets sous vide que pour les grains gardés dans des sacs sous atmosphère ambiante. Cette observation était attendue et confirme l'hypothèse 6, puisque la sensibilité de la souche à l'oxygène avait été démontrée lors de l'étude préliminaire (Fortin *et al.*, 2011a). De plus, le taux de sel/humidité est plus élevé dans le cas des grains, ce qui contribue certainement à la mortalité du probiotique.

Pour tester l'hypothèse 7, une série d'essais a été réalisée où l'inoculation au moment de la cheddarisation a été augmentée par un facteur de 10. Le taux d'inoculation n'affecte pas le pourcentage de distribution de ces bactéries entre le caillé et le lactosérum. De plus, le pourcentage d'inoculation des probiotiques n'affecte pas l'évolution des pertes de viabilité pendant le stockage. Aux densités inoculées (2.7×10^7 UFC/g ou 2.7×10^8 UFC/g), contrairement à certains produits lyophilisés, l'augmentation de la population de bactéries n'a pas affecté leur stabilité. L'hypothèse 7 ne s'est donc pas confirmée.

Le dernier objectif de la recherche (hypothèse 8) était de vérifier si l'ajout des probiotiques dans le fromage modifiait sa composition chimique ou ses qualités organoleptiques. En effet, il est possible que le probiotique libère certaines molécules indésirables dans le fromage (comme l'acide acétique) ou modifie la texture ou l'aspect du fromage, surtout dans le cas des cellules encapsulées qui pourraient être perceptibles vu leur important diamètre (Kailasapathy, 2006; Adhikari *et al.*, 2000). De ce fait, des prélèvements ont été faits à différents moments au cours de l'entreposage du fromage, afin de réaliser des tests sensoriels et biochimiques et ainsi déterminer les différences entre les fromages inoculés aux bactéries libres ou encapsulées et selon le moment d'addition. Le protocole suivi pour les analyses sensorielles a été basé sur la comparaison des fromages-test avec un témoin, dans le but de déterminer s'il y avait une différence. Les panellistes avaient à analyser deux attributs du fromage et déterminaient la différence remarquée avec le témoin en sélectionnant un choix sur une échelle hédonique de 6 points, allant d'aucune différence à une différence extrême (St-Gelais *et al.*, 2008; Ong *et al.*, 2007a).

Ces tests ont démontré que l'addition des probiotiques à environ 1 million de cellules par mL ne modifie pas les paramètres biochimiques du fromage ni ses qualités sensorielles. En effet, les effets étaient négligeables sur l'humidité, la salinité, les taux de matières grasses, de protéines et de différents sucres et acides importants. L'acide acétique n'a été retrouvé que sous forme de trace pour quelques essais seulement et les analyses sensorielles ne démontraient pas de différence statistique entre les fromages testés. En somme, l'addition de *B. longum* 15708 dans le fromage peut être faite sans crainte de modifier les caractéristiques du cheddar frais. L'ajout de la culture encapsulée n'a pas eu d'effet non plus. L'hypothèse 8 ne s'est donc pas confirmée. Ceci est potentiellement associé au taux d'inoculation utilisé.

Conclusions générales et perspectives futures

Cette recherche a su démontrer quelques-uns des défis reliés à l'ajout d'une souche probiotique à un aliment dans un but commercial. Dans notre cas, nous avons sélectionné une souche probiotique sensible à différentes conditions qui se retrouvaient dans l'aliment visé pour les essais. Les défis sont à ce moment encore plus importants, afin de réussir à maintenir une bonne viabilité des probiotiques. Les stratégies technologiques utilisées ont toutes permis des conclusions intéressantes quant à l'utilisation future dans l'industrie fromagère, mais n'ont pas permis d'améliorer suffisamment la viabilité de *B. longum* 15708 au cours de la production et de l'entreposage du fromage cheddar pour permettre l'utilisation commerciale de cette souche particulière. On peut donc conclure que le choix de la souche probiotique demeure très important pour les industries alimentaires, puisque la survie de cette souche dans l'aliment peut représenter un défi très important à relever.

Dans le cas de *B. longum* 15708 additionné dans le fromage cheddar, plusieurs avenues pourraient être étudiées pour permettre d'obtenir un apport suffisant de ce probiotique dans l'aliment. Tout d'abord, des méthodes différentes de microencapsulation pourraient être étudiées et des polymères d'encapsulation différents pourraient être utilisés. De petits changements à la méthode de spray-coating utilisée dans cette recherche pourraient également être faits afin d'obtenir une poudre microencapsulée présentant un plus fort pourcentage de cellules totalement enrobées. De nouveaux essais avec cette souche encapsulée plus efficacement permettraient peut-être d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. De plus, une double encapsulation pourrait être appliquée sur les cellules, ce qui augmenterait les chances d'obtenir des cellules totalement microencapsulées. Une encapsulation plus efficace pourrait potentiellement permettre une meilleure résistance de *B. longum* au sel et à la réhydratation. Une autre façon d'améliorer les rendements pourrait être d'inoculer les probiotiques sous une autre forme que lyophilisée. Cette technique est moins facilement

utilisable en industrie alimentaire, mais il s'agirait d'une façon d'améliorer la viabilité des cellules. À titre d'exemple, une culture pourrait être faite en milieu laitier ou avec la culture de ferments et ajoutée sous forme liquide dans le lait pour la fabrication de fromage, ce qui permettrait de réduire et même inhiber l'effet de la mortalité à la réhydratation. On pourrait également changer de type de fromage si aucune stratégie ne permettait d'obtenir des résultats concluants, ce qui permettrait de modifier les paramètres retrouvés au cours de l'entreposage et pourrait permettre une meilleure viabilité des probiotiques. À titre d'exemple, le camembert serait à explorer en raison de l'action potentielle des levures et moisissures sur le pH et la teneur en oxygène dans le caillé lors de l'affinage.

Bref, dans le domaine des aliments nutraceutiques enrichis de probiotiques, les défis sont importants, mais jamais irréalisables, puisque les possibilités pour améliorer les rendements sont presque infinies!

Références

- Abou Dawood, S.A.I. 2002. Survival of Nonencapsulated and Encapsulated *Bifidobacterium bifidum* in Probiotic Kareish Cheese. Egyptian Journal of Dairy Science 30, p.43-52.
- Adawi, D., Kasravi, F.B., Molin, G., Jeppsson, B. 1997. Effect of *Lactobacillus* Supplementation with and without Arginine on Liver Damage and Bacterial Translocation in an Acute Liver Injury Model. Hepatology 25, p.642-647.
- Adhikari, K., Mustapha, A., Grün, I.U., Fernando, L. 2000. Viability of Microencapsulated Bifidobacteria in Set Yoghurt during Refrigerated Storage. Journal of Dairy Science 83, p.1946-1951.
- Agerbaek, M., Gerdes, L.U., Richelsen, B. 1995. Hypocholesterolaemic Effect of a New Fermented Milk Product in Healthy Middle-Aged Men. European Journal of Clinical Nutrition 49, p.346-352.
- Anderson, J.W., Gilliland, S.E. 1999. Effect of Fermented Milk (Yogurt) Containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on Serum Cholesterol in Hypercholesterolemic Humans. Journal of the American College of Nutrition 18, p.43-50.
- Anderson, K.I., Salyers, A.A. 1989. Genetic Evidence that Outer Membrane Binding of Starch is Required for Starch Utilization by *Bacteroides thetaiotaomicron*. Journal of Bacteriology 171, p.3199-3204.
- Annan, N.T., Borza, A.D., Truelstrup Hansen, L. 2008. Encapsulation in Alginate-Coated Gelatin Microspheres Improves Survival of the Probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during Exposure to Simulated Gastro-Intestinal Conditions. Food Research International 41, p.184-193.
- Archi Exim Private Limited. 2011. Industrial Chemicals. (page consultée le 9 septembre 2011). <http://www.indiamart.com/archi-exim/chemicals.html>
- Armuzzi, A., Cremonini, F., Ojetti, V., Bartolozzi, F., Canducci, F., Candelli, M., Santarelli, L., Cammarota, G., De Lorenzo, A., Pola, P., Gasbarrini, G., Gasbarrini, A., 2001. Effect of *Lactobacillus* GG Supplementation on Antibiotic-Associated Gastrointestinal Side Effects During *Helicobacter pylori* Eradication Therapy : A Pilot Study. Digestion 63, p.1-7.
- Aso, Y., Akazan, H. 1992. Prophylactic Effect of a *Lactobacillus casei* Preparation on the Recurrence of Superficial Bladder Cancer. Urology International 49, p.125-129.
- Averous, L. 2007. Agro-Polymers and Starch-Based Biomaterials. (page consultée le 7 septembre 2011). <http://www.biodeg.net/biomaterial.html>

