

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

**Microencapsulation de probiotiques pour la fabrication d'un
fromage Cheddar fonctionnel**

Par
Khalié Mahamad Amine

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

Septembre 2013

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Marie-Elise Parent
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

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

Directeur de recherche

Monique Lacroix
INRS-Institut Armand-Frappier

Codirecteur de recherche

Claude Champagne
AAC-Centre de recherche et
développement sur les aliments

Résumé

Les aliments fonctionnels qui fournissent des avantages pour la santé au-delà de leur fonction nutritionnelle de base sont de plus en plus recherchés par les consommateurs. Plusieurs études cliniques quant à leur potentiel dans la prévention de certaines maladies ont été mises en évidence. Ainsi, l'utilisation des bactéries probiotiques a connu un essor considérable durant les dernières décennies. Les probiotiques sont incorporés avec succès dans plusieurs produits laitiers tels que le yogourt et les laits fermentés.

Cependant, le problème majeur suite à l'incorporation des probiotiques en matrice fromagère réside sur le fait que la plupart des probiotiques sont éliminés lors du drainage du lactosérum et ne sont pas recueillis dans le caillé. La présence de ferments lactiques affecterait aussi de façon significative la viabilité des probiotiques pendant la période de maturation. D'autres recherches ont aussi démontré que la présence de sel, d'acides organiques et d'oxygène nuirait également à la survie des probiotiques.

La stratégie technologique consistait à mettre au point une méthode de microencapsulation permettant de préserver la viabilité d'une souche probiotique. La souche choisie étant sensible à l'oxygène, deux méthodes de microencapsulation couramment employées dans l'industrie alimentaire et facilement réalisables ont donc été testées. Des polymères ont été modifiés chimiquement dans le but d'augmenter leur porosité et leur hydrophobicité afin de permettre une meilleure protection des cellules face aux facteurs environnants.

Les résultats obtenus suggèrent que les probiotiques microencapsulés ont une meilleure survie dans la matrice du fromage Cheddar, pendant l'entreposage et en conditions gastro-intestinales simulées. L'usage de ces techniques pourrait ainsi être appliqué pour d'autres souches sensibles à l'oxygène. Cette étude a permis de démontrer que les fromages fonctionnels développés pourraient contribuer à promouvoir la croissance et l'amélioration de la compétitivité de l'industrie laitière canadienne.

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche le Pr. Monique Lacroix de m'avoir accueillie dans son laboratoire en tant que stagiaire et par la suite de m'avoir impliqué dans un projet de maîtrise aussi intéressant. Un énorme merci à mon co-directeur Dr. Claude Champagne d'avoir accepté de codiriger ce travail.

Je tiens également à remercier Dr. Michel Britten, Dr. Daniel St-Gelais et Dr. Patrick Fustier pour leur aide et leurs précieux conseils scientifiques, ainsi que toutes les autres personnes que j'ai eu l'occasion de côtoyer à Agriculture et agroalimentaire Canada.

J'accorde une pensée particulière à tous les membres du laboratoire. Nous avons eu beaucoup de plaisir aussi bien à l'Institut qu'en dehors des laboratoires. Un grand merci à Stéphane Salmiéri pour son expertise, ses encouragements et son humour.

Je tiens également à remercier tous ceux qui m'ont soutenue de près ou de loin.

Un merci à mes enfants, Amine et Defallah, vous êtes pour moi une source d'enseillement et de joie.

À mon père Mahamad Amine Ben Barka, je te suis infiniment reconnaissante pour l'intérêt que tu portes pour l'éducation et que tu as su me transmettre. Et à ma mère Zahra Abakar Terap pour son soutien et son amour sans égard qui m'ont suivie même si j'étais à l'autre bout du monde.

À mes frères Salahadine, Nassir, Ahmad, Abakar, Barka et Abdelmoutalib, je compte sur vous pour faire mieux.

Enfin je remercie le FRQNT, le MAPAQ, Agriculture et agroalimentaire Canada et Novalait Inc. pour le soutien financier qu'ils m'ont octroyé pendant mes recherches, ainsi que les employés de Nordion international Inc. pour l'irradiation de mes échantillons.

Table des matières

Jury d'évaluation.....	ii
Résumé.....	iii
Remerciements.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des Tableaux	vii
Liste des Figures	viii
Liste d'abréviations.....	ix
Introduction.....	1
1. Les probiotiques.....	1
1.1. Historique des probiotiques.....	1
1.2. Définition	1
1.3. Classification des probiotiques.....	2
1.3.1. <i>Bifidobacterium longum</i> 15708.....	3
1.4. Avantages de la consommation de probiotiques	4
1.5. Désavantages	5
1.6. Les prébiotiques	6
2. Fromage	7
2.1. Historique du fromage.....	7
2.2. L'aspect économique du fromage : importation et exportation	8
2.3. Viabilité des bactéries probiotiques dans la matrice fromagère.....	9
2.4. Fromage Cheddar	10
2.4.1. Fabrication du fromage Cheddar	11
3. Microencapsulation.....	17
3.1. Historique et définition.....	17
3.2. Microencapsulation pour les bactéries probiotiques	19
3.3. Techniques de microencapsulation	20
3.3.1. «Spray drying».....	20
3.3.2. Gélification ionotropique	21
3.3.3. Coacervation	22
3.3.4. Interactions électrostatiques.....	23
3.3.5. Émulsion	23
3.3.6. «Spray chilling/spray cooling»	25

3.4. Polymères pour la microencapsulation de probiotiques.....	25
3.4.1. Alginate.....	26
3.4.2. Chitosane.....	29
3.4.3. Amidon	30
3.4.4. κ -carraghénane	32
3.4.5. Gomme de gellane et gomme de xanthane	33
3.4.6. Gélatine.....	35
3.4.7. Gomme arabique.....	35
4. Les aliments fonctionnels et nutraceutiques	36
4.1. Les aliments fonctionnels.....	36
4.2. Les produits nutraceutiques.....	37
5. Projet.....	37
5.1. Problématique.....	37
5.2. Hypothèses	39
5.3. Objectif du projet	40
5.4. Moyens pour atteindre les objectifs	41
6. Manuscrits.....	43
6.1. «Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of <i>Bifidobacterium longum</i> during freeze-drying».....	43
6.2. «Survival of microencapsulated <i>Bifidobacterium longum</i> in Cheddar cheese during production and storage».	70
Discussion et conclusion.....	99
Références.....	102

Liste des Tableaux

Introduction

Tableau 1 : Genres bactériens et levures considérés comme probiotiques.....	2
Tableau 2 : Premières dates enregistrées pour certaines variétés de fromages.....	8

Manuscrit «Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *Bifidobacterium longum* during freeze-drying».

Table 1 : Effect of freezing and freeze-drying on viability of free, encapsulated and microencapsulated <i>B. Longum</i> 15708.....	65
---	----

Manuscrit «Survival of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Cheddar cheese during production and storage».

Table 1 : Effect of freezing on viable counts of microencapsulated <i>B. longum</i> 15708. ...	93
Table 2 : Influence of storage at – 80°C on the survival of microencapsulated <i>B. longum</i> 15708.....	94
Table 3 : Effect of microencapsulation on viable counts of <i>B. longum</i> 15708 during Cheddar cheese production.	95

Liste des Figures

Introduction

Figure 1 : Organigramme pour la fabrication du fromage Cheddar	17
Figure 2 : Structure chimique de l'alginate représentée par un monomère d'acide mannuronique et un monomère d'acide guluronique	27
Figure 3 : Structure d'une boîte d'œuf d'un gel d'alginate formé par chélation des ions Ca^{2+}	28
Figure 4 : Représentation schématique de la <i>O</i> -palmitoylation de l'alginate	29
Figure 5 : Structure chimique du chitosane	30
Figure 6 : Structure de l'amylose (a) et l'amylopectine (b) qui forment l'amidon.....	31
Figure 7 : Structure chimique des disaccharides représentant le κ -carraghénane.....	32
Figure 8 : Motifs répétés de la gomme de gellane (a) et de la gomme de xanthane (b) ..	34
Figure 9 : Structure chimique de la gélatine	35

Manuscrit «Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *Bifidobacterium longum* during freeze-drying».

Fig. 1 : Encapsulation yield (%) in the extrusion method of encapsulated <i>B. Longum</i> 15708 in different concentrations of native and <i>O</i> -palmitoyl alginate	67
Fig. 2 : SEM micrographs of the surface of dried beads obtained by extrusion.....	68
Fig. 3 : SEM micrographs of the surface of dried microbeads obtained by spraying.....	69

Manuscrit «Survival of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Cheddar cheese during production and storage».

Fig. 1 : Viable counts of <i>B. longum</i> 15708 in model cheese throughout storage	97
Fig. 2 : Survival of free and microencapsulated <i>B. longum</i> 15708 after 1 h 30 incubation in simulated gastric fluid (pH 2.0) and 3 h in simulated intestinal fluid (pH 6.8).....	98

Liste d'abréviations

AAC: Agriculture et agroalimentaire Canada

AAFC: Agriculture and Agri-Food Canada

ADE : Air-flow droplet extrusion

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

ANOVA : Analyse de la variance

CaCl₂ : Chlorure de calcium

CFU/UFC : Colony forming unit/ unité formatrice de colonie

CRDA : Centre de Recherche et Développement sur les Aliments

EY : Encapsulation yield

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

FRQNT : Fonds de Recherche du Québec- Nature et technologies

GI : Gastrointestinal transit

GRAS : Generally Recognized As Safe

h : Heure (s)

HCl : Chlorure d'hydrogène

IBM : International Business Machines

INAF: Institut sur la nutrition et les aliments fonctionnels

JC : Jesus-Christ

KH₂PO₄ : Phosphate de potassium monobasique

kg : Kilogramme (s)

kPa: Kilopascal

LAB: Bactéries lactiques

log: logarithme

LP: Milieu à base de chlorure de lithium et de propionate

MAPAQ: Ministère de l'agriculture, de pêcheries et de l'alimentation du Québec

ME : Microencapsulation

min : Minute (s)

mg : Milligramme (s)

ml: Millilitre (s)

MRS: Milieu de Man, Rogosa et Sharpe

NA : Native alginate

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

OMS : Organisation mondiale de la santé

PA : *O*-Palmitoylated alginate

PASW : Predictive Analytics SoftWare

p/p : poids / poids

Psi : Pound per square inch / livre par pouce carré

RCM: Reinforced Clostridial Medium

SEM : Scanning electron microscopy

SGF : Simulated gastric fluid

SIF : Simulated intestinal fluid

TS: Test solutions

TGOS: Trans-galactooligosaccharides

USP : United States Pharmacopeia

VCC : Viable cell count / Viable cell concentration

v/v : volume / volume

w/v : weight / volume

w/w : weight / weight

Introduction

1. Les probiotiques

1.1. Historique des probiotiques

Le concept des probiotiques a évolué autour des années 1900, lorsque le prix Nobel Elie Metchnikoff émit l'hypothèse que la longévité des paysans bulgares a été le résultat de leur grande consommation de produits laitiers fermentés. Plus tard, il était convaincu que le yogourt contenait des organismes nécessaires pour protéger l'intestin de l'effet néfaste des autres bactéries. Les premiers essais cliniques n'ont été réalisés que dans les années 1930 sur l'effet des probiotiques sur la constipation. C'est ainsi que dans les années 1950, un produit probiotique a été agréé par le ministère de l'Agriculture des États-Unis en tant que médicament pour le traitement des diarrhées chez le porc. En 1974, la découverte par Mann et Spoerig que les personnes qui buvaient du yaourt fermenté avec des souches sauvages de *Lactobacillus* sp. avaient de très faibles taux de cholestérol dans le sang, ce qui a ouvert la voix à un nouveau domaine d'étude (Parvez *et al.*, 2006). Au même moment, d'autres chercheurs arrivent à la conclusion que les cellules de *Lactobacillus acidophilus* ajoutées aux aliments contribuent à diminuer le taux de cholestérol sérique chez les adultes. En 1994, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) considère les probiotiques comme le système le plus important pour la prochaine défense immunitaire lorsque les antibiotiques couramment prescrits seront sans effet pour la résistance aux antibiotiques (Parvez *et al.*, 2006).

1.2. Définition

Le terme « probiotique » qui signifie « pour la vie » a été employé pour la première fois par Lilly et Stillwell dans les années 1965 (Argyri *et al.*, 2012). Ce terme a été repris par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et c'est en 2001 que ces organismes

parviennent à la définition suivante : « Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet théoriquement bénéfique sur la santé de l'hôte » (Food and Agriculture Organization & World Health Organization, 2001).

1.3. Classification des probiotiques

Les micro-organismes les plus couramment utilisés comme probiotiques sont les bactéries lactiques (LAB) telles que les Lactobacilles et les Bifidobactéries (Sullivan & Nord, 2002). Plusieurs autres bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* sont aussi considérées comme des probiotiques. C'est également le cas pour certaines bactéries non-lactiques telles que la levure *saccharomyces boulardii* et *Escherichia coli* (*Nissle 1917*) (Tableau 1).

Tableau 1 : Genres bactériens et levures considérés comme probiotiques

Lactobacilles	Bifidobactéries	Autres bactéries lactiques	Autres
<i>L. acidophilus</i> *	<i>B. adolescentis</i> *	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i> (<i>Nissle 1917</i>)
<i>L. casei</i> *	<i>B. animalis</i> *	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i> *	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. breve</i> *	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. essensis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	
<i>L. fermentum</i> *	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. gasseri</i> *	<i>B. longum</i> *	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. helveticus</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. johnsonii</i> *			
<i>L. paracasei</i> *			
<i>L. plantarum</i> *			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i> *			
<i>L. salivarius</i> *			

*: Espèces bactériennes reconnues comme probiotiques par l'Agence canadienne d'inspection des aliments à titre d'allégations non associées à la souche.

(Holzapfel *et al.*, 1998; Klaenhammer & Kullen, 1999; Krasaekoopt *et al.*, 2003; Anal & Singh, 2007; Saad *et al.*, 2012)

Plusieurs caractéristiques spécifiques, telles que 1) l'origine de la souche (souche d'origine humaine pour un usage sur des humains), 2) la résistance aux acides gastriques et aux sels biliaires, 3) l'absence de toxicité et 4) la capacité à adhérer et à coloniser la muqueuse intestinale sont prises en considération pour permettre aux espèces et aux souches de bactéries d'être des probiotiques (Saarela *et al.*, 2000; Stropfova *et al.*, 2004; De Giulio *et al.*, 2005). Des tests *in vitro* doivent donc être réalisés afin de déterminer si les souches microbiennes remplissent les critères ci-haut cités. Toutefois, ces critères de sélection restent controversés parce que les mécanismes sous-jacents par lesquels les probiotiques exercent des rôles fonctionnels *in vivo* ne sont généralement pas connus (Klaenhammer & Kullen, 1999).

Il est important que la viabilité et l'activité métabolique des bactéries probiotiques soient maintenues durant tout le processus de transformation des aliments, de leur production jusqu'à leur ingestion par le consommateur. La concentration de micro-organismes probiotiques nécessaires pour avoir des effets bénéfiques varie en fonction de la souche et l'effet santé désiré. Toutefois, une concentration de 10^8 unités formatrice de colonies (UFC) par g ou ml d'aliment est recommandée (Cruz *et al.*, 2009).

1.3.1. *Bifidobacterium longum* 15708

Les bifidobactéries sont des bactéries Gram-positives, anaérobies, en forme de tige et qui font partie du microbiote du colon humain. Ces bactéries jouent d'importants rôles sur la santé humaine en augmentant l'immunité humorale et en maintenant l'équilibre de la microflore intestinale. Par conséquent, les bifidobactéries ont été largement intégrées dans divers produits laitiers au cours des dernières années. Cependant, la population de bifidobactéries dans la microflore intestinale humaine diminue avec l'âge, et elle est influencée par des facteurs tels que les troubles gastro-intestinaux et les traitements par antibiotiques (Cui *et al.*, 2000). Chez les nourrissons allaités, les bifidobactéries représentent jusqu'à 91% de la flore intestinale totale dont l'espèce *Bifidobacterium longum* constitue l'une des espèces majoritaires. Des études ont démontré que la

consommation de *B. longum* contribue à l'action antagoniste contre des pathogènes intestinaux, procure un effet anti cancérigène et contrôle les taux de cholestérol sérique (Rahman *et al.*, 2009).

B. longum 15708 fournie par ATCC est une souche reconnue pour sa sensibilité à l'oxygène et aux conditions acides (Bolduc *et al.*, 2006; Kheadr *et al.*, 2007). La culture se fait généralement en conditions anaérobies pendant 24 à 48 h dans le milieu de Man, Rogosa et Sharpe (MRS) supplémenté de cystéine avec une température optimale de croissance de 37°C (Matamoros *et al.*, 2011). Des tests réalisés avec cette souche ont décelé une forte production de β -galactosidase lorsque le pH du milieu de culture est ajusté à 6.5 (Hsu *et al.*, 2007). Cependant, d'autres études ont démontré que cette souche est peu résistante à la pénicilline (Kheadr *et al.*, 2007).