- Barakat, O.S., Sharaf, O.M., EL-Gizawy, S.A., Fathy, F.A., EL-Sayed, H.S. 2009. The Efficiency of Selected Microencapsulated Probiotics Strains on Safety and Shelf-Life of Domiati Cheese. 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture, p.793-804.
- Belvis, J., Tompkins, T.A., Wallace, T.A., Casavant, L., Fortin, C., Caron, C. 2006. Stability of Probiotic Bacteria in Foodstuffs. CIFST Meeting, Montreal, May 30th.
- Benita, S. 2006. Microencapsulation. Methods and Industrial Applications. 2nd Edition. Taylor and Francis Group, États-Unis, 753 p.
- Bergamini, C.V., Hynes, E.R., Quiberoni, A., Suárez, V.B., Zalazar, C.A. 2005. Probiotic Bacteria as Adjunct Starters : Influence of the Addition Methodology on their Survival in a Semi-Hard Argentinean Cheese. Food Research International 38, p.597-604.
- Bérubé, L. 1995. Le Fromage : Principes et Technologie. Notes de cours STA-19840, Université Laval. 591 p.
- Bhathena, J., Martoni, C., Kulamarva, A., Urbanska, A. M., Malhotra, M., Prakash, S. 2009. Orally Delivered Microencapsulated Live Probiotic Formulation Lowers Serum Lipids in Hypercholesterolemic Hamsters. Journal of Medicinal Food 12, p.310-319.
- Bhatia, S.J., Kochar, N., Abraham, P., Narr, N.G., Mehta, A.P. 1989. Lactobacillus *acidophilus* Inhibits Growth of *Campylobacter pylori* in vitro. Journal of Clinical Microbiology 27, p.2328-2330.
- Biavati, B., Mattarelli, P. 2001. The Family Bifidobacteriaceae. Dans: The Prokaryotes (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. and Stackebrandt, E., Eds.), Springer, New York, p.1-70.
- Bibiloni, R., Gomez, A., De Antoni, G. 2001. Enzyme-Based Most Probable Number Method for the Enumeration of *Bifidobacterium* in Dairy Products. Journal of Food Protection 64, No 12, p.2001-2006.
- Black, F., Andersen, P., Ørskov, J., Ørskov, F., Gaarslev, K., Laulund, S. 1989. Prophylactic Efficacy of Lactobacilli on Traveller's Diarrhea. Travel Medicine 8, p.1750-1753.
- Blanchette, L., Roy, D., Bélanger, G., Gauthier, S. F. 1996. Production of Cottage Cheese Using Dressing Fermented by Bifidobacteria. Journal of Dairy Science 79, p.8-15.
- Bolduc, M.-P., Raymond, Y., Fustier, P., Champagne, C.P., Vuilleumard, J.-C. 2006. Sensitivity of Bifidobacteria to Oxygen and Redox Potential in Non-Fermented Pasteurized Milk. International Dairy Journal 16. p.1038-1048.
- Boyle, R.J., Robins-Browne, R.M., Tang, M.L.K. 2006. Probiotic Use in Clinical Practice: What are the Risks? American Journal of Clinical Nutrition 83, p.1256-1264.
- Braun, S.D., Olson, N.F. 1986. Microencapsulation of Cell-Free Extracts to Demonstrate the Feasibility of Heterogeneous Enzyme Systems and Cofactor Recycling for Development of Flavor in Cheese. Journal of Dairy Science 69, p.1202-1208.

Britton, G. 1992. Natural Food Colorants. *Carotenoids*. Blackie and Son Ltd. p.142-182.

Caescu, C., Vidal, O., Krzewinski, F., Artenie, V., Bouquelet, S. 2004. *Bifidobacterium longum* Requires a Fructokinase (Frk; ATP : D-Fructose 6-Phosphotransferase, EC 2.7.1.4) for Fructose Catabolism. *Journal of Bacteriology* 186, p.6515-6525.

Caric, M. 1994. Concentrated and Dried Dairy Products, VCH Publishers, États-Unis.

Cassone, M., Serra, P., Mondello, F., Girolamo, A., Scafetti, S., Pistella, E., Venditti, M. 2003. Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* Subtype *boulardii* Fungemia in Patients Neighboring those Treated with a Probiotic Preparation of the Organism. *Journal of Clinical Microbiology* 41, p.5340-5343.

Castagliuolo, I., Riegler, M.F., Valenick, L., Lamont, J.T., Pothoulakis, C. 1999. *Saccharomyces boulardii* Protease Inhibits the Effects of *Clostridium difficile* Toxins A and B in Human Colonic Mucosa. *Infection and Immunity* 67 (1), p.302-307.

CFIA (Canadian Food Inspection Agency). 2009. Probiotic Claims. (page consultée le 25 mars 2011). <http://www.inspection.gc.ca/english/fssa/labeti/guide/ch8ae.shtml>, Chapitre 8, Section 8.7.

Champagne, C.P., Gardner, N.J. 2005. Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, p.61-84.

Champagne, C.P., Kailasapathy, K. 2008. Encapsulation of Probiotics. Chapitre 14, Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals. Woodhead publishing in food science, technology and nutrition, Royaume-Uni, p.344-369.

Champagne, C.P., Morin, N., Couture, R., Gagnon, C., Jelen, P., Lacroix, C. 1992. The Potential of Immobilized Cell Technology to Produce Freeze-Dried, Phage-Protected Cultures of *Lactococcus lactis*. *Food Research International* 25, p.419-427.

Champagne, C.P., Raymond, Y., Tompkins, T.A. 2010. The Determination of Viable Counts in Probiotic Cultures Microencapsulated by Spray-coating. *Food Microbiology* 24, p.1104-1111.

Chan, E.S., Zhang, Z. 2005. Bioencapsulation by Compression Coating of Probiotic Bacteria for their Protection in an Acidic Medium. *Process Biochemistry* 40, p.3346-3351.

Chaplin, M. 2011. Gelatin. (page consultée le 9 septembre 2011). <http://www.btinternet.com/~martin.chaplin/hygel.html>

CHR Hansen, 2010. Probiotics for Dietary Supplements. (page consultée le 15 juillet 2010). <http://www.chr-hansen.com/index.php?id=2837>

Cochet, N. 2007. Additifs. Université de Technologie de Compiègne, France. (page consultée le 6 septembre 2011) <http://www.utc.fr/~cochet/BT10JPB/additifs4-1.pdf>

Coconnier, M.H., Lievin, V. 1997. Antibacterial Effect of the Adhering Human *Lactobacillus acidophilus* Strain LB. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 41, p.1046-1052.

Cogan, T.M., Beresford, T.P. 2002. Microbiology of Hard Cheese. Chapitre 11, Dairy Microbiology Handbook, Third Edition, Wiley-Interscience, États-Unis, p.515-560.

Corbo, M. R., Albenzio, M., De Angelis, M., Sevi, A., Gobetti, M. 2001. Microbiological and Biochemical Properties of Canestrato Pugliese Hard Cheese Supplemented with Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science* 84, p.551-561.

Côté, S. 2007. Probiotiques à toutes les Sauces. Protégez-Vous, p.19-22.

Cousin, F.J., Mater, D.D.G., Foligne, B. et Jan, G. 2010. Dairy Propionibacteria as Human Probiotics: A Review of Recent Evidence. *Dairy Science & Technology* 91, p.1-26.

Crittenden, R., Laitila, A., Forssell, P., Matto, J., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T. 2001. Adhesion of Bifidobacteria to Granular Starch and its Implications in Probiotic Technologies. *Applied Environmental Microbiology* 67, p.3469-3475.

Dambekodi, P. C., Gilliland, S. E. 1998. Incorporation of Cholesterol into the Cellular Membrane of *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Science* 81, p.1818-1824.

Darukaradhy, J. 2005. Enumeration and Survival Studies of Free and Encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in Cheddar Cheese. Thèse de University of Western Sydney, 152 p.

Darukaradhy, J., Phillips, M., Kailasapathy, K. 2006. Selective Enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., Starter Lactic Acid Bacteria and Non-Starter Lactic Acid Bacteria from Cheddar Cheese. *International Dairy Journal* 16, p.439-445.

Dave, R.I., Shah, N.P. 1996. Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science* 79, p.1529-1536.

Dave, R.I., Shah, N.P. 1997. Effect of Cysteine on the Viability of Yoghurt and Probiotic Bacteria in Yoghurts Made with Commercial Starter Cultures. *International Dairy Journal* 7, p.31-41.

De Kruif, C.G. 1997. Skim Milk Acidification. *Journal of Colloid and Interface Science* 185, p.19-25.

De Simone, C., Vesely, R., Negri, R., Bianchi Salvadori, B., Zanzoglu, S., Cilli, A., Lucci, L. 1987. Enhancement of Immune Response of Murine Peyer's Patches by a Diet Supplemented with Yogurt. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 9, p.87-100.

De Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., Schrezenmeir, J. 2001. Probiotics – Compensation for Lactase Insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, p.421-429.

Deguchi Y., Morishita T., Mutai M. 1985. Comparatives Studies on the Synthesis of Watersoluble Vitamins among Human Species of Bifidobacteria. *Agricultural and Biological Chemistry* 49, p.3-19.

- Dinakar, P., Mistry, V.V. 1994. Growth and Viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science* 77, p.2854-2864.
- Ding, W.K., Shah, N.P. 2008. Survival of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria in Orange and Apple Juices. *International Food Research Journal* 15, p.219-232.
- Doleyres, Y. 2003. Production en Continu de Ferments Lactiques Probiotiques par la Technologie des Cellules Immobilisées. Thèse de doctorat, Université Laval, sous la direction de Dr Christophe Lacroix. (page consultée le 24 janvier 2008). <http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/files/c39134f7-6d0f-46af-825a-c3c64501fbc/20742.html>
- Donaghy, J. A., Totton, N. L., Rowe, M. T. 2004. Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during Manufacture and Ripening of Cheddar Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 70, No. 8, p. 4899-4905.
- Donnet-Hughes, F.R., Errant, P.S., Aeschlimann, J.M., Schiffrin, E. 1999. Modulation of Nonspecific Mechanisms of Defense by Lactic Acid Bacteria: Effective Dose. *Journal of Dairy Science* 82, p.863-869.
- DSM Zhongken Biotechnology Co.,Ltd. 2010. The Structure of Gellan Gum. (page consultée le 8 septembre 2011). http://www.gellantech.com/english/jlj_fl.asp
- Durand H, Panes, J. 2003. Particles Containing Coated Living Micro-organisms, and Method for Producing Same. United States Patent, US 0109025 A1.
- Éditeur Officiel du Québec. 2009. Règlement sur les aliments. Loi sur les produits alimentaires. Québec, QC, R.Q. c. P-30, r.2. <http://www.canlii.org/fr/qc/legis/regl/rq-c-p-29-r1/derniere/rq-c-p-29-r1.html>
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to Yoghurt cultures and improving lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 8 (10), 1763. <http://www.efsa.europa.eu/cs/Satellite>.
- Eikmeier, H., Rehm, H.J. 1987. Stability of Calcium-Alginate during Citric Acid Production of Immobilized *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26, p.105-111.
- Eisberg, N. 2009. Encapsulation Technology Improves Probiotic Stability. *Nutraceuticals World, Research Highlights: Danisco A/S*. (page consultée le 14 juillet 2010) <http://nutraceuticalsworld.com/contents/view/9697>
- Ellenton, J.C. 1998. Cellular Morphology of Bifidobacteria and their Survival when Encapsulated in Calcium Alginate Beads. Mémoire de maîtrise, University of Guelph.
- Encyclopédie Britannica Online, 2008. Metchnikoff, Elie. (page consultée le 24 janvier 2008). <http://www.britannica.com/eb/art-12972/Elie-Metchnikoff>

- Essindustry. 2011. PVA Fiber Reinforcement for the Crack Prevention of Concrete/Mortar. (page consultée le 11 septembre 2011). <http://essindustry.com/gallery/read.php?pid=99548&uid=724658>
- Fan, W., Bohlmann, J.A., Trinkle, J.R., Steinke, J.D., Hwang, K., Henning, J.P. 2005. Chitosan and Method of Preparing Chitosan. (page consultée le 11 septembre 2011). <http://www.freepatentsonline.com/6972284.pdf>
- Ferreira Grosso, C.R., Fávaro-Trindade, C.S. 2004. Stability of Free and Immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in Acidified Milk and of Immobilized *B. lactis* in Yoghurt. *Brazilian Journal of Microbiology* 35, p.151-156.
- Field, S.Q. 2011. Pectin. (page consultée le 11 septembre 2011). <http://sci-toys.com/ingredients/pectin.html>
- Fortin, M.-H., Champagne, C. P., St-Gelais, D., Britten, M., Fustier, P., Lacroix, M. 2011a. Effect of Time of Inoculation, Starter Addition, Oxygen Level and Salting on the Viability of Probiotic Cultures during Cheddar Cheese Production. *International Dairy Journal* 21, p.75-82.
- Fortin, M.-H., Champagne, C. P., St-Gelais, D., Britten, M., Fustier, P., Lacroix, M. 2011b. Viability of *Bifidobacterium longum* in Cheddar Cheese Curd during Manufacture and Storage: Effect of Microencapsulation and Point of Inoculation. *Dairy Science & Technology* 91, p.599-614.
- Friend, B.A., Shahani, K.M. 1984. Nutritional and Therapeutic Aspects of Lactobacilli. *Journal of Applied Nutrition* 36, p.125-153.
- Furrie, E., Macfarlane, S., Kennedy, A., Cummings, J., Walsh, S., O'Neil, D., Macfarlane, G.T. 2004. Synbiotic Therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy I™) Initiates Resolution on Inflammation in Patients with Active Ulcerative Colitis. *Gut* 54, p.242-249.
- Gardiner, G. E., Bouchier, P., O'Sullivan, E., Kelly, J., Collins, J. K., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., Stanton, C. 2002a. A Spray-Dried Culture for Probiotic Cheddar Cheese Manufacture. *International Dairy Journal* 12, p.749-756.
- Gardiner, G., Ross, R. P., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Stanton, C. 1998. Development of a Probiotic Cheddar Cheese Containing Human-Derived *Lactobacillus paracasei* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 64, p. 2192-2199.
- Gardiner, G.E., Ross, R.P., Kelly, P.M., Stanton, C., Collins, J.K., Fitzgerald, G. 2002b. Microbiology of Therapeutic Milks. *Dairy Microbiology Handbook*. Third Edition. Ed. Robinson, R.K., Wiley-Interscience, Etats-Unis, p.431-478.
- Gardiner, G., Ross, R., Wallace, J.M., Scanlan, F.P., Jagers, P.P.J.M., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Stanton, C. 1999a. Influence of a Probiotic Adjunct Culture of *Enterococcus faecium* on the Quality of Cheddar Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, p.4907-4916.

- Gardiner, G., Stanton, C., Lynch, P.B., Collins, J.K., Fitzgerald, G. Ross, R.P. 1999b. Evaluation of Cheddar Cheese as a Food Carrier for Delivery of a Probiotic Strain to the Gastrointestinal Tract. *Journal of Dairy Science* 82, p.1379-1387.
- Garti, N., Benichou, A. 2004. Recent Developments in Double Emulsions for Food Applications. *Food Emulsions*. eds: Friberg, S.E., Larsson, K., Sjöblom, J. New York: Marcel Dekker, p.353-412.
- Gaudreau, H., Champagne, C.P., Jelen, P. 2005. The Use of Crude Cellular Extracts of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 to Stimulate Growth of a Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Culture in Milk. *Enzyme and Microbial Technology*, 36. p.83-90.
- Gibson G.R., Probert, H.M., van Loo, J.A.E., Rastall, R.A., Roberfroid, M.B. 2004. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Updating the Concept of Prebiotics. *Nutrition Research Reviews* 17, p.259-275.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *Journal of Nutrition* 125, p.1401-1412.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Smacchi, E., Zocchetti, A., De Angelis, M. 1998. Production of Crescenza Cheese by Incorporation of Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science* 81, p.37-47.
- Godward, G.N. 2000. Studies on Enhancing the Viability and Survival of Probiotic Bacteria in Dairy Foods through Strain Selection and Microencapsulation. Thèse de University of Western Sydney.
- Godward, G., Kailasapathy, K. 2003. Viability and Survival of Free and Encapsulated Probiotic Bacteria in Cheddar Cheese. *Milchwissenschaft* 58, p.624-627.
- Goktepe, I., Juneja, V.K., Ahmedna, M. 2006. Probiotics in Food Safety and Human Health. Taylor and Francis Group, États-Unis, 494 p.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. 1998. Development of Probiotic Cheese Manufactured from Goat Milk: Response Surface Analysis via Technological Manipulation. *Journal of Dairy Science* 81, p. 1492-1507.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., Klaver, F.A.M., Grande, H.J. 1995. Incorporation and Survival of *Bifidobacterium* sp. Strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* Strain Ki in a Cheese Product. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 49, p. 71-95.
- Gosselink, M.P., Schouten, W.R., Van Lieshout, L.M., Hop, W.C., Laman, J.D., Ruseler-Van Embden, J.G. 2004. Delay of the first Onset of Pouchitis by Oral Intake of the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Diseases of the Colon and Rectum* 47, p.876-884.
- Goulet, J., Wozniak, J. 2002. Probiotic Stability: a Multifaceted Reality. *Innovations in Food Technology*, February, p.14-16.
- Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M., Testoni, P.A. 2000. *Saccharomyces boulardii* in Maintenance Treatment of Crohn's Disease. *Digestive Diseases and Science* 45, p.1462-1464.