1.4. Avantages de la consommation de probiotiques

Différentes études ont été menées au cours des dernières années sur les effets bénéfiques des bactéries probiotiques sur la santé humaine. L'obtention de ces effets bénéfiques dépend d'une souche à une autre mais aussi de la quantité de bactéries retrouvées au site d'action. Ainsi, une consommation régulière de probiotiques est donc nécessaire pour bénéficier des avantages offerts par les probiotiques.

Voici quelques un de ces effets cliniques qui ont été observés lors de certaines études chez l'homme : 1) antibactérien, 2) prévention ou réduction de la prévalence des allergies chez les personnes sensibles, 3) antimutagène, 4) anticancéreux, 4) contrôle du taux de cholestérol sérique, 5) antihypertenseur, 6) anti-ostéoporose, 7) immunomodulatrice, 8) traitement des diarrhées associées aux traitements antibiotiques et les infections gastro-intestinales 9) diminution de l'intolérance au lactose, 10) soulagement des symptômes des maladies inflammatoires de l'intestin, le syndrome du côlon irritable, les colites, la constipation et les maladie alcoolique du foie 11) réduction du risque pour les cancers du côlon, du foie et du sein (Bielecka *et al.*, 2002; Kaur *et al.*, 2002; Iyer & Kailasapathy,

2005; Aureli *et al.*, 2011; Argyri *et al.*, 2012). Parmi tous les effets cliniques cités ci-haut, les diarrhées et la digestion du lactose sont les mieux établies (Sazawal *et al.*, 2006).

1.5. Désavantages

L'usage des probiotiques comporte des avantages mais aussi des désavantages. Des études utilisant différentes souches de probiotiques ont montré que certaines souches probiotiques disparaissent du tractus gastro-intestinal généralement au bout de quelques semaines après que la consommation est interrompue. Pour avoir des effets positifs, une consommation de probiotiques à long terme serait nécessaire. Ce qui pourrait être une tâche très coûteuse (Saarela *et al.*, 2000).

Malgré le fait que les probiotiques ont été consommés en toute sécurité et en grandes quantités au cours des années, de sévères infections peuvent survenir occasionnellement, en particulier chez les patients immunosupprimés. Certaines souches de *L. rhamnosus* isolées d'une dame âgée ayant des antécédents de diabète et d'hypertension seraient responsables d'un abcès au niveau du foie. Dans un autre cas, *L. rhamnosus* est soupçonné d'avoir causé une endocardite chez un homme âgé (Saarela *et al.*, 2000).

Il est aussi important de noter que de nombreuses allégations de santé des probiotiques n'ont pas encore été suffisamment confirmées par des preuves expérimentales. Aussi, les mécanismes qui sous-tendent l'action des probiotiques n'ont pas encore été complètement élucidés. L'efficacité des probiotiques pour le traitement de certaines maladies telles que la maladie de Crohn reste ambiguë, plus d'essais cliniques randomisés sont encore nécessaires pour mieux définir le rôle des probiotiques comme agents préventifs et thérapeutiques. En outre, l'efficacité démontrée pour une souche bactérienne donnée ne peut pas être nécessairement transférée à d'autres organismes probiotiques (Wohlgemuth *et al.*, 2010; Saad *et al.*, 2012).

1.6. Les prébiotiques

Le terme « prébiotique » a été introduit pour la première fois en 1994 par Delzenne and Roberfroid pour désigner les oligosaccharides non digestibles. Un an plus tard, Gibson et Roberfroid reconnaissent les prébiotiques comme étant des ingrédients alimentaires qui sont non dégradés dans l'intestin grêle et peuvent produire des effets bénéfiques chez l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et / ou l'activité d'un ou d'un nombre limité de bactéries. Le rôle des prébiotiques dans le tractus gastro-intestinal est mieux connu que celui des probiotiques (Bielecka *et al.*, 2002; Marteau & Boutron-Ruault, 2002). Comme d'autres glucides digestibles, les prébiotiques exercent un effet osmotique dans le tractus gastro-intestinal tant qu'ils ne sont pas fermentés. Lorsque fermentés par la flore endogène, c'est à dire à l'endroit où ils présentent leur effet prébiotique, ils augmentent parfois la production de gaz intestinaux. Les prébiotiques ont donc le risque théorique d'augmenter la diarrhée dans certaines situations (en raison de l'effet osmotique). Un des désavantages serait le fait d'être mal tolérés chez les patients atteints du syndrome du côlon irritable (Marteau & Boutron-Ruault, 2002).

D'autres effets induits par les prébiotiques sont associés à la fonction colique et le métabolisme, comme une augmentation de l'expression ou de changement dans la composition des acides gras à chaîne courte, une augmentation du poids fécal, une diminution du pH luminal du côlon (Saad *et al.*, 2012).

Une activité prébiotique a été attribuée à de nombreux composants alimentaires entre autres les oligosaccharides et polysaccharides. Toutefois, plusieurs d'entre eux ne possèdent pas les critères requis pour être considérés comme prébiotiques, à savoir :

1. résiste au processus de digestion d'absorption et d'adsorption dans l'intestin;
2. est fermenté par la flore qui colonise le système gastro-intestinal;
3. stimule de manière sélective la croissance et / ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries dans le système gastro-intestinal (Gibson, 2004).

Le concept des prébiotiques a été mis au point afin de stimuler sélectivement les probiotiques dans l'intestin en augmentant leur capacité métabolique. L'utilisation combinée des probiotiques et des prébiotiques de façon synergique donne lieu aux synbiotiques. Un des exemples est l'utilisation de l'inuline ou des transgalactooligosaccharides (TGOS) en combinaison avec les souches de *L. plantarum*, *L. paracasei*, ou *B. bifidum* inhibent plusieurs bactéries pathogènes tels que *E. coli*, *Campylobacter jejuni* (Gibson, 2004; Saad *et al.*, 2012).

2. Fromage

2.1. Historique du fromage

Le fromage est le nom générique pour un groupe de produits à base de lait fermenté produits à travers le monde dans une grande diversité de saveurs, de textures et de formes. La fabrication du fromage est une forme de conservation du lait, car ce dernier est très périssable. C'est un aliment très nutritif puisqu'il contient la plupart des protéines, le gras, les vitamines et minéraux essentiels ainsi que d'autres nutriments du lait sous forme concentrée.

Le fromage est un aliment très ancien dont la date exacte de découverte reste inconnue. La légende raconte que le fromage a évolué dans le croissant fertile entre le Tigre et l'Euphrate, en Irak, il ya quelques 8000 ans. Ce qui correspond à la remonté de la civilisation à travers le Moyen-Orient, l'Égypte, la Grèce et Rome. À cette période, la fabrication du fromage était bien établie dans l'empire romain et ce produit était inclus dans les rations des soldats romains. Il y a plusieurs références sur l'utilisation du fromage dans l'Ancien Testament (Jacob (1520 avant JC) et Samuel (1170-1017 avant JC), sur les murs des tombes d'Égypte ancienne et dans la littérature grecque classique incluant Homère (12 siècle avant JC), Hérédote (484-408 avant JC) et Aristote (384-322 avant JC) (Fox, 1988).

Au fil des années, différents fromages ont été créés et adoptés (Tableau 2) dans plusieurs pays à travers le monde, ce qui inclut l'Espagne, l'Italie, la Nouvelle-Zélande, les États-Unis, la France et le Canada. Une cause principale de la variation dans les caractéristiques du fromage est la nature du lait. Ainsi, plusieurs fromages sont faits à base de lait de vache, mais le lait de chèvre, de brebis et de bufflonne sont aussi couramment employés. Le fromage Mozzarella fait à base du lait de bufflonne et le fromage Roquefort obtenu à base du lait de brebis en sont des exemples (Fox, 1988). Les matrices fromagères peuvent être désignées comme molle, semi-ferme (semi-dure), dure ou très dure, en fonction de leur teneur en humidité (Gomes da Cruz *et al.*, 2009).

Tableau 2: Premières dates enregistrées pour certaines variétés de fromages

Nom de fromage	Date	Nom de fromages	Date
Gorgonzola	897	Cheddar	1500
Schabzieger	1000	Parmesan	1579
Roquefort	1070	Gouda	1697
Maroilles	1174	Gloucester	1783
Schwangenkase	1178	Stilton	1785
Grana	1200	Camembert	1791
Taleggio	1282	St Paulin	1816

(Fox, 1988)

2.2. L'aspect économique du fromage : importation et exportation

La consommation de fromage a augmenté dans la dernière décennie dans la plupart des pays, sans rapport avec le niveau socio-économique du pays. Au Canada, on retrouve plus 660 variétés de fromages sur les tablettes d'épicerie dépendamment du type de lait, la catégorie de fromage, le type de traitement, la composition en gras et la période d'affinage. On compte ainsi une production fromagère de plus de 413 000 tonnes pour l'année 2010, ce qui représente une augmentation de plus de 9 000 tonnes comparativement à l'année 2009. De tous les fromages ou autres dérivés du fromage (fromages fondus, fromages fins) produits au pays, 21.6 % sont destinés à l'exportation.

L'importation canadienne du fromage et de ses dérivés représente quant à elle 40.4% de tous les produits laitiers importés (Canadian Dairy Commission *et al.*, 2012).

2.3. Viabilité des bactéries probiotiques dans la matrice fromagère

Au cours des deux dernières décennies, de nombreux chercheurs se sont penchés sur les aspects nutritionnels et thérapeutiques des probiotiques. Le fruit de leur travail suggère que les cultures lactiques et leurs produits fermentés peuvent offrir plusieurs avantages nutritionnels et thérapeutiques pour les consommateurs.

Ces dernières années, plusieurs études soutiennent l'hypothèse que le fromage est un support plus adéquat que le lait fermenté pour le transport des probiotiques. Le pH plus élevé et la teneur élevée en matières grasses ainsi que la matrice solide de fromage peuvent protéger les bactéries de manière plus efficace que dans un environnement fluide pendant le stockage des aliments et leur transit à travers le corps humain (Bergamini *et al.*, 2005). En outre, la faible teneur en oxygène et le pouvoir tampon de certaines matrices fromagères fournissent un environnement anaérobique capable d'augmenter la survie de plusieurs souches probiotiques (Özer *et al.*, 2009). A cet effet, différents fromages renfermant différentes sortes de bactéries probiotiques ont vu le jour (Dinakar & Mistry, 1994; O'Riordan & Fitzgerald, 1998; Gardiner *et al.*, 2002; Ozer *et al.*, 2008; Bergamini *et al.*, 2010).

En général, un fromage probiotique devrait avoir les mêmes compositions et caractéristiques que le fromage traditionnel. L'incorporation de bactéries probiotiques ne devrait pas entraîner une perte de qualité du produit (saveur, texture et apparence). Grâce à son processus de fabrication, le fromage frais semble être parfaitement adapté à servir de support pour les bactéries probiotiques car il est un fromage non affiné, est soumis à des températures de réfrigération pendant l'entreposage et sa durée de vie est plutôt limitée (courte) (Gomes da Cruz *et al.*, 2009).

Toutefois, la survie des probiotiques dans la matrice fromagère peut être affectée par plusieurs facteurs tels que la présence de sel, l'acidité, le changement de température et le stress oxydatif (Bergamini *et al.*, 2005). Ces facteurs peuvent varier d'une souche à une autre. Pour contrer ces effets, les chercheurs ont fait appel à des techniques telles que la microencapsulation des cellules pour la préservation des probiotiques. Cette technique serait un atout considérable pour les probiotiques sensibles à l'oxygène et permettrait ainsi aux souches de survivre et de croître en toutes circonstances.

Une interaction entre les ferments lactiques, les moisissures et les probiotiques peut aussi survenir pendant la fabrication ou la maturation du fromage (Bergamini *et al.*, 2005). L'inhibition des bactéries nécessaire à la fabrication du fromage par des bactériocines est donc à considérer.

Cependant, le principal défi pour la fabrication d'un fromage enrichi en probiotiques consiste à maintenir une viabilité pendant la période de maturation. Cette étape est critique puisque le pH change et les bactéries doivent être capables de survivre et se développer jusqu'à la fin de la période de maturation. Celle-ci peut facilement dépasser 1 an pour certains fromages tels que le fromage Cheddar. Il serait donc important de s'assurer que la dose de probiotiques recommandée pour avoir un effet bénéfique, à savoir 10^7 - 10^8 UFC/g d'aliment, doit être respectée et viable jusqu'au moment de la consommation du produit (Gomes da Cruz *et al.*, 2009).

2.4. Fromage Cheddar

L'origine du mot « Cheddar » découle du village Cheddar dans la région de Somerset en Angleterre (Fox, 1988). Étant le fromage le plus consommé au monde, le fromage Cheddar représente 40% de la production fromagère totale au Canada (Fortin *et al.*, 2011). Ce qui se chiffre à un peu plus de 138 000 tonnes pour l'année 2010 (Canadian Dairy Commission *et al.*, 2012).

Le fromage Cheddar est un support approprié pour la livraison des probiotiques en raison de sa teneur élevée en matières grasses et du fait qu'il a un pH (pH de 5.5) supérieur aux autres aliments fermentés traditionnels. Ce type de matrice peut offrir une protection aux micro-organismes ingérés lors de leur passage à travers le tractus gastro-intestinal (Mc Brearty *et al.*, 2001; Burgain *et al.*, 2011). Cette hypothèse a été confirmée par l'équipe de Gardiner *et al.* (1999) qui soutient que le fromage Cheddar a mieux préservé la viabilité de *Enterococcus faecium* que le yaourt (Gomes da Cruz *et al.*, 2009). D'autres chercheurs ont aussi démontré que le fromage Cheddar a permis une meilleure survie de bifidobactéries pendant plusieurs mois d'entreposage (Dinakar & Mistry, 1994; Mc Brearty *et al.*, 2001).

2.4.1. Fabrication du fromage Cheddar

La fabrication d'un fromage réside sur une série d'événements biochimiques qui, si elles sont synchronisées et équilibrées, conduisent à des produits aux arômes et saveurs hautement souhaitables. Il est donc important de respecter tous les paramètres afin d'obtenir le produit fini souhaité.

Bien que les protocoles de fabrication des différents fromages diffèrent dans les détails, les étapes de base sont communes à la plupart des variétés, qui sont: l'acidification, la coagulation, la déshydratation (coupe du coagulum, la cuisson, le brassage, le pressage et d'autres opérations qui favorisent la synérèse du gel), la mise en forme (le moulage et le pressage) et le salage (Figure 1).

Voici les grandes lignes pour la fabrication du fromage Cheddar telles que décrites par Vignola (2002)

- **Standardisation du lait**

La standardisation du lait de fromagerie consiste à ajuster la teneur en matière grasses en fonction du taux protéique. Ceci a pour objectif d'éliminer les fluctuations saisonnières afin d'obtenir un même comportement rhéologique des laits à la coagulation et les mêmes rendements fromagers pour une même quantité de lait mise en œuvre tout l'année. Ainsi le rapport protéine : gras doit être de 0.865.

- **Traitement du lait**

Le traitement du lait constitue une étape importante du procédé de fabrication fromagère. Cette étape peut se faire de plusieurs façons parmi lesquelles la pasteurisation, l'irradiation et la micro-filtration, dont le prétraitement le plus commun est la pasteurisation du lait. À cet effet, une température de 72°C est appliquée au lait pendant 15 secondes. La pasteurisation du lait est devenue une étape obligatoire avant la fabrication du fromage frais afin de maintenir une qualité uniforme et promouvoir la sécurité alimentaire. Ainsi, certains agents pathogènes retrouvés dans le lait cru tels que *Salmonella*, *Escherichia coli* O157: H7 et *Listeria monocytogenes* peuvent facilement être éliminés par la pasteurisation (Pandey *et al.*, 2003). Le chlorure de calcium est aussi ajouté à raison de 0.2% et ceci dans le but de faciliter la coagulation du lait. Des colorants naturels tels que l'annatto peuvent être aussi ajoutés au lait dans le but d'obtenir la couleur orangée.

- **Coagulation du lait**

La coagulation correspond à une déstabilisation des micelles de caséines qui flocculent puis se soudent pour former un gel emprisonnant les éléments solubles du lait. La coagulation peut se faire de trois manières : par acidification, par l'action d'une enzyme ou par l'action combinées des deux. Dans le cas du fromage Cheddar, c'est la coagulation enzymatique en plus de l'ajout de ferments lactiques qui sera appliquée. Pour ce faire, des

enzymes protéolytiques capables de coaguler le lait sont utilisées. Ces enzymes peuvent être d'origine animale, végétale ou microbienne. La présure d'origine animale constituée principalement de chymosine et d'un peu de pepsine est le coagulant le plus utilisé. Elle appartient à la famille des endopeptidases, c'est-à-dire des protéases qui agissent à l'intérieur des chaînes polypeptidiques constituant les protéines. Lors du procédé de coagulation, une certaine quantité de présure demeure emprisonnée dans le caillé et c'est cette dernière qui amorcera l'affinage.