- Habermann, W., Zimmermann, K., Skarabis, H., Kunze, R., Rusch, V. 2002. Reduction of Acute Relapses in Patients with Chronic Recurrent Hypertrophic Sinusitis during Treatment with a Bacterial Immunostimulant (*Enterococcus faecalis* Bacteria of Human Origin – a Medical Probiotic). *Drug Research* 52, p.622-627.
- Hamilton-Miller, J.M., Shah, S., Winkler, J.T. 1999. Public Health Issues Arising from Microbiological and Labelling Quality of Foods and Supplements Containing Probiotic Microorganisms. *Public Health Nutrition* 2, p.223-229.
- Harbec, A. 2010. Lactic Acid Production from Agribusiness Waste Starch Fermentation with *Lactobacillus amylophilus* and its Cradle-to-Gate Life Cycle Assessment as a Precursor to Poly-L-Lactide. *Mémoire de l'Université de Montréal*, 189 p.
- Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. 2009. Microencapsulation of Probiotic Cells by Means of Rennet-Gelation of Milk Proteins. *Food Hydrocolloids* 23, No.7, p.1670-1677.
- Hennequin, C., Kauffmann-Lacroix, C., Jobert, A., Viard, J.P., Ricour, C., Jacquemin, J.L., Berche, P. 2000. Possible Role of Catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. *European Journal of Clinical Microbiology Infections and Diseases* 19, p.16-20.
- Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G.F., Lecointre, G., Nguyen, H.V., Gaillardin, C., Dujon, B. 2001. Microsatellite Typing as a New Tool for Identification of *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Journal of Clinical Microbiology* 39, p.551-559.
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M.R., Yarmand, M.S., Razavi, S.H. 2008. Effect of Microencapsulation and Resistant Starch on the Probiotic Survival and Sensory Properties of Synbiotic Ice Cream. *Food Chemistry* 111, No. 1, p.50-55.
- Hou, R.C., Lin M. Y., Wang, M. M. and Tzen, J. T., 2003. Increase of Viability of Entrapped Cells of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* in Artificial Sesame Oil Emulsions. *Journal of Dairy Science* 86, p.424-428.
- Hoyos, A.B. 1999. Reduced Incidence of Necrotising Enterocolitis Associated with Enteral Administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to Neonates in an Intensive Care Unit. *International Journal of Infectious Diseases* 3, p.197-202.
- Hunter, J., Lee A., King, T., Barratt, M., Linggood, M., Blades, J. 1996. *Enterococcus faecium* Strain PR88 – an Effective Probiotic. *Gut* 38, A62.
- Hyndman, C.L., Groboillot, A., Poncelet, D., Champagne, C., Neufeld, R.J. 1993. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* with Cross-Link Gelatin Membranes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 56, p.259-263.
- Ibrahim, S.A., O'Sullivan, D.J. 2000. Use of Chemical Mutagenesis for the Isolation of Food Grade β -Galactosidase Overproducing Mutants of Bifidobacteria, Lactobacilli and *Streptococcus thermophilus*, *Journal of Dairy Science* 83, p.923-930.
- Ishibashi, N., Yamazaki, S. 2001. Probiotics and Safety. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, (supplement 2), p.465S-470S.

- Isolauri, E. Arvola, T., Sutas, Y., Moilanen, E., Salminen, E. 2000. Probiotics in the Management of Atopic Eczema. *Clinical and Experimental Allergy* 30, p.1604-1610.
- Iwana, H., Masuda, H., Fujisawa, H., Mitsuoka, T. 1993 Isolation and Identification of *Bifidobacterium* spp. in Commercial Yogurts Sold in Europe. *Bifidobacteria Microflora* 12, p.39-45.
- Iyer, C., Kailasapathy, K. Peiris, P. 2004. Evaluation of Survival and Release of Encapsulated Bacteria in ex vivo Porcine Gastrointestinal Contents Using Green Fluorescent Protein Gene-Labelled *E. coli*. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 37, p.639-642.
- Jiang, T. A., Mustapha, A., Savaiano, D. A. 1996. Improvement of Lactose Digestion in Humans by Ingestion of Unfermented Milk Containing *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Science* 79, p.750-757.
- Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 3, p.39-48.
- Kailasapathy, K. 2006. Survival of Free and Encapsulated Probiotic Bacteria and their Effect on the Sensory Properties of Yoghurt. *Food Science and Technology* 39, No. 10, p.1221-1227.
- Kailasapathy, K., Anjani, K., Seneweera, S. 2006. Recent Trends in Accelerated Cheese Ripening Using Microencapsulated Enzymes. *Australian Journal of Dairy Technology* 61, p.78-80.
- Kailasapathy, K., Chin, J. 2000. Survival and Therapeutic Potential of Probiotics Organisms with Reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology* 78, p.80-88.
- Kailasapathy, K., Masondole, L. 2005. Survival of Free and Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their Effect on Texture of Feta Cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* 60, p.252-258.
- Kailasapathy, K., Sureeta, B.S. 2003. Effect of Storage on Shelf Life and Viability of Freeze-Dried and Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* Cultures. *Australian Journal of Dairy Technology* 59, p.204-208.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T., Arvilommi, H., Isolauri, E. 2003. Probiotics and Prevention of Atopic Disease : 4-Year Follow-Up of a Randomised Placebo-Controlled Trial. *Lancet* 361, p.1869-1871.
- Khalida, S., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., Kailasapathy, K. 2000. Encapsulation of Probiotic Bacteria with Alginate-Starch and Evaluation of Survival in Simulated Gastro-Intestinal Conditions and in Yoghurt. *International journal of Food Microbiology* 62, p.47-55.
- Kheadr, E., Dabour, N., Le Lay, C., Lacroix, C., Fliss, I. 2007. Antibiotic Susceptibility Profile of Bifidobacteria as Affected by Oxgall, Acid and Hydrogen Peroxide Stress. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, p.169-174.

- Kilara, A., Shahani, K.M., Das, N.K. 1976. Effect of Cryoprotective Agents on Freeze-Drying and Storage of Lactic Cultures. *Cultured Dairy Products Journal* 11, p.8-11.
- Klein, S.M., Elmer, G.W., McFarland, L.V., Surawicz, C.M., Levy, R.H. 1993. Recovery and Elimination of the Biotherapeutic Agent, *Saccharomyces boulardii*, in Healthy Human Volunteers. *Pharmaceutical Research* 10, p.1615-1619.
- Klein, J., Stock, J., Vorlop, K.D. 1983. Pore Size and Properties of Spherical Ca-Alginate Biocatalysts. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 18, p.86-91.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Pukkala, E., Aromaa, A. 1996. Intake of Dairy Products and the Risk of Breast Cancer. *British Journal of Cancerology* 73, p.687-691.
- Kokott, S. 2006. Microencapsulation and Supply of *Bifidobacterium lactis* DSM 10140 in Fermented Traditional African Beverages. Thèse de Cape Peninsula University of Technology, 225 p.
- Kontikari, T., Sundqvist, K., Nuutinen, M., Pokka, T., Koskela, M., Uhari, M. 2001. Randomised Trial of Cranberry-Lingonberry Juice and *Lactobacillus* GG. *British Medical Journal* 323, p.1571-1575.
- Koo, S.M., Cho, Y.H., Huh, C.S., Baek, Y.J., Park, J. 2001. Improvement of Stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by Microencapsulation Using Alginate and Chitosan. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 11, p.376-383.
- Kosikowski, F.V., Mistry, V.V. 1997. Cheese and Fermented Milk Foods. Vol. II, 3rd Edition. F.V. Kosikowski L.L.C., 330 p.
- Kourkoutas, Y., Xolias, V., Kallis, M., Bezirtzoglou, E., Kanellaki, M. 2005. *Lactobacillus casei* Cell Immobilization on Fruit Pieces for Probiotic Additive, Fermented Milk and Lactic Acid Production. *Process Biochemistry* 40, No. 1, p.411-416.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. 2003. Evaluation of Encapsulation Techniques of Probiotics for Yoghurt. *International Dairy Journal* 13, p.3-13.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. 2004. The Influence of Coating Material on Some Properties of Alginate Beads and Survivability of Microencapsulated Probiotic Bacteria. *International Dairy Journal* 14, p.737-743.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. 2006. Survival of Probiotics Encapsulated in Chitosan-Coated Alginate Beads in Yoghurt form UHT- and Conventionally Treated Milk during Storage. *Lwt-Food Science and Technology* 39, p.177-183.
- Kruis, W., Schutz, E., Fric, P., Fixa, B., Judmaier, G., Stolte, M. 1997. Double-Blind Comparison of an Oral *Escherichia coli* Preparation and Mesalazine in Maintaining Remission of Ulcerative Colitis. *Alimentation Pharmacology Therapy* 11, p.853-858.
- Kühtreiber, W.M., Lanza, R.P., Chick, W.L., 1999. Cell Encapsulation Technology and Therapeutics. Birhäuser, États-Unis, 450 p.

Kurmann, J.A., Rašić, J.L. 1991. The Health Potential of Products Containing Bifidobacteria. Therapeutic Properties of Fermented Milks. Ed: Robinson, R.K., Elsevier Science Publishers Ltd, p.117-158.

Lallemand Inc. 2010. (page consultée le 15 juillet 2010). <http://www.institut-rosell-lallemand.com/>

Lallemand. 2009. Barry Callebaut First Probiotic Chocolate on Industrial Scale in Partnership with Lal'foodé. (page consultée le 20 mai 2010). http://www.lalfood.com/documents/probiotic_chocolate.pdf

Lankaputhra, W.E.V., Shah, N.P. 1996. A Simple Method for Selective Enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in Yoghurt Supplemented with *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Milchwissenschaft* 51, p.446-451.

Lapierre, L., Undeland, P., Cox, L.J. 1992. Lithium Chloride-Sodium Propionate Agar for the Enumeration of Bifidobacteria in Fermented Dairy Products. *Journal of Dairy Science* 75, p.1192-1196.

Lassonde. 2005. Fruit Juice Containing Probiotics: Survival of *Bifidobacterium lactis* In-Vitro through Digestive System. (page consultée le 20 mai 2010) <http://www.alassonde.com/fr/nutrition/sante/probiotiques.aspx>.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S.L., De Angelis, M., Morelli, L., Callegari, M.L., Rizzello, C.G., Visconti, A. 2005. Study of Adhesion and Survival of Lacobacilli and Bifidobacteria on Table Olives with the Aim of Formulating a New Probiotic Food. *Applied and Environmental Microbiology* 71, No. 8, p.4233-4240.

Lawrence, R.C., Gilles, J. 1987. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol.2, P.F.Fox, ed: Elsevier Applied Science, Londres, p.1-44.

La Torre, L., Tamime, A.Y., Muir, D.D. 2003. Rheology and Sensory Profiling of Set-Type Fermented Milks Made with Different Commercial Probiotic and Yoghurt Starter Cultures. *International Journal of Dairy Technology* 56, p.163-170.

Leakey, R. 1993. *På spaning efter människans ursprung*, Natur och Kultur, Stockholm [Swedish translation from: *Origins reconsidered, in search of what makes us human*, Bantam Doubleday Dell Publishing Group, Inc., New York, 1992].

Lee, J.-H., O'Sullivan, D.J. 2010. Genomic Insights into Bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74, No 3, p.378-416.

Lee, K.Y., Heo, T.R. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution. *Applied and Environmental Microbiology* 66, p.869-873.

LeGras, M. 2007. Principales activités microbiennes dans le lait. ESITPA-Laboratoire BioSol. (page consultée le 31 janvier 2008) http://biosol.esitpa.org/liens/lait_2003/act%20microb%20dans%20le%20lait.htm

- Le-Tien, C., Millette, M., Mateescu, M.-A., Lacroix, M. 2004. Modified Alginate and Chitosan for Lactic Acid Bacteria Immobilization. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 39, p.347-354.
- Levy, J. 1997. Experience with Live *Lactobacillus plantarum* 299v: a Promising Adjunct in the Management of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Gastroenterology* 112, p.A379.
- Li, Q., Chen, Q., Ruan, H., Zhu, D., He, G. 2010. Isolation and Characterisation of an Oxygen, Acid and Bile Resistant *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Qq08. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, No.8, p.1340-1346.
- Li, X.Y., Chen, X.G., Cha, D.S., Park, H.J., Liu, C.S. 2009. Microencapsulation of a Probiotic Bacteria with Alginate-Gelatin and its Properties. *Journal of Microencapsulation* 26, p. 315-324.
- Lynch, C. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M., Drinan, F. D. 1996. Manufacture of Cheddar Cheese with and without Adjunct Lactobacilli under Controlled Microbiological Conditions. *International Dairy Journal* 6, p.851-867.
- Mackay, A.D., Taylor, M.B., Kibbler, C.C. et Hamilton-Miller, J.M.T. 1999. *Lactobacillus* Endocarditis Caused by a Probiotic Organism. *Clinical Microbiology Infectious Diseases* 5, p.290-292.
- Macouzet, M., Champagne, C.P., 2007. Les Bactéries Probiotiques : Innovations et Tendances Développement Technologique. *BioVeille* 6, No.4, 24 p.
- Mahaut, M., Jeantet, R. & Brulé, G. 2000. Initiation à la Technologie Fromagère. TEC & DOC Editions, Paris, 194 p.
- Mahdi, H.A., Tamime, A.Y., Davies, G. 1990. Some Aspects of the Production of « Labneh » by Ultrafiltration Using Cow's, Sheep's and Goat's Milk. *Egyptian Journal of Dairy Science* 18, p.345-367.
- Mao, Y., Nobaek, S., Adawi, D., Molin, G., Jeppsson, B. 1997. Comparison of the Effects of Different *Lactobacillus* Strains in Reducing Bacterial Translocation on Methotrexate Induced Enterocolitis in Rats, *Digestion Surgery* 14, p.284-291.
- Marshall, J. 2008. Cheddar. *ILoveCheese 2000-2008*, Royaume-Uni. (page consultée le 12 août 2008) <http://www.ilovecheese.co.uk/Cheddar.html>
- Marshall, V.M. 1992. Inoculated Ecosystems in a Milk Environment. *Journal of Applied Bacteriology* 73, p.S127-135.
- Martinez-Villaluenga, C., Frias, J., Gomez, R., Vidal-Valverde, C. 2006. Influence of Addition of Raffinose Family Oligosaccharides on Probiotic Survival in Fermented Milk during Refrigerated Storage. *International Dairy Journal* 16, p.768-774.
- Mattila-Sandholm, T., Saarela, M. 2003. *Fuctional Dairy Products*. CRC Press, Angleterre, 395 p.

- Mayer, Á., Rezessy-Szabó, J., Bognár, C.S., Hoschke, Á. 2003. Research for Creation of Functional Foods with Bifidobacteria. *Acta Alimentaria* 32, No.1, p.27-39.
- McBrearty, S., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., Wallace, J. M., Stanton, C. 2001. Influence of Two Commercially Available Bifidobacteria Cultures on Cheddar Cheese Quality. *International Dairy Journal* 11, p.599-610.
- McClements, D.J. 2005. Emulsion Stability. *Food Emulsions. Principles, Practices and Techniques*, 2nd Edition. McClements, D.J., Boca Raton, FL: CRC Press, p.185-233.
- McFarland, L.V., Surawicz, C.M., Greenberg, R.N., Elmer, G.W., Moyer, K.A., Melcher, S.A., Bowen, K.E., Cox, J.L. 1995. Prevention of Beta-Lactam-Associated Diarrhea by *Saccharomyces boulardii* Compared with Placebo. *American Journal of Gastroenterology* 90, p.439-448.
- Meng, X.C., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Daly, C., Ross, R.P. 2008. Anhydrobiotics: The Challenges of Drying Probiotic Cultures. *Food Chemistry* 106, p.1406-1416.
- Michail, S., Abernathy, F. 2002. *Lactobacillus plantarum* Reduces the in vitro Secretory Response of Intestinal Epithelial Cells to Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 35, p.350-355.
- Midolo, P.D., Lambert, J.R., Hull, R., Luo, F., Grayson, M.L. 1995. *In vitro* Inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by Organic Acids and Lactic Acid Bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 79, p.475-479.
- Millette, M., Dupont, C., Archambault, D., Lacroix, M. 2007. Partial Characterization of Bacteriocins Produced by Human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* Isolates. *Journal of Applied Microbiology* 102, p.274-282.
- Millette, M., Smoragiewicz, W., Lacroix, M. 2004. Antimicrobial Potential of Immobilized *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 against Selected Bacteria. *Journal of Food Protection* 67, p.1184-1189.
- Mimura, T., Rizzello, F., Helwig, U., Poggioli, G., Schreiber, S., Talbot, I.C., Nicholls, R.J., Giochetti, P., Campieri, M., Kamm, M.A. 2004. Once Daily High Dose Probiotic Therapy (VSL#3) for Maintaining Remission in Recurrent or Refractory Pouchitis. *Gut* 53, p.108-114.
- Ministère de la Justice. 2011. Règlement sur les produits laitiers. (page consultée le 13 septembre 2011)
<http://lois-laws.justice.gc.ca/fra/reglements/DORS-79-840/TexteCompleet.html>.
- Mitterdorfer, G., Mayer, H.K., Kneifel, W., Viernstein, H. 2002. Clustering of *Saccharomyces boulardii* Strains within the Species *S. cerevisiae* Using Molecular Typing Techniques. *Journal of Applied Microbiology* 93, p.521-530.
- Miyazaki, S., Aoyama, H., Kawasaki, N., Kubo, W., Attwood, D. 1999. In situ-Gelling Gellan Formulations as Vehicles for Oral Drug Delivery. *Journal of Controlled Release* 60, No.2-3, p.287-295.

Modler, H.W. et Villa-Garcia, L. 1993. The Growth of *Bifidobacterium longum* in a Whey Based Medium and Viability of this Organism in Frozen Yogurt with Low and High Levels of Developed Acidity. *Cultured Dairy Products Journal* 28, p.4-8.

Molin, G. 2006. *Lactobacillus plantarum* 299v. p.1-26. (page consultée le 4 mai 2009). <http://www.proviva.com/upload/pdf/Dokumentation.pdf>

Morin, P., Pouliot, Y., Britten, M. 2008. Effect of Buttermilk Made from Cream with Different Heat Treatment Histories on Properties of Rennet Gels and Model Cheeses. *Journal of Dairy Sciences* 91, p.871-882.

Motta, L., Blancato, G., Scornavacca, G., De Luca, M., Vasquez, E., Gismondo, M. R., Lo Bue, A., Chisari, G. 1991. Study on the Activity of a Therapeutic Bacterial Combination in Intestinal Motility Disorders in the Aged. *Clinical Therapy* 138, p.27-35.

Muscettola, M., Massai, L., Tanganelli, C., Grasso, G. 1994. Effects of Lactobacilli on Interferon Production in Young and Aged Mice. *Annual New York Academy of Science* 717, p.226-232.

Muthukumarasamy, P., Allan-Kojtas, P., Holley, R.A. 2006. Stability of *Lactobacillus reuteri* in Different Types of Microcapsules. *Journal of Food Science* 71, p.M20-M24.

Naidu, A.S., Bidlack, W.R., Clemens, R.A. 1999. Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 39, p.13-126.