L'action des ferments lactiques se caractérise par la production d'acide lactique. En effet, le ferment lactique transforme le lactose en acide lactique. Il y aura donc une diminution du pH du lait, ce qui provoque une solubilisation du phosphate de calcium, un élément important dans la stabilisation des micelles des caséines. Lorsque le pH atteint le point isoélectrique des caséines (pH=4,6), les sous-micelles s'associent par des liaisons électrostatiques et hydrophobes pour former un gel lactique qui emprisonne toute son eau.

Les ferments lactiques choisis jouent un rôle important sur les caractéristiques recherchées du fromage (qualités organoleptiques). On retrouve généralement les bactéries du genre *Lactococcus* telles que *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

En pratique, après la pasteurisation du lait, ce dernier est refroidi et maintenu à une température de 31°C sous agitation constante. Une fois le CaCl₂ ajouté, les ferments lactiques sont incorporés à leur tour au lait et mélangés pendant 10 min. Une incubation de 30 min au repos va permettre d'abaisser le pH et la présure pourrait être ajoutée. Cette dernière sera mélangée aux autres constituants et laissée au repos pendant une trentaine de minutes pour permettre la coagulation du lait (Darukaradhya *et al.*, 2006).

La coagulation du lait se caractérise par trois paramètres : le temps de prise (temps de floculation), le taux (vitesse) du raffermissement et la fermeté maximale du gel. Plusieurs facteurs tels que la composition du lait, la concentration d'enzymes, la concentration de CaCl₂ et la température peuvent influencer la coagulation du lait. Pour cette dernière, la

coagulation sera lente à une température entre 10 et 20°C. Elle devient progressive lorsque la température se situe 30 et 42°C. À 42°C, la coagulation diminue pour complètement disparaître autour de 55°C. Ce qui est aussi le cas pour des températures en dessous de 10°C.

- **Égouttage**

La synérèse est un phénomène biochimique et physico chimique suivant lequel un caillé formé soit par voie enzymatique ou soit par voie lactique se contracte continuellement et expulse spontanément le lactosérum. L'égouttage va donc jouer un rôle sur l'accélération de la synérèse et sur la séparation du lactosérum du caillé. Lors de cette étape, la plus grande partie des éléments solubles sont éliminés dans le lactosérum.

Pour permettre une meilleure exsudation, le caillé est découpé en petits cubes à l'aide de couteau renfermant des cordes métalliques. Les grains sont brassés dans le lactosérum et chauffé à une température pouvant aller jusqu'à 38°C. La cuisson débute donc au même moment. L'opération du brassage est nécessaire puisqu'elle empêche les grains de s'agglomérer en masse, ce qui ralentirait l'évacuation du lactosérum.

- **Cuisson**

Pendant la cuisson, la température est montée graduellement de 30 à 40°C pour atteindre un pH de 6.1. Il est important de ne pas dépasser cette dernière température pour ne pas nuire à l'activité fermentaire et trop ralentir l'acidification ultérieure nécessaire à l'égouttage.

L'augmentation de la température et le temps d'incubation sont des paramètres à contrôler avec précision pour obtenir une humidité et des textures reproductibles. Ainsi, une augmentation de la température de façon graduelle éviter la formation d'une peau, appelé coiffe, à la surface des grains. Ces derniers expulsent plus difficilement le

lactosérum et restent donc plus humides. En règle générale, la température doit être augmentée de un à deux degrés Celsius toutes les cinq minutes.

- **Cheddarisation**

La soudure des grains obtenus précédemment se fait par une série de retournements et d'empilement des blocs de caillé. Les grains tout en se soudant, s'étirent et forment des filaments dont la texture rappelle la chair de poulet. Ces étapes donnent au fromage une texture finale plus lustrée et plus lisse. Durant ce processus, les bactéries lactiques continuent à se multiplier et l'acidité développée solubilise le phosphate de calcium et favorise la perméabilité de la pâte. Le lactosérum pendant ce temps continue de se drainer. Ce long travail dure de 60 à 90 min jusqu'à l'obtention d'un pH d'environ 5,2.

- **Salage**

Cette étape consiste à ajouter du sel à une concentration de plus ou moins 2.7 % (p/p) afin de rehausser la saveur finale, mais aussi de compléter l'égouttage sous l'effet de la pression osmotique. L'ajout de sel contribue aussi à arrêter l'acidification du caillé et contrôler le développement des bactéries nuisibles ou pathogènes. Il n'en résultera que les microorganismes utiles à l'affinage du fromage.

Dans le cas du fromage Cheddar, le sel est directement incorporé dans les grains de fromage avant la mise en moule. Pour certains types de fromages, le salage se fait en saupoudrant et en frottant régulièrement chacune des surfaces du fromage avec sel. Cette technique à sec évite de mouiller la surface et permet de la faire croûter. C'est le cas du fromage Gruyère. Une autre méthode de salage consiste à plonger les blocs de fromage dans un bac de saumure pendant 15 min ou jusqu'à 2 jours.

- **Moulage et pressage**

Il existe 2 types de fromage Cheddar, le fromage Cheddar en bloc et celui en grains. Pour ce dernier cas, l'étape du pressage n'a pas lieu.

Le pressage permet de donner la forme finale du fromage tout en évacuant le lactosérum extragranulaire. Pour ce faire, le caillé est déposé dans des moules et une pression variant de 0.2 à 6 psi (1,5 à 40 kPa) y est appliquée. Le temps de pressage varie de 2 à 24 h et la température doit être maintenue entre 20 et 30°C. Lors du pressage, l'acidité peut augmenter légèrement dans le but de favoriser le drainage de l'eau.

- **Affinage ou maturation**

Afin d'obtenir la texture désirée, le Cheddar nouvellement fabriqué doit subir une période de maturation. Ce n'est pas le cas pour le fromage Cheddar en grains. Au Royaume-Uni par exemple, la période de maturation varie entre 3 et 12 mois, mais peut être aussi longue que 24 mois. La température lors de la maturation est comprise entre 5 et 12°C, et l'humidité relative peut varier entre 87 et 95% pour les fromages qui ne sont pas emballés sous vide (Hort & Le Grys, 2001). C'est durant la phase de maturation que les saveurs et la texture caractéristique des variétés individuelles de fromage se développent. Le bon déroulement de l'affinage repose donc sur le contrôle de ces paramètres qui vont agir sur le développement des microorganismes et l'activité enzymatique qui en découle.

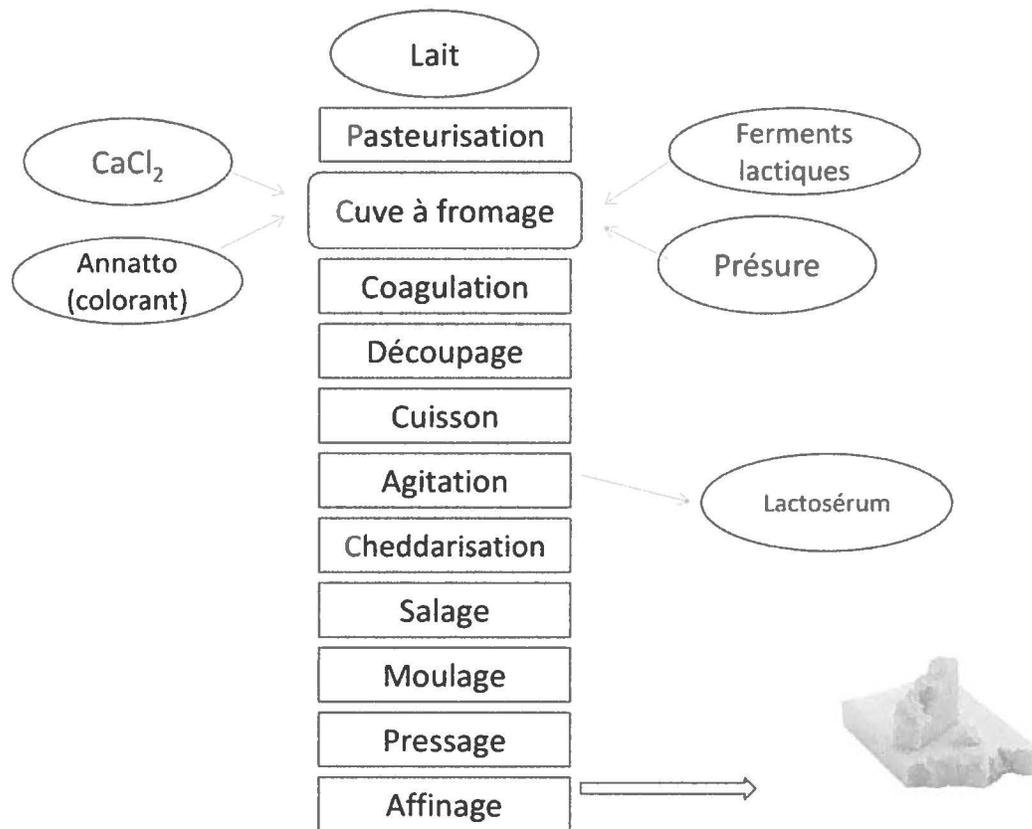


Figure 1: Organigramme pour la fabrication du fromage Cheddar (adapté de Darukaradhya *et al.* (2006))

3. Microencapsulation

3.1. Historique et définition

La microencapsulation se définit comme le procédé par lequel on enferme des matières solides, liquides ou gazeuses dans des microcapsules qui libèrent leur contenu de façon contrôlée sur une période de temps prolongée (Champagne & Fustier, 2007). Cette technique a été développée pour la première fois dans les années 50 pour la fabrication du papier autocollant (Madene *et al.*, 2006). Elle a par la suite été utilisée pour masquer le

goût désagréable de certains ingrédients ou tout simplement transformer des substances liquides en solides. De nos jours, elle sert à la protection de différentes molécules telles que les huiles, les colorants, les composés aromatiques, les vitamines, les minéraux et les microorganismes vivants. Au cours des deux dernières décennies, la microencapsulation a reçu une attention croissante dans divers domaines de la recherche fondamentale (pharmaceutique, chimique, cosmétique et alimentaire) et les applications industrielles. Toutefois, ces dernières années, le concept de libération contrôlée de l'ingrédient encapsulé au bon endroit et au bon moment est devenu un critère à considérer. Ce critère permettrait d'améliorer l'efficacité des additifs, d'élargir le domaine d'application des ces substances et d'assurer un dosage optimal (Gouin, 2004; Madene *et al.*, 2006).

Parmi les autres avantages que procure la microencapsulation, on peut citer :

- Empêcher l'exposition des substances à des facteurs défavorables (oxydation, chaleur, acidité, humidité)
- Préserver les propriétés fonctionnelles des agents actifs encapsulés
- Ralentir le transfert de substances encapsulées à l'extérieur de la matrice (Desai & Park, 2005)

Les ingrédients à revêtir sont dénommés noyau, phase interne ou encapsulât tandis que la couche qui forme la microcapsule se nomme aussi la paroi, la capsule, la phase externe ou la membrane. L'enveloppe de la capsule peut être constituée d'une seule ou de plusieurs membranes dans laquelle peuvent être insérés plusieurs noyaux. Les capsules sont généralement de formes sphériques mais des formes irrégulières peuvent aussi être retrouvées dépendamment du type de revêtement, de la méthode d'encapsulation et du produit à encapsuler. La surface des capsules peut être lisse ou rugueuse. La taille des capsules varie généralement d'un micron à quelques millimètres (Saraf *et al.*, 2007). Ainsi, le préfixe « nano » est employé pour des tailles variant de quelques nanomètres à un micromètre, tandis que le préfixe « micro » est utilisé pour représenter des tailles pouvant aller jusqu'à mille micromètres (Vandamme *et al.*, 2007). La libération des substances encapsulées peut se produire en raison de l'effet d'un solvant, suite à la dissolution ou la rupture de la capsule, ou par diffusion contrôlée. Ce dernier effet est

commandé par un gradient de concentration et de forces d'attraction intermoléculaires (Bertolini *et al.*, 2001).

3.2. Microencapsulation pour les bactéries probiotiques

La microencapsulation est une technique prometteuse pour la protection des cellules bactériennes et plusieurs études ont été menées sur le rôle protecteur de cette technique contre des conditions défavorables pour lesquelles les probiotiques peuvent être exposés (Brinques & Ayub, 2011). Parmi ces facteurs néfastes, on retrouve les conditions gastriques ainsi que le stress encourus lors du procédé de la transformation des aliments (changement de température, pH, oxygène, exposition de longue durée à des températures ambiantes, entreposage).

Diverses techniques de microencapsulation des cellules viables ont été employées utilisant des polymères naturels et synthétiques. Cependant, les matériaux et les conditions de formulation utilisés devraient être doux et non toxiques. Ceci permettra d'assurer la viabilité des probiotiques lorsque ces derniers sont destinés pour l'administration orale au niveau de l'intestin (Jankowski *et al.*, 1997). Aussi, le choix de la technique de microencapsulation est primordial puisqu'il détermine la taille des capsules qui seront produites. Ainsi, l'emploi de microcapsules n'aura pas d'effet sur les propriétés organoleptiques, contrairement à des capsules plus grosses.

La microencapsulation a permis d'incorporer avec succès des bactéries probiotiques dans divers produits alimentaires tels que les yogourts, les laits fermentés (Sultana *et al.*, 2000; Sun & Griffiths, 2000), les crèmes glacées (Godward & Kailasapathy, 2003) et le fromage (Wick *et al.*, 2004; Fortin *et al.*, 2011). Cependant, certaines études ont démontré des résultats moins satisfaisants suite à la microencapsulation. Cela peut dépendre de la capacité des bactéries à résister aux différents facteurs externes auxquels elles sont exposées, aussi bien lors de la microencapsulation que lors de l'entreposage du produit. Le passage de l'échelle de laboratoire à l'échelle industrielle s'avère ne pas toujours être facile puisque les résultats peuvent différer dépendamment du type

d'appareil, du temps alloué et les produits utilisés pour la préparation des cellules encapsulées (Kailasapathy, 2002).

3.3. Techniques de microencapsulation

Plusieurs techniques pour la microencapsulation ont été développées au cours des années et utilisées avec succès dans l'industrie alimentaire. En voici quelques exemples.

3.3.1. «Spray drying»

C'est le procédé de microencapsulation le plus couramment utilisé dans l'industrie alimentaire pour la préparation de produits secs. Il est flexible, économique, facilement réalisable à grande échelle et utilise des équipements déjà présents en industrie. Dans ce procédé, la matière à encapsuler est homogénéisée par émulsion ou par dispersion avec la solution de polymère, suivie d'une pulvérisation à l'aide d'air ou d'azote comprimé du mélange dans la chambre de séchage. L'air chaud contenu dans la chambre de séchage mène à l'évaporation du solvant (eau). Des microcapsules séchées de type matriciel seront formées et recueillies dans le fond du séchoir (Gibbs *et al.*, 1999; Kailasapathy, 2002). Cette méthode génère des microcapsules de tailles variées qui généralement n'excèdent pas 10 μm de diamètre (<10 μm) (O'riordan *et al.*, 2002).

L'inconvénient de cette technique est qu'elle requiert des températures élevées pour le séchage, et en conséquence, pourrait affecter la viabilité des souches bactériennes utilisées. À cet effet, le réglage et le contrôle de certains paramètres tels que la température pour atteindre les cultures viables doivent être contrôlés (Kailasapathy, 2002). Aussi, l'exposition de certains probiotiques à l'oxygène affecte leur viabilité. Cependant, plusieurs études ont démontré une importante viabilité de probiotique lorsque les cellules ont été encapsulées par spray-drying (Gibbs *et al.*, 1999; Gardiner *et al.*, 2000; O'riordan *et al.*, 2002).

3.3.2. Gélification ionotropique

La microencapsulation par gélification ionotropique est le procédé le plus ancien et le plus commun pour la production de capsules hydrocolloïdales. En général, il s'agit d'une méthode simple, peu coûteuse et douce, ce qui assure la viabilité relativement élevée de cellules probiotiques (Kailasapathy, 2002).

Le principe consiste à préparer dans un premier temps une solution d'hydrocolloïde, tel que l'alginate dans laquelle on rajoute les probiotiques, ce qui constitue la suspension cellulaire. L'usage de seringues ou de buses de pulvérisation est nécessaire pour la pulvérisation du liquide dans le but de former des gouttelettes sphériques. Le mélange bactérien est alors projeté sous agitation continue à l'aide d'un barreau magnétique dans la solution de durcissement constituée de cations polyvalents, généralement de calcium sous forme de chlorure de calcium. Des liaisons transversales entre les molécules de l'alginate et le calcium sont formées, résultant en la formation de microgels sphériques et insolubles (Kailasapathy, 2002).