Nanji, A.A., Khettry, U., Sadrzadeh, S.M.H. 1994. *Lactobacillus* Feeding Reduces Endotoxemia and Severity of Experimental Alcoholic Liver (Disease). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 205, p.243-247.

Näse, L., Hatakka, K., Savilahti, E., Saxelin, M., Pönkä, A., Poussa, T., Korpela, R., Meurman, J.H. 2001. Effect of Long-Term Consumption of a Probiotic Bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in Milk on Dental Caries Risk in Children. *Caries Research* 35, p.412-420.

Naruszewicz, M., Johansson, M-L., Zapolska-Downar, D., Bukowska, H. 2002. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on Cardiovascular Disease Risk Factors in Smokers. *American Journal of Clinical Nutrition* 76, p.1249-1255.

Nes, I. F., Holo, H. 2000. Class II Antimicrobial Peptides from Lactic Acid Bacteria. *Biopolymers* 55, p.50-61.

Nestlé Canada, 2010. New Nestlé® Good Start® Natural Cultures™ with Omega-3 & Omega-6. (page consultée le 20 mai 2010) http://www.nestle-baby.ca/en/products/formula/starter/goodstart_naturalcultures.htm

Newburg, D.S., Neubaer, S.H. 1995. *Handbook of Milk Composition*. ed. Jensen, R.C., London, p.273-349.

Nobaek, S., Johansson, M., Molin, G., Ahrne, S., Jeppsson, B. 2000. Bacterial Supplementation in the Irritable Bowel Syndrome. A Randomised Double-Blind Placebo-Controlled Crossover Study. *Digestive Diseases and Science* 32, p.302-304.

- Norton, S., Lacroix, C. 1990. Gellan Gum Gel as entrapment Matrix for High Temperature Fermentation Processes: A Rheological Study. *Biotechnology techniques* 4, p.351-356.
- Obeidat, W.M. 2009. Recent Patents Review in Microencapsulation of Pharmaceuticals Using the Emulsion Solvent Removal Methods. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation* 3, p.178-192.
- O'Grady, B., Gibson, G.R. 2005. Microbiota of the Human Gut. Chapitre 1, Probiotic Dairy Products, Blackwell Publishing Ltd, Angleterre, p.1-15.
- O'Riordan, K., Fitzgerald, G. F. 1998. Evaluation of Bifidobacteria for the Production of Antimicrobial Compounds and Assessment of Performance in Cottage Cheese at Refrigeration Temperature. *Journal of Applied Microbiology* 85, p. 103-114.
- Oggioni, M.R., Pozzi, G., Valensin P.E., Galieni, P., Bigazzi, C. 1998. Recurrent Septicemia in an Immunocompromised Patient Due to Probiotic Strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of Clinical Microbiology* 36, p.325-326
- Ohashi, Y., Nakai, S., Tsukamoto, T., Masumori, N., Akaza, H., Miyanaga, N., Kitamura, T., Kawabe, K., Kotake, T., Kuroda, M., Naito, S., Koga, H., Saito, Y., Nomata, K., Kitawaga, M., Aso, Y. 2002. Habitual Intake of Lactic Acid Bacteria and Risk Reduction of Bladder Cancer. *Urology International* 68, p.273-280.
- Okawa, T., Niibe, H., Arai, T., Sekiba, K., Noda, K., Takeuchi, S., Hashimoto, S., Ogawa, N. 1993. Effect of LC9018 Combined with Radiation Therapy on Carcinoma of the Uterine Cervix. *Cancer* 72, p.1949-1954.
- Oliveira, A.C., Moretti, T.S., Boschini, C., Baliero, J.C.C., Freitas, O., Favaro-Trindade, C.S. 2007. Stability of Microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by Complex Coacervation Followed by Spray Drying. *Journal of Microencapsulation* 24, p.685-693.
- Ong, L., Henriksson, A., Shah, N.P. 2007a. Chemical Analysis and Sensory Evaluation of Cheddar Cheese Produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifidobacterium* sp. *International Dairy Journal* 17, p.937-945.
- Ong, L., Henriksson, A., Shah, N.P. 2007b. Proteolytic Pattern and Organic Acid Profiles of Probiotic Cheddar Cheese as Influenced by Probiotic Strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. *International Dairy Journal* 17, p.67-78.
- Organisation Mondiale de la Santé, 2001. Rapport de Consultation Mixte d'Experts FAO/OMS sur l'Évaluation des Propriétés Sanitaires et Nutritionnelles des Probiotiques dans les Aliments, y Compris le Lait en Poudre Contenant des Bactéries Lactiques Vivantes. Argentine. (page consultée le 24 janvier 2008). <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398f.pdf>.
- Organisation Mondiale de la Santé, 2006. Probiotics in Food : Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. Italie, 50 p.

- Ouwehand, A.C., Bianchi Salvadori, B., Fondén, R., Mogensen, G., Salminen, S., Sellars, R. 2003. Health Effects of Probiotics and Culture-Containing Dairy Products in Humans. Brussels: International Dairy Federation (IDF), Document #380, p.4-19.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. 1998. The Health Effects of Cultured Milk Products with Viable and Non-Viable Bacteria. *International Dairy Journal* 8, p.749-758.
- Özer, B., Uzun, Y. S., Kirmaci, H. A. 2008. Effect of Microencapsulation on Viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 During Kasar Cheese Ripening. *International Journal of Dairy Technology* 61, No.3, p. 237-244.
- Paquin, C., Leroy, M., Lacroix, C. 1990. *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 Production Using Free and Immobilized Fermentation in a Whey Permeate Based Medium. Proceedings of the 23rd International Dairy Congress, International Dairy Federation, Belgique, p.32.
- Patil, J.S., Kamalapur, M.V., Marapur, S.C., Kadam, D.V. 2010. Ionotropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation: The Novel Techniques to Design Hydrogel Particulate Sustained, Modulated Drug Delivery System: A Review. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 5, No 1, p.241–248.
- P.E.P. Caprin, 2008. (page consultée le 1 février 2008) <http://www.pep.chambagri.fr/caprins/html/contenu/pdf/D97108.pdf>.
- Phillips, M., Kailasapathy, K., Tran, L. 2006. Viability of Commercial Probiotic Cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in Cheddar Cheese. *International Journal of Food Microbiology* 108, p.276-280.
- Phillips, C.R., Poon, Y.N. 1988. *Biotechnology Monographs. Immobilization of Cells. Volume 5*, Springer-Verlag, Allemagne, p.50-64.
- Phillips, G.O., Williams, P.A. 2000. *Handbook of Hydrocolloids*. CRC Press, 450 p.
- Picot, A. 2005. L'Encapsulation au Service des Aliments Fonctionnels : l'Exemple des Probiotiques. *Biofutur* 258, p.45-48.
- Picot, A., Lacroix, C. 2004. Encapsulation of Bifidobacteria in Whey Protein-Based Microcapsules and Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions and in Yoghurt. *International Dairy Journal* 14, p.505–515.
- Pimentel-González, D.J., Campos-Montiel, R.G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., Vernon-Carter, E.J. 2009. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in Double Emulsions Formulated with Sweet Whey as Emulsifier and Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions. *Food Research International* 42, p.292-297.
- Porto, S. 2003. Agargel. Agar Brasileiro. (page consultée le 25 mai 2010) <http://www.agargel.com.br/index-en.html>.

- Rafter, J., Bennett, M., Caderni, G., Clune, Y., Hughes, R., Karlsson, P.C., Klinder, A., O'Riordan, M., O'Sullivan, G.C., Pool-Zobel, B., Rechkemmer, G., Roller, M., Rowland, I., Salvadori, M., Thijs, H., Van Loo, J., Watzl, B., Collins, J.K. 2007. Dietary Synbiotics Reduce Cancer Risk Factors in Polypectomized and Colon Cancer Patients. *American Journal of Clinical Nutrition* 85, p.488-496.
- Ramet, J.-P. 1993. La Technologie des Fromages au Lait de Dromadaire (*Camelus dromedarius*). Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. (page consultée le 15 septembre 2011). <http://www.fao.org/DOCREP/004/T0755F/T0755F03.htm>
- Rašić, J.L. et Kurmann, J.A. 1983. *Bifidobacteria* and their Role, *Experimenta Supplementum* 39, p.102-133.
- Rautio, M., Jousimes-Somer, H., Kauma, H., Pirtarinen, I., Saxelin, M., Tynkkynen, S., Koskela, M. 1999. Liver Abscess Due to a *Lactobacillus rhamnosus* Strain Indistinguishable from *Lactobacillus rhamnosus* Strain GG. *Clinical Infectious Diseases* 29, p.1159-1160.
- Rao, A.V., Sanders, M.E., Indranie, C., Simi, B., Reddy, B.S. 1999. Prevention of Colonic Preneoplastic Lesions by the Probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFMTM in F344 Rats. *International Journal of Oncology* 14, p.939-944.
- Reddy, B.S., Rivenson, A. 1993. Inhibitory Effect of *Bifidobacterium longum* on Colon, Mammary, and Liver Carcinogenesis Induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a Food Mutagen. *Cancer Research* 53, p.3914-3918.
- Reeves, R., Ribeiro, A., Lombardo, L., Boyer, R., Leach, J.B. 2010. Synthesis and Characterization of Carboxymethylcellulose-Methacrylate Hydrogel Cell Scaffolds. *Polymers* 2, p.252-264.
- Reid, G., Bruce, A.W. 2003. Urogenital Infections in Women: Can Probiotics Help? *Postgraduate Medical Journal* 79, p.428-433.
- Reid, G., Bruce, A., Taylor, M. 1995. Instillation of *Lactobacillus* and Stimulation of Indigenous Organisms to Prevent Recurrence of Urinary Tract Infections. *Microecology Therapy* 23, p.32-45.
- Reid, G., Bruce, A.W., Fraser, N., Heisemann, C., Owen, J., Henning, B. 2001. Oral Probiotics Can Resolve Urogenital Infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 30, p.49-52.
- Reid, A.A., Vuilleumard, J.C., Britten, M., Arcand, Y., Farnworth, E., Champagne, C.P. 2005. Microentrapment of Probiotic Bacteria in a Ca²⁺-Induced Whey Protein Gel and Effects on their Viability in a Dynamic Gastro-Intestinal Model. *Journal of Microencapsulation* 22, No.6, p.603-619.
- Rodgers, S. 2007. Incorporation of Probiotic Cultures in Foodservice Products: an Exploratory Study. *Journal of Foodservice* 18, p.108-118.
- Rogosa, M., Mitchell, J.A., Wiseman, R.F. 1951. A Selective Medium for the Isolation and Enumeration of Oral and Fecal Lactobacilli. *Journal of Bacteriology* 62, p.132-133.

- Roos, K., Grahn Håkansson, E., Holm, S. 2001. Effect of Recolonisation with “Interfering” a *Streptococcus* on Recurrences of Acute and Secretory Otitis Media in Children: Randomised Trial. *British Medical Journal* 322, p.1-4.
- Rosenfeldt, V., Michaelsen, K.F., Jakobsen, M., Larsen, C.N., Moller, P.L., Pedersen, P., Tvede, M. Weyrehter, H., Valerius, N.H., Paerregaard, A. 2002. Effect of Probiotic *Lactobacillus* Strains in Young Children Hospitalized with Acute Diarrhea. *Pediatric Infectious Diseases Journal* 21, p.411-416.
- Rowland, I.R., Rumney, C.J., Coutts, J.T., Lievense, L.C. 1997. Effect of *Bifidobacterium longum* and Inulin on Gut Bacterial Metabolism and Carcinogen-Induced Crypt Foci in Rats. *Carcinogenesis* 19, p.281-285.
- Roy, D., Goulet, J., Leduy, A. 1987. Continuous Production of Lactic Acid from Whey Permeate Media by Free and Calcium Alginate Entrapped *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science* 70, p.506-513.
- Roy, D., Mainville, I., Mondou, F. 1997. Selective Enumeration and Survival of Bifidobacteria in Fresh Cheese. *Int. Dairy Journal* 7, p.785-793.
- Sakai, K., Mishima, C., Tachiki, T., Kumagi, H., Tochikura, T. 1987. Mortality of Bifidobacteria in Boiled Yoghurt. *Journal of Fermentation Technology* 65, p.215-220.
- Salminen, S., Isolauri, E. 2006. Intestinal Colonization, Microbiota, and Probiotics. *The Journal of Pediatrics* 149, p.115-120.
- Salminen S., Isolauri E., Salminen E. 1996. Clinical Uses of Probiotics for Stabilizing the Gut Mucosal Barrier: Successful Strains and Future Challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, p.347-358.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Mattila-Sondholm, T. 1998. Demonstration of Safety of Probiotics-A Review. *International Journal of Food Microbiology* 44, p.93-106.
- Saltzman, J.R. Russel, R.M., Golner, B., Barakat, S., Dallal, G.E., Goldin, B.R. 1999. A Randomized Trial of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 to Treat Lactose Intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition* 69, p.140-146.
- Samona, A., Robinson, R.K. 1994. Effect of Yoghurt Cultures on the Survival of Bifidobacteria in Fermented Milks. *International Journal of Dairy Technology* 47, No.2, p.58-60.
- Sanchez, G., Quiberoni, A., Andrich, O., Reinheimer, J., Santiago, L. 2009. Encapsulation of *Lactobacillus paracasei* Probiotic Strain, Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions and Controlled Release. (Poster). 3rd International Symposium “Delivery of Functionality in Complex Food Systems: Physically-Inspired Approaches from Nanoscale to Microscale”, Pays-Bas.

- Schell, M.A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M.C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R.D., Arigoni, F. 2002. The Genome Sequence of *Bifidobacterium longum* Reflects its Adaptation to the Human Gastrointestinal Tract. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, p.14422-14427.
- Scott, R. 1986. Cheesemaking Practice. 2nd Edition. Elsevier Applied Science Publishers Ltd. Etats-Unis. 539 p.
- Seki, M., Igarashi, T., Fukuda, Y., Simamura, S., Kaswashima, T., Ogasa, K. 1978. The Effect of *Bifidobacterium* Cultured Milk on the "Regularity" among an Aged Group. Nutritional Foodstuff 31, p.379-87.
- Selrac, C. 1964. Je Connais tous les Fromages. Ed : Gérard et C°, Verviers, Belgique, 141 p.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., Korpela, R. 2003. A Fermented Milk, High in Bioactive Peptides, Has a Blood Pressure Lowering Effect in Hypertensive Subjects. American Journal of Clinical Nutrition 77, p.326-330.
- Shah, N.P. 2000. Probiotic bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. Journal of Dairy Science 83, 894-907.
- Shah, N.P. 2007. Functional cultures and health benefits. International Dairy Journal 17, p.1262-1277.
- Shah, N.P., Ravula, R.R. 2000. Microencapsulation of Probiotic Bacteria and their Survival in Frozen Fermented Dairy Desserts. Australian Journal of Dairy Technology 55, p.139-144.
- Shanani, K.M., Chandan, R.C. 1979. Nutritional and Healthful Aspects of Cultured and Culture-Containing Dairy Foods. Journal of Dairy Science 62, p.1685-1694.
- Sharp, M. D., McMahon, D. J., Broadbent, J. R. 2008. Comparative Evaluation of Yogurt and Low-Fat Cheddar Cheese as Delivery Media for Probiotic *Lactobacillus casei*. Journal of Food Microbiology and Safety 73, p.375-377.
- Sheu, T.Y., Marshall, R.T. 1993. Microentrapment of Lactobacilli in Calcium Alginate Gels. Journal of Food Science 58, p.557-561.
- Sheu, T.Y., Marshall, R.T., Heymann, A. 1993. Improving Survival of Culture Bacteria in Frozen Desserts by Microentrapment. Journal of Dairy Science 76, p.1902-1907.
- Siemenhoff, M.L., Dunn, S.R., Zollner, G.P., Fitzpatrick, M.E., Emery, S.M., Sandine, W.E., Ayres, J.W. 1996. Biomodulation on the Toxic and Nutritional Effects of Small Bowel Bacterial Overgrowth in Endstage Kidney Disease Using Freeze-Dried *Lactobacillus acidophilus*. Mineral Electrolyte Metabolism 22, p.92-96.
- Siitonen, S., Vapaatalo, H., Salminen, S., Gordin, A., Saxelin, M. Wikberg, A.L. 1990. Effect of *Lactobacillus* GG Yoghurt in Prevention of Antibiotic Associated Diarrhoea. Annals of Medicine 22, p.57-59.

- Smit, G. 2003. Dairy Processing: Improving Quality. Woodhead Publishing, 546 p.
- Sodini-Gallot, I., Corrieu, G., Boquien, C.Y., Latrille, E., Lacroix G. 1995. Process Performance of Continuous Inoculation and Acidification of Milk with Immobilized Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science* 78, p.1407-1420.
- Songisepp, E., Kullisaar, T., Hütt, P., Elias, P., Brilene, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M. 2004. A New Probiotic Cheese with Antioxidative and Antimicrobial Activity. *Journal of Dairy Science* 87, p.2017-2023.
- Soper, J.C. 1995. Utilization of Coacervated Flavors. Chapitre 10, Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients. ACS Symposium Series, Vol. 590. États-Unis, p.104-112.
- Sriamornsak, P., Sungthongjeen, S. 2007. Modification of Theophylline Release With Alginate Gel Formed in Hard Capsules. *AAPS PharmSciTech* 8, p.E1-E8.
- St-Gelais, D., Lessard, J., Champagne, C.P., Vuilleumard, J.-C. 2008. Production of Fresh Cheddar Cheese Curds with Controlled Postacidification and Enhanced Flavor. *Journal of Dairy Science* 92, p.1856-1863.
- Stachowiak, J.C., Richmond, D.L., Li, T.H., Brochard-Wyart, F., Fletcher, D.A. 2009. Inkjet Formation of Unilamellar Lipid Vesicles for Cell-Like Encapsulation. *The Royal Society of Chemistry* 9, p.2003-2009.
- Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P.B., Collins, J.K., Fitzgerald, G., Ross, R.P. 1998. Probiotic Cheese. *International Dairy Journal* 8, p.491-496.
- Stanton, C., Ross, P. 1999. New Probiotic Cheddar Cheese. End of Project Report, Dairy Products Research Centre No. 29. <http://www.teagasc.ie/research/reports/dairyproduction/4266/eopr-4266.pdf>.
- Statistiques Canada, 2007. Statistiques Laitières : Troisième trimestre 2007. Catalogue 23-014-X. (page consultée le 29 novembre 2007) http://www.statcan.ca/francais/freepub/23-014-XIF/2007002/technote5_f.htm.
- Statistiques Canada, 2010. Tableau 003-0010 : Production Cheddar. (page consultée le 14 juillet 2010) www.dairyinfo.gc.ca/pdf/prod_cheddar.pdf.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., Kailasapathy, K. 2000. Encapsulation of Probiotic Bacteria with Alginate-Starch and Evaluation of Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions and in Yoghurt. *International Journal of Food Microbiology* 62, p.47-55.
- Sun, W., Griffiths, M.W. 2000. Survival of Bifidobacteria in Yogurt and Simulated Gastric Juice Following Immobilization in Gellan-Xanthan Beads. *International Journal of Food Microbiology* 61, p.17-25.