La taille des microcapsules obtenues avec la seringue varie de 2-3 mm tandis que celle avec la buse de pulvérisation sont encore beaucoup plus petites. Plusieurs autres paramètres influencent la taille des microcapsules tels que le type et la concentration de l'alginate (viscosité de la solution), le diamètre de l'orifice de l'aiguille ainsi que la distance entre la seringue et la solution de durcissement (Kailasapathy, 2002; Mortazavian *et al.*, 2007).

Le désavantage de cette technique est que les microcapsules peuvent facilement être détruites si elles sont exposées dans un milieu contenant des phosphates et des citrates. Aussi, les microbilles générées ont des tailles légèrement supérieures à celles obtenues avec les autres procédés, ce qui pourrait affecter la texture des produits dans lesquels elles seront introduites (Champagne & Fustier, 2007).

3.3.3. Coacervation

Le terme coacervation a été introduit en 1930 par Bungenberg et Kruyt désignant un processus dans lequel des solutions aqueuses colloïdales ont été séparées en deux phases liquides, l'une riche en colloïdes (coacervat) et l'autre pauvre en colloïdes (Martins *et al.*, 2009).

La coacervation se définit comme un procédé chimique faisant intervenir une ou plusieurs solutions hydrocolloïdales qui mènent à l'agglomération de particules colloïdales, dans une phase liquide séparée appelée coacervat (Gouin, 2004; Madene *et al.*, 2006).

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

Il existe 2 types de coacervation : la coacervation simple et la coacervation complexe. Lors de la coacervation simple, un seul type de polymère interagit avec des agents fortement hydrophiles. Le polymère est désolvaté par l'addition de solvant non-miscible à l'eau tel que l'éthanol ou par un changement de température. Les interactions macromolécule-macromolécule sont ainsi favorisées au détriment des interactions macromolécule-solvant. La coacervation complexe est une séparation de phase liquide-liquide d'une solution aqueuse de deux polymères de charges opposées. Ce processus est dépendant du pH, de la force ionique et de la concentration en ions. La coacervation complexe est principalement utilisée pour la microencapsulation des huiles aromatiques, mais elle peut aussi être appliquée pour la microencapsulation de divers types d'agents actifs (Madene *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2009; Rokka & Rantamäki, 2010).

3.3.4. Interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques sont des méthodes dérivées de la coacervation complexe. Elles font intervenir des interactions électrostatiques entre deux polymères de charges opposées (Anal & Singh, 2007). La complexation entre les macromolécules de charge opposée a permis la mise au point de microcapsules à libération contrôlée pour l'encapsulation de peptides et de protéines dans le domaine médical. C'est un procédé relativement simple et doux pour les molécules bioactives (Shu & Zhu, 2000).

Les polyélectrolytes sont des macromolécules transportant un nombre relativement élevé de groupement fonctionnels chargés positivement, négativement, ou les deux et ces groupements procurent la charge nette de la molécule. Lorsque deux polyélectrolytes de charges opposées sont mélangés dans une solution aqueuse, un complexe est formé par l'attraction électrostatique entre les polyélectrolytes (Simsek-Ege *et al.*, 2003). Ces complexes sont stabilisés par des liaisons hydrogène ou des liaisons covalentes. La formation de complexes polyélectrolytes dépend de plusieurs facteurs tels que le rapport molaire du mélange (acidité / basicité), la flexibilité de la chaîne des polyélectrolytes, l'ordre d'addition des polymères et la vitesse d'agitation (Silva *et al.*, 2010).

Divers polymères neutres (hydroxypropylméthylcellulose), des polymères cationiques (chitosane), et des polymères anioniques (alginate de sodium) ont été utilisés pour la formation de complexes polyélectrolytes tels que l'alginate de sodium-chitosane, l'acide polyacrylique-chitosane, et le chitosane-carraghénane renfermant des probiotiques à libération contrôlée (Simsek-Ege *et al.*, 2003; Devi & Maji, 2009).

3.3.5. Émulsion

Les émulsions sont des systèmes formés par la dispersion de fines gouttelettes d'un liquide dans un autre. Les deux liquides appelés phase dispersée et phase continue sont

non miscibles, et il s'agit le plus souvent d'une solution aqueuse et d'une solution huileuse.

Il existe deux types d'émulsions : l'émulsion simple et l'émulsion double. Le principe de l'émulsion simple consiste à déposer la phase dispersée sous forme de gouttelettes sphériques dans la phase continue. Lorsque la phase aqueuse est dispersée dans la phase huileuse, on parle alors d'une émulsion eau-dans-huile (E/H), tandis qu'une émulsion huile-dans-eau (H/E) consiste à disperser la phase huile dans la phase aqueuse. Selon le procédé d'émulsification, le diamètre des gouttelettes est compris entre 0,1 μ m et 0,1mm. Les émulsions doubles sont des émulsions constituées de trois phases, dans ce cas la phase dispersée renferme déjà des petites gouttelettes dispersées et qui à leur tour, seront suspendues dans la phase continue. Comme pour les émulsions simples, on peut retrouver des systèmes du type eau-dans-huile-dans-eau (E/H/E) et huile-dans-eau-dans-huile (H/E/H). Les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables à cause des risques de floculation, séparation gravitationnelle, et de coalescence (Van der Graaf *et al.*, 2005). L'utilisation des agents stabilisateurs tels que les phospholipides, les mono et di-glycérides, les acides gras et les protéines est donc nécessaire (Benichou *et al.*, 2007; McClements *et al.*, 2007).

La microencapsulation de probiotiques par émulsion consiste à combiner un mélange d'organismes probiotiques et un agent d'encapsulation tel que l'alginate de sodium avec de l'huile végétale. Une émulsion est formée suite à l'homogénéisation du mélange avec un agent émulsifiant à l'aide d'un barreau magnétique. Les capsules sont formées en ajoutant lentement le chlorure de calcium à l'émulsion. Les microbilles sont filtrées puis lavées afin de se débarrasser de la phase huileuse. Cette technique est simple et facilement réalisable à grande échelle. Plusieurs études ont démontré une bonne viabilité des organismes probiotiques lors du processus de microencapsulation, ainsi que pendant le traitement et le stockage des aliments fonctionnels, car il s'agit d'un processus doux qui n'est pas physiquement stressant pour les cellules. Il y a cependant plusieurs inconvénients quant à l'utilisation de la technique d'émulsion parmi lesquels la formation de microcapsules de tailles variées, des difficultés en matière d'automatisation et de mise

à l'échelle de la technique et la production de microcapsules de diamètres allant de 200 à 1000 μm , dû à la coalescence et la floculation des gouttelettes. Des pertes en probiotiques peuvent aussi être observées lors du drainage de la phase huileuse ou suite à l'usage d'agents émulsifiants (Ding & Shah, 2009).

3.3.6. «Spray chilling/spray cooling»

Dans cette technique, le matériau de revêtement est fondu et pulvérisé par une buse pneumatique dans un récipient contenant généralement un bain glacé de dioxyde de carbone (température -50°C). Ainsi les gouttelettes adhèrent sur les particules et se solidifient formant un film de revêtement. Le procédé est adapté pour la protection de nombreuses matières solubles dans l'eau qui pourraient autrement être volatilisées ou endommagées pendant le traitement thermique. Le matériau d'enrobage est une huile végétale fractionnée ou hydrogénée avec un point de fusion entre $32-42^{\circ}\text{C}$. Le relarguage du contenu des microcapsules se produit suite à la fonte de l'enveloppe (Gibbs *et al.*, 1999).

Cette technique est souvent utilisée pour les produits de boulangerie, les mélanges secs pour soupes et les aliments contenant un niveau élevé de matières grasses (Madene *et al.*, 2006).

3.4. Polymères pour la microencapsulation de probiotiques

Les matériaux employés comme agents d'encapsulation comprennent les glucides, la cellulose et ses dérivés, les lipides, les protéines et les gommes (Bertolini *et al.*, 2001; Baranauskienė *et al.*, 2007). La sélection du polymère est une étape préliminaire qui nécessite une approche méthodologique rigoureuse. Le choix du biomatériau est crucial car il détermine l'efficacité du dispositif de protection. Le polymère choisi doit être stable et protecteur en milieu acide et instable dans un environnement avec un pH supérieur à 6. Ce pH est le pH minimum trouvé dans la lumière intestinale, généralement au début du

duodénum. Il est aussi important que le matériel utilisé pour la microencapsulation des probiotiques soit biodégradable, biocompatible, facilement accessible et résistant lors de la préparation, l'entreposage et le transport du produit dans lequel il sera incorporé. Les propriétés physico-chimiques des polymères tels que la composition chimique, la morphologie, la résistance mécanique, les tests de toxicologie doivent aussi être considérés. La capacité de former ou non des gels dépend de ces derniers critères (Gbassi & Vandamme, 2012). Pour qu'un polymère puisse être employé dans l'industrie alimentaire, il doit préalablement être reconnu comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe), ce qui inclut qu'il doit être sécuritaire et non toxique pour l'humain. Il ne doit pas aussi nuire à l'apparence, le goût, la texture ou la durée de conservation du produit.

Plusieurs études ont été menées sur les polymères pour la microencapsulation des probiotiques et voici ceux qui sont couramment utilisés :

3.4.1. Alginate

L'alginate est un polysaccharide naturel extrait des algues brunes et de certaines bactéries tels que *Azotobacter vinelandii* et plusieurs espèces du genre *Pseudomonas* (Fang *et al.*, 2007). C'est un polymère avec des séquences en alternance des résidus d'acide β -D-mannuronique (M) et α -L-guluronique (G) (Figure 2). L'alginate a été utilisé avec succès depuis de nombreuses années, sous forme d'alginate de sodium, dans l'industrie alimentaire comme agent épaississant, agent gélifiant et aussi comme stabilisateur colloïdale. Il est bon marché, non-toxique et biocompatible (Gombotz & Wee, 1998; Anal & Singh, 2007).

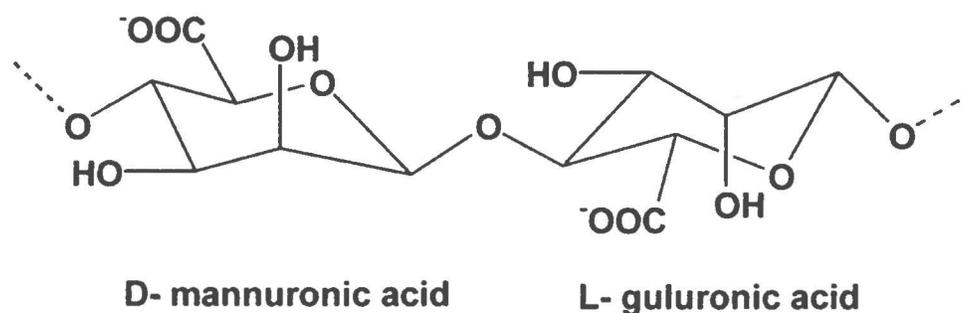


Figure 2 : Structure chimique de l'alginate représentée par un monomère d'acide mannuronique et un monomère d'acide guluronique (Islam *et al.*, 2010).

Une caractéristique importante de l'alginate est qu'il forme des billes par gélification ionotrope avec des cations divalents tels que Ca^{2+} ou des cations multivalents (Le-Tien *et al.*, 2004a; Han *et al.*, 2008; Rokka & Rantamäki, 2010). La liaison de cations divalents dépend de la composition et l'arrangement des blocs de résidus. Ainsi, les blocs GG possèdent des sites préférentiels de liaison pour les cations divalents et la gélification est rendu possible par des échanges d'ions sodium d'acides guluroniques avec les cations divalents. Les ions liés vont interagir avec d'autres groupements guluroniques et l'empilement de ces groupements forme un gel dont la structure est caractéristique d'une boîte d'œuf (Figure 3). Le gel formé est soluble à un pH neutre ou supérieur mais insoluble à un pH plus bas (Le-Tien *et al.*, 2004b; George & Abraham, 2006).

La capacité de réticulation de l'alginate, la dissolution et la biodégradation du système sous des conditions physiologiques normales lui ont permis d'être utilisé comme matrice pour le piégeage et/ou la livraison d'une variété de protéines et de cellules (Smidsrod & Skjak-Braek, 1990; Le-Tien *et al.*, 2004a; Anal & Singh, 2007).

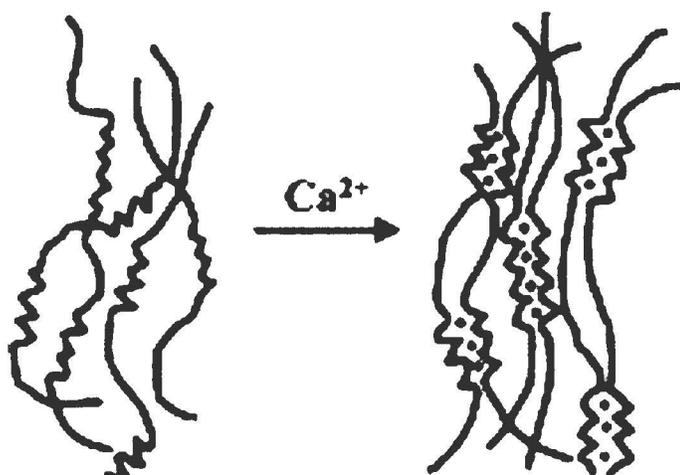


Figure 3 : Structure en boîte d'œuf d'un gel d'alginate formé par chélation des ions Ca^{2+} (George & Abraham, 2006).

3.4.1.1. *Alginate modifié (O-palmitoylation)*

L'utilisation de l'alginate comporte plusieurs désavantages parmi lesquels la nature poreuse du polymère. Pour contrer ce problème, une modification chimique de l'alginate par *O*-acylation permet l'amélioration des propriétés physico-chimiques de l'alginate et offre ainsi une meilleure protection des substances encapsulées face à des conditions défavorables (acidité, oxygène). La *O*-acylation consiste en l'ajout de chaînes d'acide gras (chlorure de palmitoyl) qui permettront l'accroissement des interactions plus hydrophobes dans les couches d'alginate (Figure 4). Le phénomène induit par la palmitoylation de l'alginate consiste en un encombrement stérique lors de liaison entre les ions calcium et les groupements carboxylate de l'alginate, impliquant ainsi une structure plus dense et homogène (Han *et al.*, 2008). L'encapsulation des micronutriments tels que l'acide ascorbique et le β -carotène dans des billes d'alginate modifiées ont permis d'accroître la rétention des substances encapsulées en conditions gastro-intestinales simulées (Han *et al.*, 2008). Une autre expérience utilisant cette fois l'alginate *N*-palmitoylé comme matrice pour l'encapsulation de bactéries probiotiques a permis d'augmenter la viabilité des cellules en milieux gastriques simulés (87%), ce qui

constitue des résultats prometteurs pour l'utilisation de ces polymères modifiés (Le-Tien *et al.*, 2004b).

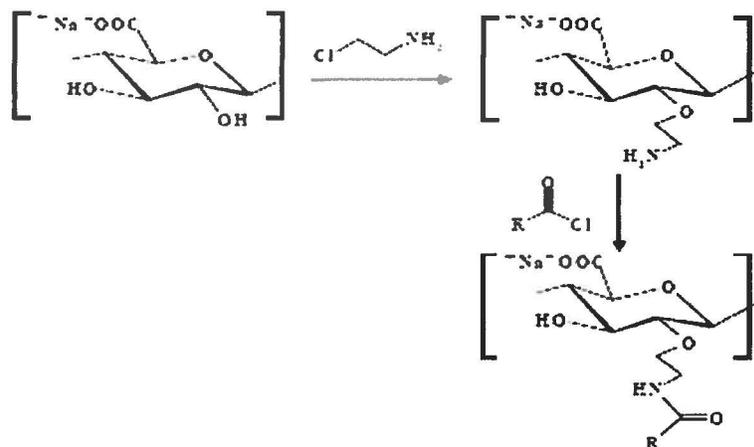


Figure 4 : Représentation schématique de la *O*-palmitoylation de l'alginate (adapté de (Le-Tien *et al.*, 2004b).

3.4.2. Chitosane

Le chitosane est un polysaccharide cationique obtenu à partir de la déacétylation partielle de la chitine, le principal constituant du squelette des crustacés (Krasaekoopt *et al.*, 2003). C'est un copolymère comprenant la N-acétyl-D-glucosamine et la D-glucosamine (Figure 5) (Yoksan *et al.*, 2010). Ce polysaccharide est bon marché, possède d'excellentes propriétés adhésives des cellules (biocompatible), en plus d'être soluble dans l'eau dans des conditions acides (pH < 6) (Sankalia *et al.*, 2007).

La nature polycationique du chitosane permet la formation de complexes polyélectrolytes avec l'alginate ou en présence de polymères polyanioniques. Le chitosane est souvent utilisé en combinaison avec l'alginate comme revêtement afin de modifier la vitesse de diffusion des substances encapsulées ou en tant qu'additif pour la modification de la structure des billes (Lee *et al.*, 2004; Iyer & Kailaspathy, 2005). L'interaction

électrostatique des groupes carboxyliques de l'alginate avec les groupes amine du chitosane résultent en la formation de billes ou de films beaucoup plus résistants permettant une meilleure rétention des cellules encapsulées (Shu & Zhu, 2002). Cependant, le chitosane a des effets bactériostatiques ce qui pourrait limiter son utilisation dans les techniques de microencapsulation bactérienne (Sankalia *et al.*, 2007). Au Canada, son usage dans l'industrie alimentaire est prohibé et ne pourra de ce fait pas être utilisé pour la microencapsulation de probiotique pour des fins alimentaires.

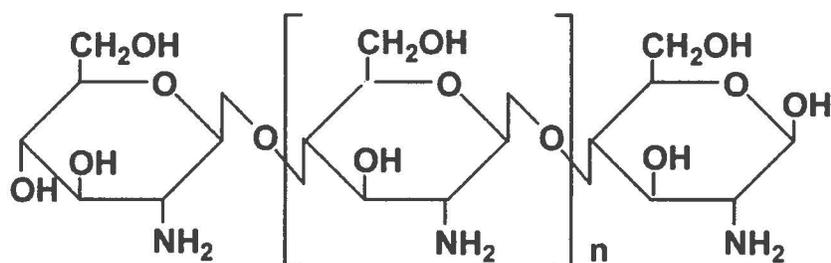


Figure 5 : Structure chimique du chitosane (Islam *et al.*, 2010).

3.4.3. Amidon

L'amidon est généralement retrouvé sous forme de poudre blanche soluble dans l'eau. Il est constitué d'unités de D-glucose liées ensemble par des liaisons glycosidiques. (Anal & Singh, 2007). L'amylose et l'amylopectine étant les deux principaux constituants de l'amidon sont composés d'unités de D-glucose (Figure 6). Ainsi, le taux des deux principaux constituants et la structure de l'amylopectine ont une influence sur les propriétés physico-chimiques, thermiques et rhéologiques de l'amidon (Sang *et al.*, 2008).

La capacité d'adhérence de certaines bactéries telles que les bifidobactéries à l'amidon constitue un avantage pour améliorer la rétention des probiotiques viables et métaboliquement actives dans le tractus intestinal. Plusieurs études ont été menées à cet effet et les résultats démontrent une augmentation de la viabilité des bactéries probiotiques *Lactobacillus acidophilus* en présence de mélange constitué d'alginate et

d'amidon (Jankowski *et al.*, 1997; Crittenden *et al.*, 2001). Certaines études ont démontré que la présence d'amidon contribue à diminuer le risque du cancer de l'intestin en jouant le rôle de fibres alimentaires (Mortazavian *et al.*, 2007). En effet, l'amidon est en grande partie non dégradé dans l'intestin grêle et est une partie importante des glucides disponibles dans le côlon humain pour la fermentation des bactéries, ce qui conduit à la production d'acides gras à courte chaîne. Ces produits finaux de fermentation peuvent exercer des effets positifs sur la santé de l'hôte (Iyer & Kailasapathy, 2005). Ces avantages constituent un atout pour l'utilisation de ce polymère comme matrice pour la microencapsulation de probiotiques aussi bien dans l'industrie alimentaire que pharmaceutique.

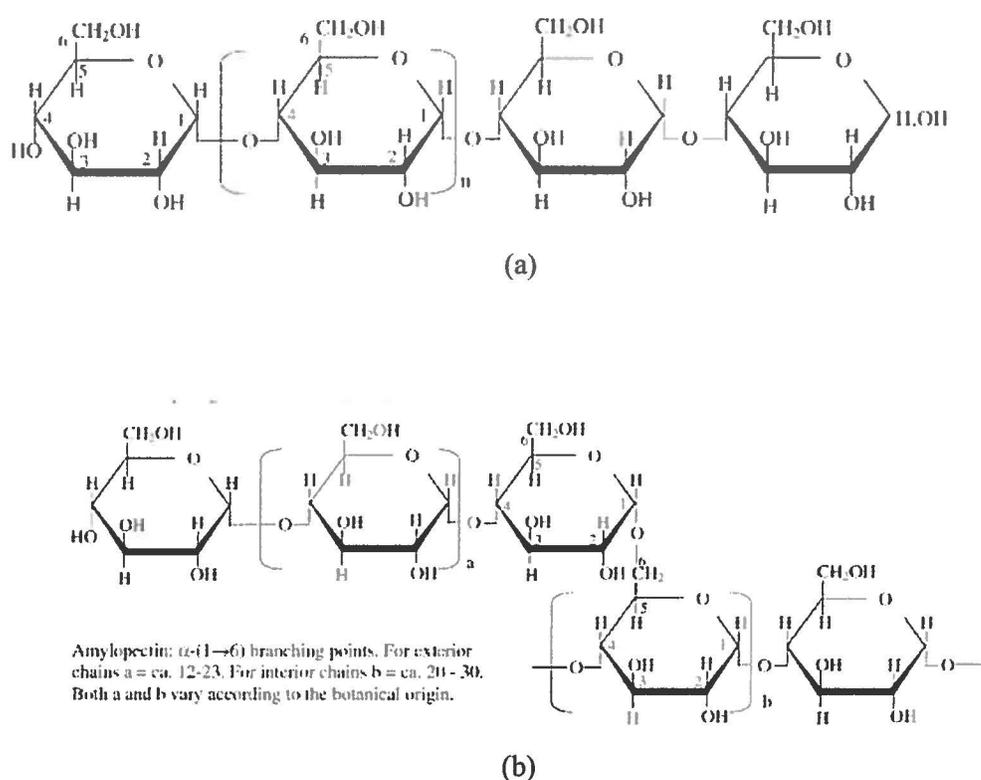


Figure 6 : Structure de l'amylose (a) et l'amylopectine (b) qui forment l'amidon (Blennow *et al.*, 2002).

3.4.4. κ -carraghénane

Il existe trois types de carraghénanes qui diffèrent par le nombre et la position des groupements sulfates qui les composent. Ces polymères sont traditionnellement identifiés par des préfixes grecs, kappa, iota et lambda-carraghénanes. Ce dernier est utilisé pour augmenter la viscosité des produits tandis que les deux premiers sont reconnus pour leur capacité à former des gels. Mais les plus utilisés sont les κ -carraghénanes (Van De Velde *et al.*, 2002).

Les κ -carraghénanes sont extrait des algues rouges *Kappaphycus alvarezii*. Ce sont des polymères composés de séquences répétées d'unités de galactose (D-galactose-4-sulphate et 3,6-anhydro-D-galactose), liées ensemble par des liaisons $\alpha 1 \rightarrow 3$ et $\beta 1 \rightarrow 4$ glycosidique (Figure 7). Elles sont couramment employées dans l'industrie alimentaire notamment les desserts glacés, le chocolat, le fromage cottage, la crème fouettée, les sauces et les gelées, et aussi bien dans les formulations pharmaceutiques, cosmétiques et en industrie pétrolière (Van De Velde *et al.*, 2002).

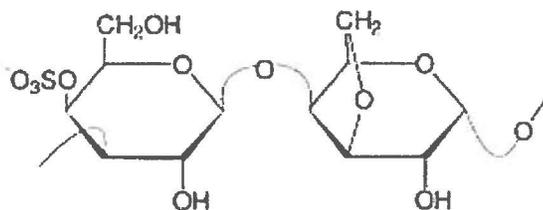


Figure 7 : Structure chimique des disaccharides représentant le κ -carraghénane (Falshaw *et al.*, 2001).

Les κ -carraghénanes forment des gels thermoréversibles en présence de cations monovalents (K^+ , Rb^+ , Cs^+ et NH_4) (Anal & Singh, 2007; Rokka & Rantamäki, 2010). Les billes de carraghénanes sont formées en chauffant en un premier temps la solution de

polymère à une température de 40-45°C et le mélange est rajouté par la suite goutte à goutte dans une solution de KCl ou de CaCl₂ à la température ambiante. Des études ont cependant démontré que le potassium a un effet inhibiteur sur certaines bactéries telles que *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. D'autres études ont révélé l'effet du potassium, lorsque retrouvé en grande quantité, sur la déstabilisation de l'équilibre en électrolytes du corps humain (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Mortazavian *et al.*, 2007). Aussi, des températures avoisinant 60-80°C sont nécessaires pour la dissolution du polymère, ce qui en fait un désavantage pour la libération des substances encapsulées ainsi que la mort des cellules actives par effet de chaleur. Cependant, des interactions synergiques de ce polymère avec d'autres polysaccharides tels que la gomme de caroube sont couramment exploitées en industrie agro-alimentaire. Plusieurs études sont menées sur l'interaction spécifique des chaînes de galactomannane de la gomme de caroube avec le carraghénane qui induisent la formation de gels beaucoup plus fermes (Van De Velde *et al.*, 2002; Krasaekoopt *et al.*, 2003).

3.4.5. Gomme de gellane et gomme de xanthane

La gomme de gellane est un polysaccharide anionique dérivé de *Sphingomonas elodea*. C'est un polymère avec des séquences répétées d'un tétrasaccharide, composé de deux résidus de D-glucose et d'un résidu chacun de L-rhamnose et d'acide D-glucuronique. Les séquences sont reliées les unes aux autres par une liaison $\alpha 1 \rightarrow 3$ glycosidique. La gomme de gellane est largement utilisée dans l'industrie alimentaire comme additif (Rokka & Rantamäki, 2010). Ce polysaccharide est très résistant à la chaleur avec des températures de fusion pouvant aller jusqu'à 80-90°C (Mortazavian *et al.*, 2007). Ce qui en fait un avantage lors des différents procédés de transformation alimentaire.

La gomme de xanthane est un exopolysaccharide provenant de la bactérie pathogène des plantes *Xanthomonas campestris*. Elle est composée de glucose, de mannose et d'acide glucuronique. La gomme de xanthane a des propriétés gélifiantes et tout comme la gomme de gellane, elle est utilisée comme additif alimentaire.

Ces deux polymères ont souvent été combinés dans le but d'obtenir un gel beaucoup plus résistant aux conditions gastriques, comparativement à l'alginate (Figure 8). En outre, par opposition à la carraghénane qui nécessite des ions potassium pour sa stabilisation structurale, le mélange gellane-xanthane peut facilement être stabilisé avec des ions calcium. Ce qui en fait un mélange de choix pour la microencapsulation de probiotiques. Une des applications de ces polymères est la microencapsulation de bactéries probiotiques *Bifidobacterium infantis* dans des billes de gellane et de xanthane et les résultats ont démontré une forte viabilité des probiotiques en milieu gastro-intestinal simulé. D'autres études ont démontré l'efficacité du mélange suite à l'encapsulation des bifidobactéries suivi d'une exposition pendant plusieurs semaines dans du yoghourt pasteurisé (Sun & Griffiths, 2000; Rokka & Rantamäki, 2010).

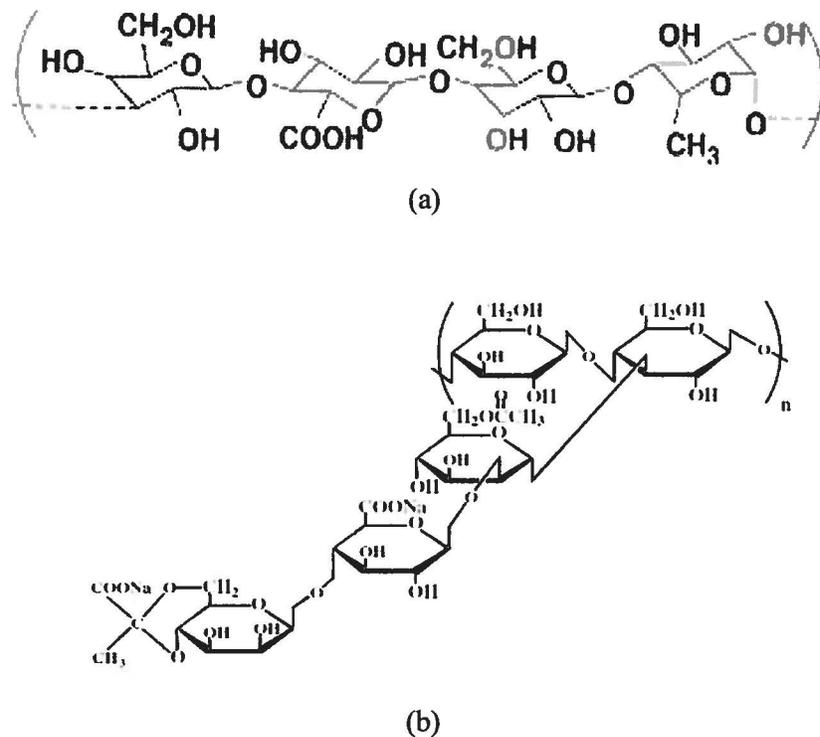


Figure 8 : Motifs répétés de la gomme de gellane (a) et de la gomme de xanthane (b)
(Ogawa *et al.*, 2006; Iijima *et al.*, 2007).

3.4.6. Gélatine

La gélatine est fréquemment utilisée dans les industries alimentaires et pharmaceutiques. Elle est une protéine dérivée de l'hydrolyse partielle du collagène d'origine animale (Figure 9). La gélatine a une structure très particulière et des propriétés polyvalentes fonctionnelles. Lorsque mélangée à de l'eau froide, elle forme un gel colloïdal semi-solide. Comme l'amidon, la gélatine ne forme pas de billes. En raison de sa nature amphotère, la gélatine pourrait être combinée avec d'autres polymères tels que la gomme de gellane comme matrice pour la microencapsulation (Anal & Singh, 2007; Rokka & Rantamäki, 2010). Ces deux hydrocolloïdes sont miscibles à un pH supérieur à 6, car elles portent toutes deux des charges nettes négatives et se repoussent mutuellement. Toutefois, lorsque le pH est ajusté en dessous de point isoélectrique de la gélatine, la charge nette sur la gélatine devient positive, ce qui provoque une interaction avec la gomme de gellane chargé négativement (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

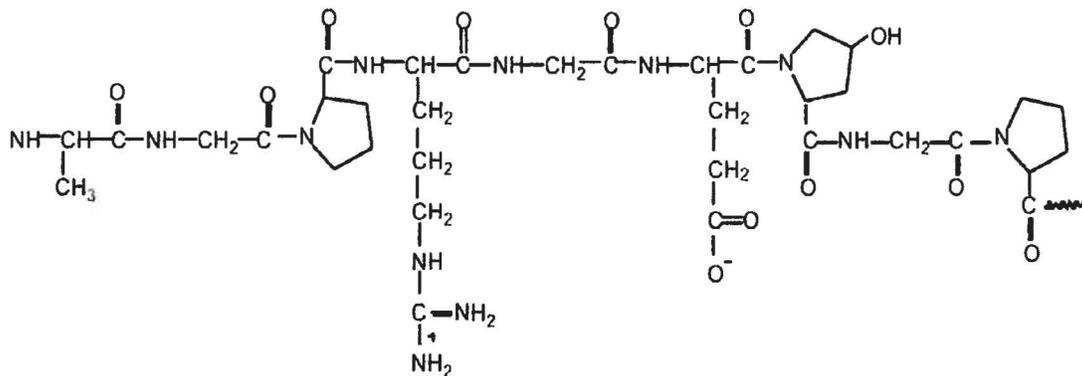


Figure 9 : Structure chimique de la gélatine (Peña *et al.*, 2010).

3.4.7. Gomme arabique

La gomme arabique est exsudée des tiges et des branches des acacias. Elle est composée d'arrangements ramifiés de sucres simples et de protéines (Rokka and Rantamäki, 2010). La gomme arabique se distingue par ses excellentes propriétés émulsifiantes et sa faible

viscosité, ce qui lui confère une place importante pour la rétention des huiles essentielles et autres produits en industrie alimentaire. Toutefois, les capsules à base de gomme arabique présentent une capacité limitée contre l'oxydation car elles agissent comme des membranes semi-perméables. La porosité à l'oxygène et le coût élevé de la gomme arabique sont aussi des facteurs prépondérants qui tendent à limiter son utilisation (Bertolini *et al.*, 2001; Krishnan *et al.*, 2005). Ce polymère pourrait cependant être combiné avec d'autres polymères pour en optimiser les propriétés.