- Supriadi, D., Kailasapathy, K., Hourigan, J.A. 1994. Effect of Partial Replacement of Skim Milk Powder with Whey Protein Concentrate on Buffering Capacity of Yoghurt. Proceedings of the XXIV International Dairy Congress, eds: Dixon, D., Muller, L., Melbourne, The Australian National Committee of the International Dairy Federation.
- Tabrizi, C.A., Walcher, P., Mayr, U.B., Stiedl, T., Binder, M., McGrath, J., Lubitz, W. 2004. Bacterial Ghosts- Biological Particles as Delivery Systems for Antigens, Nucleic Acids and Drugs. *Current Opinion in Biotechnology* 15, p.530-537.
- Takahashi, T., Nakagawa, E., Nara, T., Yajima, T., Kuwata, T. 1998. Effects of Orally Ingested *Bifidobacterium longum* on the Mucosal IgA Response of Mice to Dietary Antigens. *Bioscience Biotechnol Biochemistry* 62, p.10-15.
- Talwalkar, A., Kailasapathy, K. 2003. Effect of Microencapsulation on Oxygen Toxicity in Probiotic Bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology* 58, p.36-39.
- Talwalkar, A., Kailasapathy, K. 2004. A Review of Oxygen Toxicity on Probiotic Yoghurts: Influence on the Survival of Probiotic Bacteria and Protective Techniques. *Complete Reviews in Food Science and Food Safety* 3, p.117-124.
- Tamime, A.Y. 2002. Microbiology of Starter Cultures. *Dairy Microbiology Handbook*. Third Edition. Ed. Robinson, R.K., Wiley-Interscience, Etats-Unis, p.261-366.
- Tamime A.Y., Marshall, V.M.E., Robinson, R.K. 1995. Microbiological and Technological Aspects of Milks Fermented by Bifidobacteria. *Journal of Dairy Research* 62, p.151-187.
- Tamime, A.Y., Saarela, M., Korslund Sondergaard, A., Mistry, V.V., Shah, N.P. 2005. Production and Maintenance of Viability of Probiotic Micro-organisms in Dairy Products. Chapitre 3, *Probiotic Dairy Products*. Blackwell Publishing Ltd. Angleterre, p.39-72.
- Tanaka, T., Hatanaka, K. 1992. Application of Hydrostatic Pressure to Yoghurt to Prevent its After Acidification. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* 39, p.173-177.
- Tavani, A., Gallus, S., Negri, E., la Vecchia, C. 2002. Milk, Dairy Products, and Coronary Heart Disease. *Journal of Epidemiological Community Health* 56, p.471-472.
- The Enzyme Database. Carrageenan. (page consultée le 7 septembre 2011) <http://www.enzyme-database.org/glossary/carrageenan.html>
- Tompkins, T., Hagen, K.E., Wallace, T.E., Fillion-Forté, V. 2008. Safety Evaluation of Two Probiotic Strains Used in Asian Probiotic Products. *Canadian Journal of Microbiology* 54, p.391-400.
- Trapp, C.L., Chang, C.C., Halpern, G.M., Keen, C.L., Gershwin, M.E. 1993. The Influence of Chronic Yoghurt Consumption on Populations of Young and Elderly Adults. *International Journal of Immunotherapy* 9, p.53-64.
- Tratnik, L., Suskovic, J., Bozanic, R., Kos, B. 2000. Creamed Cottage Cheese Enriched with *Lactobacillus* GG. *Mljekarstvo* 50, p.113-123.

Truelstrup-Hansen, L., Allan-Wojtas, P.M., Jin, Y.L., Paulson, A.T. 2002. Survival of Ca-Alginate Microencapsulated *Bifidobacterium* ssp. in Milk and Simulated Gastrointestinal Conditions. *Food Microbiology* 19, p.35-45.

Valerio, F., De Bellis, P., Lonigro, S.L., Morelli, L., Visconti, A., Lavermicocca, P. 2006. In Vitro and In Vivo Survival and Transit Tolerance of Potentially Probiotic Strains Carried by Artichokes in the Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology* 72, No.4, p.3042-3045.

Varnam, A.H., Sutherland, J.P. 1994. *Milk and Milk Products Technology, Chemistry, and Microbiology*. Chapman and Hall, Angleterre, p.347-380.

Vasishtha, N. 2003. Microencapsulation: Delivering a Market Advantage. (page consultée le 12 septembre 2011). <http://www.preparedfoods.com/articles/microencapsulation-delivering-a-market-advantage>

Voo, W.-P., Ravindra, P., Tey, B.-T., Chan, E.-S. 2011. Comparison of alginate and pectin based beads for production of poultry probiotic cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111, p.294-299.

Appendice A

Graphique présenté dans l'article du chapitre 3 (Fortin *et al.*, 2011a), mais incluant tous les écarts-types des différents résultats.

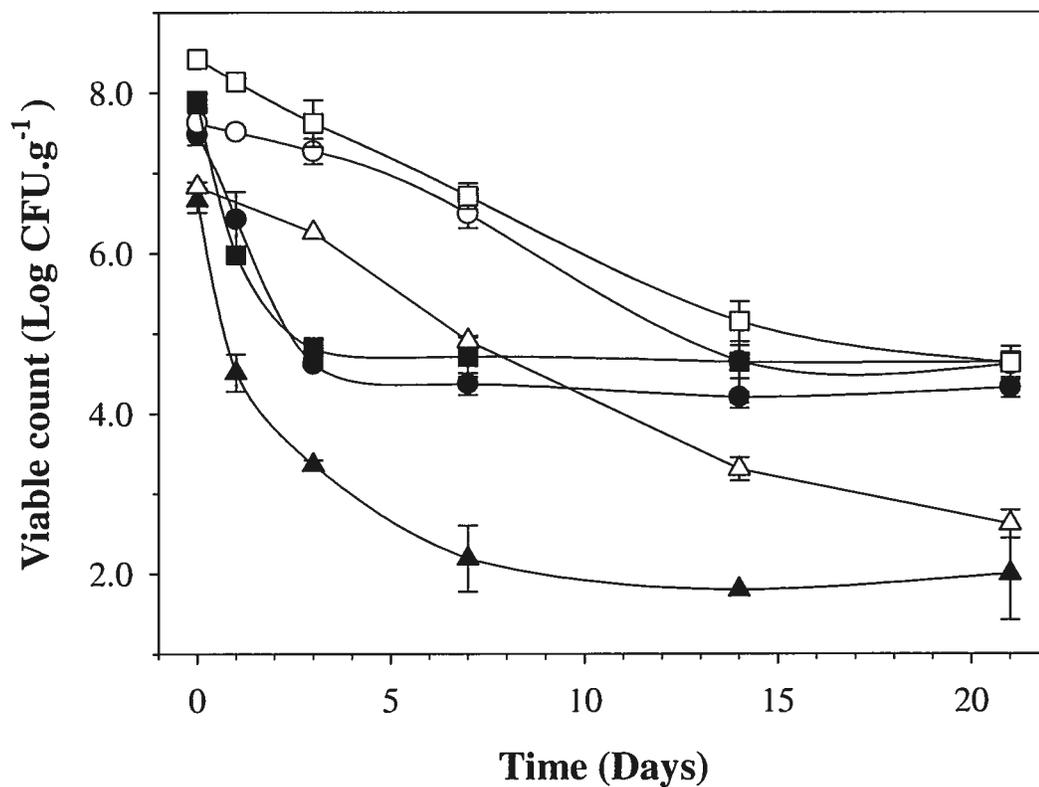


Figure 1: Viable counts of *B. longum* 15708 in model cheese throughout storage (1 day at 22°C and 20 days at 4°C).

Legend:

- Inoculation in milk/salted curds (····●····),
- Inoculation in milk/unsalted curds (····○····),
- Inoculation prior to cheddarization/salted curds (—▲—),
- Inoculation prior to cheddarization/unsalted curds (—△—),
- Inoculation at 10× prior to cheddarization /salted curds (---■---),
- Inoculation at 10× prior to cheddarization /unsalted curds (---□---