4. Les aliments fonctionnels et nutraceutiques

4.1. Les aliments fonctionnels

C'est à la fin des années 80 que l'appellation « aliment fonctionnel » a été décrite au Japon pour désigner des aliments enrichis en ingrédients capables de produire des bienfaits pour la santé. Ce concept est de plus en plus populaire auprès des consommateurs en raison d'une prise de conscience du lien entre la santé, la nutrition et l'alimentation. À cet effet, les fabricants d'aliments sont enthousiastes au sujet du développement de ces produits puisque les ingrédients ajoutés donnent une valeur ajoutée aux aliments. Le marché mondial des aliments fonctionnels connaît ainsi une croissance fulgurante (Stanton *et al.*, 2001).

Les aliments fonctionnels sont des constituants alimentaires qui, selon Santé Canada, procurent des bienfaits physiologiques démontrés ou réduisent les risques de maladies chroniques, en plus de remplir leurs fonctions nutritionnelles de base. On peut mettre au point des aliments fonctionnels en ajoutant des ingrédients actifs à des produits alimentaires de base ou en utilisant des techniques de production spéciales, comme la sélection des végétaux, la modification génétique et des diètes alimentaires spécialisées. Plusieurs aliments fonctionnels ont été développés et mis en marché parmi lesquels des oeufs enrichis en oméga-3, le yogourt contenant des cultures biologiques vivantes (probiotiques), des tomates renfermant un niveau élevé de lycopène, les jus et boissons de

fruits contenant des concentrations accrues d'antioxydants et les céréales enrichies en fibres alimentaires (blé, avoine, orge et fenugrec) (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2006).

4.2. Les produits nutraceutiques

Les produits nutraceutiques, sont des suppléments alimentaires ou des ingrédients isolés ou purifiés habituellement vendus sous forme médicinale, comme les poudres, les comprimés, les capsules ou les gélules, qui ne sont pas habituellement associés aux aliments. Un produit nutraceutique a des vertus physiologiques prouvées ou assure une protection contre le développement de maladies chroniques. Les produits nutraceutiques peuvent être issus de végétaux, d'animaux, de microorganismes, de sources marines (par exemple les antioxydants tirés des bleuets, l'huile de poisson ou d'enzymes) ou des produits fabriqués à partir d'une matière végétale séchée comme le ginseng. Les capsules d'oméga-3 et de lycopène sont d'autres exemples de produits nutraceutiques vendus au Canada (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2006).

Les aliments fonctionnels et les produits nutraceutiques offrent à l'industrie agroalimentaire canadienne l'occasion d'accroître la valeur ajoutée des produits, tant à l'échelle nationale qu'internationale.

5. Projet

5.1. Problématique

Les probiotiques sont de plus en plus retrouvés dans les produits laitiers tels que les yogourts, le lait pasteurisé, les crèmes glacées et les fromages. Cependant, la population des probiotiques dans les matrices fromagères est affectée par plusieurs facteurs tels que

les pertes dans le lactosérum, la présence d'oxygène, l'ajout de sel pendant la fabrication et la maturation du fromage. Des études ont aussi démontré qu'il peut y avoir une interférence entre les ferments lactiques et les bactéries probiotiques ajoutées. La bactérie probiotique anaérobie, *B. longum* 15708, a été sélectionnée pour ses effets bénéfiques pour la santé parmi lesquels une activité anti cancérigène, anti bactérienne et un régulateur du taux de cholestérol dans le sang. Les études ont toutefois démontré qu'il y a une perte importante de viabilité dans le fromage due à la présence de sel et d'oxygène, ainsi que pendant l'égouttage du lactosérum. Le défi serait donc de pouvoir maintenir la viabilité de ce probiotique dans la matrice fromagère sans en affecter les propriétés organoleptiques.

Il est également bon de noter que le fromage pourrait constituer un avantage pour la rétention des probiotiques encapsulés en raison de sa teneur élevée en matières grasses et du fait qu'il a un pH supérieur aux autres aliments fermentés traditionnels. Bien qu'une fraction significative des probiotiques est éliminée par le drainage du lactosérum, il serait important de tester la survie de la portion restante sur plusieurs jours par rapport au sel et à l'humidité.

Plusieurs techniques de microencapsulation pour les probiotiques utilisant des systèmes à base d'alginate ont été testés dans différentes matrices alimentaires tels que le fromage. Cependant, l'alginate étant reconnu pour sa forte porosité n'assure pas toujours une meilleure protection des probiotiques contre l'oxygène et l'humidité. Notons que plusieurs autres facteurs tel que la présence de chélateurs du calcium dont le phosphate peuvent facilement détruire des billes d'alginate et de ce fait altérer la viabilité des probiotiques. Des polymères modifiés auxquels on ajoute des acides gras pourraient constituer une nouvelle avenue pour palier à ce problème. Il faudrait toutefois que ce polymère soit reconnu comme étant « GRAS » pour être accepté en industrie alimentaire. Plusieurs études ont démontré une bonne viabilité de probiotiques lorsqu'ils sont encapsulés dans des matrices auxquelles on a rajouté des acides gras. Ces derniers procurent une hydrophobicité à la matrice d'encapsulation et assurent une meilleure survie des probiotiques.

L'un des problèmes qui pourrait affecter la viabilité des probiotiques lorsque microencapsulés est l'entreposage des microcapsules jusqu'à leur utilisation dans les aliments. Pour ce faire, la congélation et la lyophilisation sont les techniques couramment employées pour la préservation des agents actifs dans l'industrie alimentaire. Toutefois, ces méthodes physiques requièrent généralement des changements de température et se font en présence d'oxygène, il faudrait alors s'assurer de leur efficacité lorsqu'on fait face à une bactérie anaérobie.

Finalement, l'efficacité de la microencapsulation en conditions gastro-intestinales simulées devrait être évaluée afin de déterminer l'impact des sels biliaires et des enzymes pancréatiques sur la survie de *B. longum*. Des études ont démontré que plusieurs facteurs tels que les changements de pH de l'estomac à l'intestin, ainsi que les enzymes pancréatiques et les sels biliaires ont un effet néfaste sur la survie des probiotiques.

5.2. Hypothèses

Nous posons les hypothèses suivantes :

- 1- La microencapsulation augmentera significativement la rétention des probiotiques dans le caillé de fromage et aidera à maintenir leur fonctionnalité au cours de l'entreposage ainsi qu'au niveau du système digestif.
- 2- L'utilisation de probiotiques sous forme de microcapsules permettra une meilleure rétention des bactéries dans la matrice fromagère.
- 3- La mise au point de polymères modifiés, à base d'acides gras, permettra de limiter l'exposition des probiotiques à des facteurs qui leur sont défavorables (oxygène, sel).
- 4- La congélation préservera la stabilité des probiotiques et facilitera leur entreposage.
- 5- La lyophilisation aidera à réduire la taille des capsules et permettra de préserver la viabilité des probiotiques.

5.3. Objectif du projet

L'objectif principal de cette étude visait à mettre au point une méthode d'encapsulation permettant de maintenir la viabilité de *B. longum* 15708 dans le fromage Cheddar, pendant l'entreposage et en conditions gastro-intestinales simulées.

Les grandes étapes du projet consistaient à:

- 1- Développer une matrice d'encapsulation à base de biopolymères, permettant une meilleure rétention et une préservation de la viabilité des probiotiques en matrice fromagère, pendant l'entreposage et après ingestion au niveau du tractus gastro-intestinal.
- 2- Tester différentes méthodes de microencapsulation afin de choisir celle qui permettrait une meilleure survie des probiotiques.
- 3- Évaluer le rendement d'encapsulation, ceci permettrait de sélectionner les meilleures formulations de polymères avec les techniques permettant de réduire la mortalité de *B. longum* lorsque celle-ci est exposée à des conditions aérobies.
- 4- Analyser l'effet de la congélation et de la lyophilisation sur la viabilité des probiotiques encapsulés.
- 5- Préparer un fromage Cheddar contenant *B. longum* sous forme libre et encapsulée.
- 6- Évaluer le taux de rétention des suspensions bactériennes au cours de la fabrication du fromage, ce qui signifie dans le lait, avant la cheddarisation, après la cheddarisation et au moment du salage.
- 7- Faire des analyses microbiologiques pendant l'entreposage du fromage, soit aux jours 0, 1, 7, 14 et 21.
- 8- Analyser la libération des probiotiques en conditions gastro-intestinales simulées.

5.4. Moyens pour atteindre les objectifs

Pour réaliser ce projet, il fallait dans un premier temps mettre au point une méthode de microencapsulation utilisant des polymères d'origine naturelle puisque les microcapsules seront intégrées dans une matrice alimentaire, soit le fromage Cheddar. Le choix du polymère reposa sur l'alginate étant donné que c'est un polymère couramment utilisé dans l'industrie alimentaire en plus d'être peu coûteux et facilement accessible. La souche probiotique utilisée étant sensible à l'oxygène (*Bifidobacterium longum* 15708), une matrice moins poreuse serait donc efficace pour préserver la survie bactérienne. Ce qui nous amena à modifier l'alginate chimiquement en rajoutant des groupements d'acide gras, d'après le protocole de Han *et al.* (2008). On a obtenu ainsi de l'alginate palmitoylé. Une analyse par microscopie électronique à balayage (SEM pour *Scanning Electron Microscopy*) a été effectuée pour confirmer l'effet de l'ajout d'acide gras sur la porosité de l'alginate.

Plusieurs méthodes de microencapsulation ont été mises au point au cours des dernières années et ceux que nous avons retenues pour l'étude sont la gélification ionotropique de l'alginate dans le calcium et une version modifiée de la technique d'émulsion telles que décrite par Ding et Shah (2009). Ce sont des techniques faciles à réaliser et qui peuvent être transférées en mode industriel. Un dénombrement sur milieu gélosé spécifique va déterminer le rendement d'encapsulation dépendamment de la concentration d'alginate et de la matrice d'alginate testée (alginate natif ou palmitoylé). La gélification ionotropique de l'alginate dans le calcium requiert l'utilisation de seringue et ceci nous donnerait des billes plus grosses. Un système de buse qui est entraîné par un flux d'air coaxial est donc testé pour l'obtention de billes de petites tailles (microbilles). L'utilisation de buses permet d'avoir une distribution uniforme des particules en suspension et une réduction des gouttelettes (micro-gouttes). Ceci permet de former des microbilles de manière standardisée qui risquent de moins altérer les propriétés organoleptiques du fromage (apparence visuelle, texture, impression à la morsure).

Deux sortes de traitements physiques ont été appliquées sur les billes, soit la congélation et la congélation suivie d'une lyophilisation. Le but étant de recréer les conditions d'entreposage en industrie alimentaire et préserver les propriétés fonctionnelles des agents encapsulés. Un dénombrement sur un milieu gélosé sélectif a permis de déterminer l'influence des traitements physiques sur la viabilité de *B. longum* encapsulée. Le traitement physique permettant une meilleure survie des probiotiques sera retenu pour les autres analyses.

Une fois le choix de la technique de préservation de microbilles mise au point, ces microbilles ont été utilisées pour la fabrication de fromage Cheddar en grains, selon le protocole décrit par Fortin *et al.* (2011). La fabrication de fromage de type Cheddar a été réalisée à partir d'un lait frais de grand mélange et les probiotiques ont été incorporés directement dans le lait avant emprésurage. Des analyses microbiologiques des caillés fromagers et des lactosérums ont été réalisées durant la fabrication des fromages dans le but de déterminer la viabilité à chaque étape de fabrication. Les fromages ont par la suite été entreposés sous forme de grains dans des sacs à température ambiante pour la première journée d'entreposage et par la suite dans le réfrigérateur sur plusieurs jours. Des dénombrements sur milieu gélosé sélectif ont été réalisés pour tous les jours testés.

La dernière étude a été de tester les microcapsules contenant les probiotiques dans un liquide simulé de l'estomac puis de l'intestin afin d'évaluer la viabilité de *B. longum* en conditions acides (pH 2 de l'estomac) et en conditions neutres (pH 6.8 dans l'intestin). Cette étape permet de voir si l'alginate se dissout bien au pH souhaité (pH 6.8) et non dans l'estomac (pH 2). Ceci permet de vérifier si la concentration bactérienne est maintenue tout au long du passage gastro-intestinal et de déterminer le temps de survie de *B. longum* dans l'intestin.

Résultats

La partie expérimentale du mémoire (Matériel et méthodes, Résultats et Discussions) est présentée sous forme d'articles.

6. Manuscripts

6.1. «Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *Bifidobacterium longum* during freeze-drying».

Khalie Mahamad Amine, Claude P. Champagne, Stéphane Salmieri, Michel Britten, Daniel St-Gelais, Patrick Fustier, and Monique Lacroix.

Submitted to Journal of Food Science, 2013

Rôle des auteurs

J'ai participé à l'élaboration du protocole, à la réalisation des expériences ainsi qu'à la rédaction de l'article. Dr Champagne est mon codirecteur de recherche. Il a participé aux discussions, à l'interprétation des résultats et à la correction de la publication. Stéphane Salmieri a aidé à la mise au point des protocoles, à l'interprétation des résultats et pour la correction de l'article. Dr Britten a contribué aux discussions concernant le projet et à la correction de l'article. Dr St-Gelais et Dr Fustier ont aussi participé à la correction de l'article et aux différentes discussions concernant le projet. Dr Lacroix est la coordinatrice du projet et ma directrice de recherche. Elle a participé à toutes les prises de décisions, les discussions et les corrections de l'article.

Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *Bifidobacterium longum* during freeze-drying

Khalie Mahamad Amine¹, Claude P. Champagne^{2,3}, Stéphane Salmieri¹, Michel Britten^{2,3}, Daniel St-Gelais^{2,3}, Patrick Fustier², and Monique Lacroix^{1,3*}

¹ Research Laboratories in Sciences Applied to Food, INRS-Institut Armand-Frappier, Canadian Irradiation Center, 531 boulevard des Prairies, Laval (QC), Canada H7V 1B7;

² Food Research and Development Center, Agriculture and Agri-Food Canada, 3600 boul. Casavant Ouest, St. Hyacinthe QC, Canada J2S 8E2

³ Institute of Nutraceutical and Functional Foods (INAF), Laval University, Quebec, Canada G1K 7P4

Keywords: *Microencapsulation, probiotic bacteria, alginate, palmitoylation, spray nozzle, freeze-drying.*

* Author to whom correspondence should be addressed, Telephone: +1-450-687-5010;
Fax: +1-450-686-5501; E-mail: monique.lacroix@iaf.inrs.ca

ABSTRACT

In the present research the viability of microencapsulated *Bifidobacterium longum* 15708 by extrusion and spray technique was investigated. Native (NA) and *O*-palmitoylated (PA) alginate were used as matrix for immobilization. Beads obtained by extrusion were characterized to assess the encapsulation yield (EY). Higher EY (67%) was found for bacteria immobilized in 3% PA. The effects of freeze drying on viability of entrapped *B. longum* were evaluated. Results indicated that microbeads obtained by spray were the most effective in preserving bacterial viability with a loss of viability of 2 log after 24 h as compared to extrusion beads and free cells where a loss of 2.9 and 2.75 log were respectively observed. No significant difference ($P > 0.05$) between NA and PA was observed. Scanning electron microscopy (SEM) analysis of beads showed globular structures and confirmed differences between the NA and PA alginates as to their appearance (porosity, fatty acid content), while the use of spray contributes to reduce the size of beads by 1/10. Present results showed that several alternatives such as beads size, alginate concentration, as well as polymer functionalization can be managed to allow probiotic viability.

1. Introduction

Probiotic bacteria are live micro-organisms which, when consumed in sufficient numbers confer a beneficial health effect to the host (Reid *et al.*, 2005; Homayouni *et al.*, 2007). The beneficial effects of probiotics on the human gut flora include anti-microbial activity, prevention and treatment of diarrhea, relief of symptoms caused by lactose intolerance, anti-mutagenic and anti-carcinogenic activities, and immunostimulatory effect (Gomes da Cruz *et al.*, 2009; Islam *et al.*, 2010). To exert health benefits, the International Dairy Federation has recommended a level of 10^7 colony-forming units (CFU) of live microorganisms per milliliter of product at the time of consumption (Ouwehand & Salminen, 1998). Probiotic bacteria are increasingly being included as functional ingredients, particularly in dairy products such as yogurts, fermented milks (Sultana *et al.*, 2000; Sun & Griffiths, 2000; Iyer & Kailasapathy, 2005; Brinques & Ayub, 2011), ice cream (Godward & Kailasapathy, 2003) and cheese (Wick *et al.*, 2004; Fortin *et al.*, 2011a). However, cell viability in these products often drops during storage. The concentration and functionality of the probiotics when they reach their destination in the human gut can be further influenced by adverse environmental conditions, such as low pH, temperature variations and oxygen (Heidebach *et al.*, 2009).

Probiotic cultures for food applications are generally supplied in frozen or dried form in order to achieve better stability during storage. New strains having health benefits are constantly isolated and tested for bioactivity (Olivares *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2009). Unfortunately, some cultures do not survive well during freeze drying. The environmental stresses which occur during freeze-drying and sensitivities of many potential probiotic strains to food processing steps or storage may limit their practical use in foods (Chan & Zhang, 2002; Ross *et al.*, 2005). Viable counts of dried products could also be influenced by rehydration temperature, time and media (Champagne *et al.*, 2010). Authors typically investigate different protective agents such as skimmed milk, glycerol or sugars to maintain the viability of probiotic organisms during freeze-drying, and this strategy often has important benefits (Carvalho *et al.*, 2004; De Giulio *et al.*, 2005; Capela *et al.*, 2006). However, this approach is not always successful, and other means of improving survival to drying are necessary. Pre-adaptation of the cultures (Wouters *et al.*,

1999), freezing and drying processing conditions (Péter & Reichart, 2001), obtaining glassy matrix states (Pehkonen *et al.*, 2008) as well as encapsulation (Capela *et al.*, 2006) have been examined for this purpose. In this study, we examine the effect of novel encapsulation parameters on the survival of a highly sensitive probiotic culture to freeze-drying.

Microencapsulation is defined as the technology of packaging solid, liquid and gaseous materials in small capsules that release their contents at controlled rates over prolonged periods of time (Anal & Singh, 2007; Champagne & Fustier, 2007). Since the last 15 years the protection of probiotics by means of microencapsulation into hydrocolloid beads prepared by extrusion and emulsion techniques or into spray-dried microparticles, has been investigated (Albertini *et al.*, 2010). Among these methods extrusion is a simple, low cost and easy implementation, allowing the retention of a high number of cells (Gbassi and Vandamme, 2012). In addition to potential viability improvements in the drying process, this technology has been applied to increase the viability of probiotic bacteria in products during food processing, storage and also following ingestion (Sultana *et al.*, 2000; Ozer *et al.*, 2008). One problem associated with microencapsulated cultures for foods is their effect on sensory properties (Karimi *et al.*, 2011). Therefore, microencapsulation processes which reduce the droplet size (micro droplets) so as to not alter the sensory properties of food need to be developed. One of the aims of this study is to examine the properties of cultures produced by one such process.

A large variety of coating materials and methods has been developed to provide microorganisms protection against acidic environment, changing temperature and freeze drying. Alginate systems have been widely used for the immobilization of probiotic bacteria due to its non-toxic nature, easy to handle, bioavailable, biocompatible, low cost and easy bead formation by ionotropic gelation (Gombotz & Wee, 1998; Le-Tien *et al.*, 2004a; Han *et al.*, 2008). However, it has been reported that microcapsules made of alginate did not always improve the survival of probiotic bacteria because they are very porous and readily allow diffusion of acidic solutions and compounds of low molecular weight (Cui *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2002; Chandramouli *et al.*, 2004). To increase the

stability of alginate microparticules and to reduce diffusion rates, fatty acid and cationic polymers, such as chitosan, are usually added to the alginate in combination with the polymer or as a coating. Alginate modification by addition of fatty acid has been used to reduce the porosity of the polymer, limit air and acid diffusion and enhance the protection of entrapped probiotic bacteria (Le-Tien *et al.*, 2004b; Han *et al.*, 2008). Le-Tien *et al.* (2004b) found that modified alginate (*N*-palmitoylated alginate) increased the survival of *Lactobacillus rhamnosus* when exposed during 30 min to simulated gastric fluid (pH 1.5). Similar results were reported by Krasaekoopt *et al.* (2004) and Lee *et al.* (2004) using poly-L-lysine and chitosan-coated calcium alginate, as matrices to entrap the living bacteria. In other studies, Albertini *et al.* (2010) showed that the incorporation of xanthan gum or cellulose acetate phthalate within the alginate solution increased the survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acid conditions from 63% (freeze-dried bacteria) up to 76%. In a previous study (Muthukumarasamy *et al.*, 2006) it was found that the microencapsulation of *L. reuteri* in alginate–starch by extrusion provided great protection against gastric juice. Therefore, improving the functionality of the alginate encapsulation system is both possible and desirable.

The aim of this study was to examine the influence of concentrations of native alginate (NA) and modified alginate (PA) on the encapsulation yield (EY) of *Bifidobacterium longum* 15708 in calcium alginate beads formed by extrusion processes. After determination of optimal concentration of NA and PA, the effect of spray vs droplet extrusion, combined to freeze-drying treatment of beads was evaluated on the viability of the highly sensitive probiotic bacteria. External surface morphology of beads and microbeads was characterized by Scanning electronic microscopy (SEM).

2. Material and methods

2.1. Materials

Sodium alginate (from brown algae, molecular mass 1.5×10^5 Da, $[\eta] = 620$ ml/g, containing approx. 67% of L-guluronate residues), calcium chloride, sodium hydroxide, sodium phosphate, reinforced clostridial medium (RCM) and Bacto-peptone were purchased from Sigma-Aldrich Ltd. (Oakville, Ontario, Canada). Glycerol, palmitoyl chloride, acetone and methanol were provided from Laboratoire Mat (Beauport, Quebec, Canada)

2.2. Strain and culture conditions

Bifidobacterium longum ATCC 15708 was purchased as freeze-dried powders from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA).

Stock cultures were obtained by storing bacteria at -80°C in Reinforced Clostridial Medium (RCM) (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) enriched with 15 % glycerol (Laboratoire Mat, Beauport, Quebec, Canada). One mL fractions of this cell suspension were stored in cryovials (Nalgene; Rochester, NY, USA).

Before use, a cryovial was thawed at room temperature for 15 min, and subcultured twice during 24 h at 37°C in RCM broth under an anaerobic atmosphere that was obtained by using an anaerobic GasPak® jar containing a generator envelope (Oxoid Ltd, Basingtoke UK). The bacteria were harvested by centrifugation at 6,000 g for 10 min at 4°C , washed twice in sterile 0.1% peptone water under same centrifugation conditions and resuspended in 10 mL of sterile 0.1% peptone water. The cell suspensions were referred to as the free cells and were used either directly in assays or subjected to microencapsulation as described subsequently.

2.3. *O*-palmitoylation of alginate

Alginate *o*-palmitoylation was carried out following a modified method of Han *et al.* (2008). An amount of 5 g of sodium alginate was dissolved in 300 mL distilled water. The polymeric solution was heated to 70°C and the pH was adjusted to 7.5. A volume of 20 mL of palmitoyl chloride was then slowly added, maintaining the pH at 7.2-7.5 with 0.5 M NaOH solution. After 2 h, the reaction medium was neutralized (pH 7.0) and the product was precipitated in 1 L ethanol, collected by filtration and washed at least three times with ethanol to eliminate free (non-reacted) fatty acid. Finally purification was performed with excess of methanol that has been heated at 50°C and the collected product was dried at 40°C to obtain the corresponding powder.

2.4. Encapsulation of *B. longum* by large droplet extrusion

All glassware used in this protocol was sterilized at 121°C for 15 min. Probiotic organisms were encapsulated by an extrusion technique (ionotropic gelation). Briefly, 100 mL of 2 or 3% (w/v) of matrix were prepared in sterile water. Three matrix formulations were prepared: native alginate (NA), palmitoylated alginate (PA) and a blend of native-palmitoylated alginate (NA-PA) at 1:1 (w/w) ratio. Prior to use, all native or modified polymers studied were treated by γ -irradiation at the Canadian Irradiation Centre (Laval, Qc., Canada) at a dose of 10 kGy using a ^{60}Co source irradiator (γ -Cell 220, Nordion, Kanata, Ontario, Canada). The sterile alginate solution was mixed with 10% of glycerol (w/v) and 15 mL of 10^9 CFU/mL probiotic organisms that had been washed twice and concentrated in sterile 0.1% peptone water. The polymeric matrix solution was put into a syringe equipped with a 21-gauge needle and spherical beads were obtained by dropping the suspension in 3% CaCl_2 solution under mild stirring. The beads were allowed to stand for 30 min for hardening, recovered with a strainer and then rinsed with sterile 0.1% peptone water.

Encapsulation yield (EY) in the beads, representing the viable bacteria recovery level, was evaluated as follows:

$$EY = \left(\frac{N_{bead}}{N_{suspension}} \right) \times 100$$

where N_{bead} and $N_{suspension}$ were respectively the total viable counts recovered from the beads and those in the cell suspension (free cell in sterile peptone water) added to the biopolymer mix during the production of the beads, expressed as CFU/g. The alginate concentration generating the highest EY corresponded to the optimal formulation of beads.

2.5. Microencapsulation of *B. longum* by spray

The microbeads preparation was standardized by the use of a specific spray nozzle. A spray gun (air jet droplet generator 058-8050-6, Mastercraft, Tennessee, USA) equipped with a fluid nozzle of 1.4 mm was used to produce the fine droplets of the bacteria-polymer blend. The bacteria-alginate mixtures were prepared as described for the extrusion method. The bacterial solution was poured into the gun bucket and the liquid was sprayed at a pressure of 20 psi in 3% CaCl_2 solution under mild stirring. The microbeads were allowed to stand for 30 min for hardening, collected in a Buchner filter and then rinsed with sterile 0.1% peptone solution.

2.6. Effect of freeze-drying and spray on viable cells concentration (VCC)

Free cells and beads obtained from 3% (w/v) native and modified alginate beads were resuspended in one tenth of its original volume in sterile 0.1% peptone water at room temperature. All the samples were poured in plastic tubes then frozen for 24 h at -80°C before drying in a Lab Conco freeze-drier (Lab Conco Freeze dry system, Kansas City, USA) which was operated at a condenser temperature of -49°C for 24 h under 90 mTorr vacuum.

For determination of VCC, the entrapped bacteria were released from the beads according to a modified method of Sheu and Marshall (1993). One gram of free cells or beads was resuspended in 9 mL of phosphate buffer (0.5 M, pH 7.0) at room temperature and incubated for 15 min to allow rehydration. This suspension was then homogenized in a stomacher (Stomacher 400, Seward Medical, West Sussex, UK) for 1 min. Appropriate dilutions from free cells and beads dissolved in phosphate buffer were done in sterile peptone water (0.1% w/v) and poured on RCM agar plates. Plates were incubated in anaerobic jars containing AnaeroGen[®] for 48 h at 37°C. After incubation, the counting of *Bifidobacteria* colonies was carried out using a Darkfield Quebec Colony Counter 3330 (American Optical Company, New York, U.S.A.), and VCC was expressed as log colony-forming units per gram (log CFU/g).

2.7. Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis of freeze-dried beads

SEM was used to investigate the tridimensional surface morphology of the beads and microbeads. Bead samples were prepared by sticking them to double side carbon tape on SEM stub holder. Samples were sputtered with gold- palladium coating (deposition rate of 30 s equivalent to coating thickness of approximately 50 Å) in a Hummer IV sputter coater. SEM photographs were taken with a Hitachi S-4700 FEG-SEM (Hitachi Canada Ltd., Mississauga, ON, Canada) at a magnification of 40X and 5,000X, at room temperature, equipped with a X-ray detector model 7200 (Oxford Instruments, Abingdon, UK) with a resolution of 1.36 eV at 5.9 keV.

2.8. Statistical analysis

Each experiment was independently replicated 3 times in a completely randomized design. All the analysis and enumerations were done in duplicate to adjust for intra-experimental errors. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) using the software package PASW Statistics 18.0 (IBM Corporation, Somers, NY, USA) or SigmaPlot (Systat Software, Inc.; San Jose, CA, USA). Data comparisons were

performed by Student-Newman-Keuls test. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and discussion

B. longum ATCC 15708 was selected because it is highly sensitive to oxygen and acid (Bolduc *et al.*, 2006; Fortin *et al.*, 2011b). Therefore data on survival will be low in many instances. Devising conditions where viability losses would occur was deliberately done in order to better evidence the potential effects of the bead production processes on viability. This must be kept in mind in evaluating the results.

3.1. Encapsulation yield of *B. longum* by extrusion: influence of alginate concentration and type

B. longum were encapsulated first by extrusion technique. This method generated beads having between 2 and 3 mm of diameter. To investigate the effects of alginate concentration on EY, beads were solubilised in phosphate buffer in order to release completely the probiotic bacteria. The EY values in **Figure 1** correspond to the percentage of viable released bacteria, relatively to amount of bacteria initially loaded in the matrix. EY varied from a minimum of 31% to a maximum level of 65%. This EY calculation method is commonly used (Chandramouli *et al.*, 2004), but the low CFU counts of the bead-entrapped biomass are not necessarily due to low entrapment yields. Indeed, some low CFU readings can partially be attributed to losses in viability during the bead gelification and hardening periods. The CFU/g values in all 4 fresh beads were lower than the original nonencapsulated suspension (**Table 1**). It cannot be stated that the bacterial density in the alginate-cell suspension should be the same as that in the beads, because alginate beads will contract as a function of pH, calcium level and alginate concentration (Chandramouli *et al.*, 2004). Therefore, assuming no viability loss during the encapsulation process and a high encapsulation level, CFU in beads should be similar or slightly higher than the original cell suspension; the opposite was noted (**Table 1**). The low CFU levels in fresh beads (**Table 1**) suggest that the encapsulation procedure used in this study provided stressful conditions for *B. longum* ATCC 15708. Viable counts of the

fresh beads were higher in the NA matrices, although the differences were only statistically significant with the PA-spray method (**Table 1**).

Since viable counts were lower in the PA beads, this would suggest that recovery yields in viable cells would be lower in the PA products. The opposite was noted (**Figure 1**).

The highest recovery level of viable *B. longum* was obtained for beads using 3% PA (**Figure 1**). The beneficial effect was presumably due to palmitoyl chains that, in addition to improving cell retention in the gel, improved the beads hydrophobicity, potentially limiting exposure to oxygen during the hardening period. As mentioned previously, a highly sensitive *B. longum* strain was deliberately chosen for this study. Le-Tien *et al.* (2004b) also observed a protective effect of *N*-palmitoyl alginate on a probiotic culture but in gastro-intestinal conditions. Evidently, the protective effect of PA can extend to the bead production process if a strain is highly sensitive. Since PA seems to offer protection to *B. longum* ATCC 15708 during the encapsulation process, it is not surprising that a lower EY (53%) was found for cells encapsulated with only 2% PA. This result suggests that, with PA, the EY would decrease with decreasing concentrations of polymer. However, no significant difference ($P > 0.05$) in CFU was noted for beads formulated with 2 and 3% NA (**Figure 1**). This potential benefit of increasing alginate concentration on EY has been reported, but other factors also influence calcium alginate encapsulation levels, such as capsule size, probiotic cell load, and hardening time in calcium chloride (Lee & Heo, 2000; Iyer & Kailasapathy, 2005). With respect to EY data for NA-PA mixture (1:1) they were basically intermediate between the NA and PA (**Figure 1**), in accordance with the chemical nature of beads related to palmitic acid / alginate contents ratio which was lower in the mixtures as compared to the pure PA only.

No comparative series of assays to evaluate the EY of particles prepared with the Spray method were carried out. However, data from Table 1 of fresh cultures suggest that yields of “Spray” or “Extrusion” products were similar when NA was used, but lower with spray method when PA was the encapsulating matrix. This is understandable since the

Spray methodology generated smaller beads. Reducing bead diameter increases the surface/volume ratio, which is conducive to increased cell release from the gel.

3.2. Effect of freeze-drying and microencapsulation on VCC

The VCC of free and microencapsulated cells after freeze-drying are shown in **Table 1**. Two sets of data are presented. The first series (first three lines) present actual CFUs in products after encapsulation, and processing. This gives a picture of the additive effects of encapsulation, hardening, freezing and drying on CFUs. The last two lines present the specific effects of freezing and drying on CFUs. The latter was the technological step that most significantly decreased ($P \leq 0.05$) VCC values. Free cells decreased by almost 3 log CFU/ml after freeze-drying.

The bead manufacturing process had the most effect on viability losses to freeze-drying (Table 1). Indeed, VCC reductions during freeze-drying were much lower in the products prepared by the Spray technology, but Extrusion-generated products were also more stable than free cells. The freezing and freeze-drying of *B. longum* could be harmful for the viability of bacteria due to deterioration of the physiological state of the cells (Crittenden *et al.*, 2006; Chavarri *et al.*, 2010). De Giulio *et al.* (2005) report that, during freeze drying, bacteria are subjected to adverse and potentially lethal conditions, such as water crystallization, protein denaturation, bacterial membrane injury, and exposure to air. Analogous phenomenon are observed to variable degrees even in encapsulated and microencapsulated bacteria.

By comparing frozen samples, results show that both microencapsulation methods reduced VCC losses, and particularly those obtained by Spray technology (Table 1) suggesting a significant ($P \leq 0.05$) protective effect of bacteria. The beneficial effect of microencapsulation on freezing has often been reported (Sheu & Marshall, 1993; Shah & Ravula, 2000; Homayouni *et al.*, 2008), and data from this study are therefore in line with the literature. The higher survival level of bacteria encapsulated in the Spray methodology was unexpected because this technology generates smaller beads. Indeed,

better survival to freezing tends to occur with larger-sized beads (Sheu & Marshall, 1993). The reason for this apparent discrepancy with literature has not been established but, evidently, the bead production process can sometimes have a greater effect on survival to freezing than bead size itself. The reduction of beads size generates a greater interaction between bacteria and encapsulation matrix. The benefit of the Spray technology was mainly due to higher survival to freezing.

As opposed to EY, palmitoylation did not improve the survival of bacteria, and there was no significant difference ($P > 0.05$) between PA and NA in viability losses to freezing or freeze drying (Table 1).

3.3. Characterization of freeze-dried Beads and microbeads by SEM

The SEM micrographs of freeze-dried alginate beads and microbeads are shown in **Figures 2** and **3**. Magnifications of 40× and 5,000× were used to characterize the surface of beads and microbeads. Hence, **Figure 2** illustrated the surface morphology of NA (**2A**, **2B**) and PA (**2C**, **2D**) beads obtained by extrusion and **Figure 3** represents the surface morphology of NA (**3A**, **3B**) and PA (**3C**, **3D**) microbeads obtained by spray. The average particle size of NA and PA beads was around 2 mm and that of microbeads ranged between 200 to 250µm. Therefore, spraying process allowed reducing the size of alginate particles by 10 fold.

Micrographs **2A** and **2C** (40×) show that dried NA and PA beads are overall similar, with a spherical, alveolar appearance, smooth, undulated and sponge-like external structure. These characteristics of freeze-dried beads are due to the fast sublimation of frozen water from alginate matrix resulting in formation of pores in areas of former ice crystals without having time to shrink (Srnidel *et al.*, 2008). In comparison, at higher resolution, micrographs **2B** and **2D** (5,000×) suggest more differentiation of substructure between NA and PA beads, with flaked structure of NA beads that possibly present calcium crystals as compared to a smooth (non-flaked) structure presenting micro-alveoli that is typical of substructure of polymer modified with fatty acids. Indeed, this structure is

typical of presence of palmitic acid added by palmitoylation. Absence of cracks in PA was due to palmitoylation of alginate that generated a non-porous surface. Analogous SEM micrographs of NA and PA matrices were reported by other studies (Han *et al.*, 2008; Albertini *et al.*, 2010) and therefore support the topography characterization of the structure (40×) and substructure (5,000×) of these beads.

Micrographs **3A** and **3C** (40×) show that NA and PA microparticles are also similar. However, in comparison with bead-shape obtained by extrusion, their structure is non-spherical (variable irregular shape). In comparison at higher resolution, micrographs **3B** and **3D** (5,000×) suggest more differentiation with a wider segmented structure and clearly smoother, more compact substructure of PA than NA microparticles which present more irregular rough organization. These morphological characteristics could be related to a porous structure (irregular nano-perforations) clearly observable on the surface of NA (**3B**) whereas the surface of PA (**3D**) does not present any nano-perforations. Therefore, it seems that the addition of palmitic acid has generated a non-porous surface of microbeads possibly resulting from hydrophobic interactions of fatty acids at particle surface. However, according to results of **Table 1**, palmitoylation of alginate did not allow increasing cell viability after encapsulation. The effect of spray process on bead morphology was also evaluated by comparing other micrographs at similar scale levels (1:10 magnification ratio to compare beads and microbeads). Photos (data not shown) generally illustrated that for both NA and PA formulations, spraying process induced a reduction of globular structure, compact, irregular shape, generated a finer more dispersed substructure and may also have contributed to reduce the presence of calcium residues (possibly white irregular crystals appearing on micrographs).

4. Conclusions

Effects of different concentrations of NA and PA alginate were investigated in order to maximize the EY of *B. longum* with extrusion-based techniques. Increasing alginate concentration (2 to 3%) improved the recovery level of viable *B. longum* ATCC 15708 in

PA and NA/PA beads. This study showed that PA increased the EY of *B. longum* but did not improve survival to freeze-drying. Therefore, to take advantage of the benefits of the PA matrix in EY and the gastro-intestinal environment, improvements in the survival to freeze-drying are needed. Protective media need to be tested in this aim. The use of palmitoylated alginate as matrix for microencapsulation could potentially be able to improve bacterial survival in acidic food products and help deliver viable bacteria to the host's gastrointestinal tract. Further studies are ongoing on this aspect.

Survival of microencapsulated *B. longum* to freezing and freeze drying was also studied. Results indicated that microencapsulation by a Spray technology increased the VCC of *B. longum* after freezing and freeze drying better than with the extrusion technique. It now remains to be seen if this observation will apply when a more protective freeze-drying medium is used.

SEM micrograph of beads and microbeads showed that spraying had great influence on the size and the morphology of beads, contributed to reduce the beads size and confirmed rough, porous surfaces of NA beads and smooth, non-porous surface of PA, also characterized by the effect of palmitoylation. Consequently, the use of palmitoylated alginate as matrix for microencapsulation could potentially be able to improve bacterial survival in acidic food products and help deliver viable bacteria to the host's gastrointestinal tract. Further studies are ongoing on this aspect.

In summary, this study contributes to the sector of encapsulation of probiotics by the following novel observations 1) recovery of probiotics during encapsulation is improved if the alginate is modified by palmitoylation, 2) most stable structure is PA combined with the spray technique, which correlates with the results obtained for the encapsulation rate and bacterial viability, 3) survival of probiotics to freezing is higher if alginate beads are prepared by a spray technology which generates beads of about 250 μm , 4) palmitoylation of alginate does not improve the survival of *B. longum* to freeze-drying, 5) beads prepared with the palmitoylated matrix were smoother and had less micro-alveoli than those prepared with the native alginate.

Acknowledgments

This study was supported by the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQNT), the Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ), Novalait, Inc. as well as Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC). Thanks are due to Nordion Inc. for irradiation treatments. The technical assistance of Line Mongeon and Nawelle Jolin is gratefully acknowledged.

Références

- Albertini, B., B. Vitali, N. Passerini, F. Cruciani, M. Di Sabatino, L. Rodriguez & P. Brigidi (2010). "Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*." European Journal of Pharmaceutical Sciences **40**(4): 359-366.
- Anal, A. K. & H. Singh (2007). "Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery." Trends in Food Science & Technology **18**(5): 240-251.
- Bolduc, M. P., Y. Raymond, P. Fustier, C. P. Champagne & J. C. Vuilleumard (2006). "Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk." International Dairy Journal **16**(9): 1038-1048.
- Brinques, G. B. & M. A. Z. Ayub (2011). "Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt." Journal of Food Engineering **103**(2): 123-128.
- Capela, P., T. K. C. Hay & N. P. Shah (2006). "Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt." Food Research International **39**(2): 203-211.
- Carvalho, A. S., J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F. X. Malcata & P. Gibbs (2004). "Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*." Biotechnology Progress **20**(1): 248-254.
- Champagne, C. P. & P. Fustier (2007). "Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods." Current opinion in biotechnology **18**(2): 184-190.
- Champagne, C. P., Y. Raymond & T. A. Tompkins (2010). "The determination of viable counts in probiotic cultures microencapsulated by spray-coating." Food Microbiology **27**(8): 1104-1111.
- Chan, E. S. & Z. Zhang (2002). "Encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* by direct compression." Food and Bioproducts Processing **80**(C2): 78-82.
- Chandramouli, V., K. Kailasapathy, P. Peiris & M. Jones (2004). "An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions." Journal of Microbiological Methods **56**(1): 27-35.

- Chavarri, M., I. Maranon, R. Ares, F. C. Ibanez, F. Marzo & M. D. Villaran (2010). "Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions." International Journal of Food Microbiology **142**(1-2): 185-189.
- Crittenden, R., R. Weerakkody, L. Sanguansri & M. Augustin (2006). "Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit." Applied and Environmental Microbiology **72**(3): 2280-2282.
- Cui, J. H., J. S. Goh, P. H. Kim, S. H. Choi & B. J. Lee (2000). "Survival and stability of Bifidobacteria loaded in alginate poly- l -lysine microparticles." International journal of pharmaceutics **210**(1): 51-59.
- De Giulio, B., P. Orlando, G. Barba, R. Coppola, M. De Rosa, A. Sada, P. P. De Prisco & F. Nazzaro (2005). "Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying." World Journal of Microbiology & Biotechnology **21**(5): 739-746.
- Fortin, M. H., C. P. Champagne, D. St-Gelais, M. Britten, P. Fustier & M. Lacroix (2011a). "Viability of bifidobacterium longum in cheddar cheese curd during manufacture and storage: Effect of microencapsulation and point of inoculation." Dairy Science and Technology **91**(5): 599-614.
- Fortin, M. H., C. P. Champagne, D. St-Gelais, M. Britten, P. Fustier & M. Lacroix (2011b). "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**(2): 75-82.
- Godward, G. & K. Kailasapathy (2003). "Viability and survival of free and encapsulated probiotic bacteria in cheddar cheese." Milchwissenschaft **58**(11-12): 624-627.
- Gombotz, W. R. & S. F. Wee (1998). "Protein release from alginate matrices." Advanced Drug Delivery Reviews **31**(3): 267-285.
- Gomes da Cruz, A., F. C. Alonso Buriti, C. H. Batista de Souza, J. A. Fonseca Faria & S. M. Isay Saad (2009). "Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects." Trends in Food Science & Technology **20**(8): 344-354.
- Guo, Z., J. Wang, L. Yan, W. Chen, X. m. Liu & H. p. Zhang (2009). "In vitro comparison of probiotic properties of Lactobacillus casei Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains." LWT - Food Science and Technology **42**(10): 1640-1646.

- Han, J., A. S. Guenier, S. Salmieri & M. Lacroix (2008). "Alginate and chitosan functionalization for micronutrient encapsulation." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(7): 2528-2535.
- Hansen, L. T., P. M. Allan-Wojtas, Y. L. Jin & A. T. Paulson (2002). "Survival of Calcium alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions." Food Microbiology **19**(1): 35-45.
- Heidebach, T., P. Först & U. Kulozik (2009). "Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins." Food Hydrocolloids **23**(7): 1670-1677.
- Homayouni, A., A. Azizi, M. Ehsani, M. Yarmand & S. Razavi (2008). "Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream." Food chemistry **111**(1): 50-55.
- Homayouni, A., M. R. Ehsani, A. Azizi, M. S. Yarmand & S. H. Razavi (2007). "Effect of lecithin and calcium chloride solution on the Microencapsulation process yield of calcium alginate beads." Iranian Polymer Journal **16**(9): 597-606.
- Islam, M. A., C. H. Yun, Y. J. Choi & C. S. Cho (2010). "Microencapsulation of live probiotic bacteria." J Microbiol Biotechnol **20**(10): 1367-1377.
- Iyer, C. & K. Kailasapathy (2005). "Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt." Journal of Food Science **70**(1): M18-M23.
- Karimi, R., A. M. Mortazavian & A. G. Da Cruz (2011). "Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: A review." Dairy Science and Technology **91**(3): 283-308.
- Krasaekoopt, W., B. Bhandari & H. Deeth (2004). "The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria." International Dairy Journal **14**(8): 737-743.
- Le-Tien, C., M. Millette, M. Lacroix & M. A. Mateescu (2004a). "Modified alginate matrices for the immobilization of bioactive agents." Biotechnol Appl Biochem **39**(Pt 2): 189-198.
- Le-Tien, C., M. Millette, M. A. Mateescu & M. Lacroix (2004b). "Modified alginate and chitosan for lactic acid bacteria immobilization." Biotechnol Appl Biochem **39**(Pt 3): 347-354.

- Lee, J. S., D. S. Cha & H. J. Park (2004). "Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(24): 7300-7305.
- Lee, K. Y. & T. R. Heo (2000). "Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution." Applied and Environmental Microbiology **66**(2): 869-873.
- Muthukumarasamy, P., P. Allan-Wojtas & R. A. Holley (2006). "Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules." Journal of Food Science **71**(1): M20-M24.
- Olivares, M., M. P. Díaz-Ropero, N. Gómez, F. Lara-Villoslada, S. Sierra, J. A. Maldonado, R. Martín, J. M. Rodríguez & J. Xaus (2006). "The consumption of two new probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, boosts the immune system of healthy humans." International Microbiology **9**(1): 47-52.
- Ouwehand, A. C. & S. J. Salminen (1998). "The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria." International Dairy Journal **8**(9): 749-758.
- Ozer, B., Y. S. Uzun & H. A. Kirmaci (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**(3): 237-244.
- Pehkonen, K. S., Y. H. Roos, S. Miao, R. P. Ross & C. Stanton (2008). "State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)." Journal of applied microbiology **104**(6): 1732-1743.
- Péter, G. & O. Reichart (2001). "The effect of growth phase, cryoprotectants and freezing rates on the survival of selected micro-organisms during freezing and thawing." Acta Alimentaria **30**(1): 89-97.
- Reid, A. A., J. C. Vuilleumard, M. Britten, Y. Arcand, E. Farnworth & C. P. Champagne (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**(6): 603-619.
- Ross, R. P., C. Desmond, G. F. Fitzgerald & C. Stanton (2005). "Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods." Journal of Applied Microbiology **98**(6): 1410-1417.

- Shah, N. & R. Ravula (2000). "Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts." Australian Journal of Dairy Technology **55**(3): 139-144.
- Sheu, T. Y. & R. T. Marshall (1993). "Microentrapment of Lactobacilli in Calcium Alginate Gels." Journal of Food Science **58**(3): 557-561.
- Smrdel, P., M. Bogataj, A. Zega, O. Planinsek & A. Mrhar (2008). "Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation." Journal of Microencapsulation **25**(2): 90-105.
- Sultana, K., G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris & K. Kailasapathy (2000). "Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt." Int J Food Microbiol **62**(1-2): 47-55.
- Sun, W. R. & M. W. Griffiths (2000). "Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads." International Journal of Food Microbiology **61**(1): 17-25.
- Wick, C., U. Nienabert, O. Anggraeni, T. H. Shellhammer & P. D. Courtney (2004). "Texture, proteolysis and viable lactic acid bacteria in commercial cheddar cheeses treated with high pressure." Journal of Dairy Research **71**(1): 107-115.
- Wouters, J. A., B. Jeynov, F. M. Rombouts, W. M. De Vos, O. P. Kuipers & T. Abee (1999). "Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 in cryoprotection." Microbiology **145**(11): 3185-3194.

Table 1 Effect of freezing and freeze-drying on viability of free, encapsulated and microencapsulated *B. longum* 15708. NA, native alginate; PA, *O*-palmitoylated alginate.

Condition	Viable cell count (log CFU mL ⁻¹ or log CFU g ⁻¹)				
	Non-encapsulated	Encapsulated			
	free cells	NA-Extrusion	PA-Extrusion	NA-Spray	PA-Spray
CFU fresh	9.09 ^{aA}	8.73 ^{bA}	8.63 ^{bA}	8.75 ^{bA}	8.27 ^{cA}
CFU after freezing	7.57 ^{bB}	7.73 ^{abB}	7.50 ^{bB}	8.38 ^{aB}	7.98 ^{aB}
CFU after freeze-drying	6.29 ^{bC}	5.82 ^{cC}	5.41 ^{cC}	6.69 ^{aC}	6.37 ^{abC}
CFU loss in freezing	1.51 ^a	1.00 ^b	1.13 ^b	0.38 ^c	0.30 ^c
CFU loss in drying	1.29 ^a	1.91 ^b	2.09 ^b	1.68 ^c	1.11 ^c

^{abc} Means in the same row followed by the same lower case letter are not significantly different ($P > 0.05$).

^{ABC} Means in the same column followed by the same upper case letter are not significantly different ($P > 0.05$).

List of captions

Figure 1 Encapsulation yield (%) in the extrusion method of encapsulated *B. longum* 15708 in different concentrations of native and *O*-palmitoyl alginate. NA, native alginate; PA, *O*-palmitoylated alginate. Error bars represent standard error of the means.

a,b,c,d : The EY levels of columns having the same letter are not significantly different ($P > 0.05$)

Figure 2 SEM micrographs of the surface of dried beads obtained by extrusion. (A) NA at 40× magnification, (B) NA at 5000× magnification, (C) PA at 40× magnification, (D) PA alginate at 5000× magnification.

Figure 3 SEM micrographs of the surface of dried microbeads obtained by spraying. (A) NA at 40× magnification, (B) NA at 5000× magnification, (C) PA at 40× magnification, (D) PA alginate at 5000× magnification.

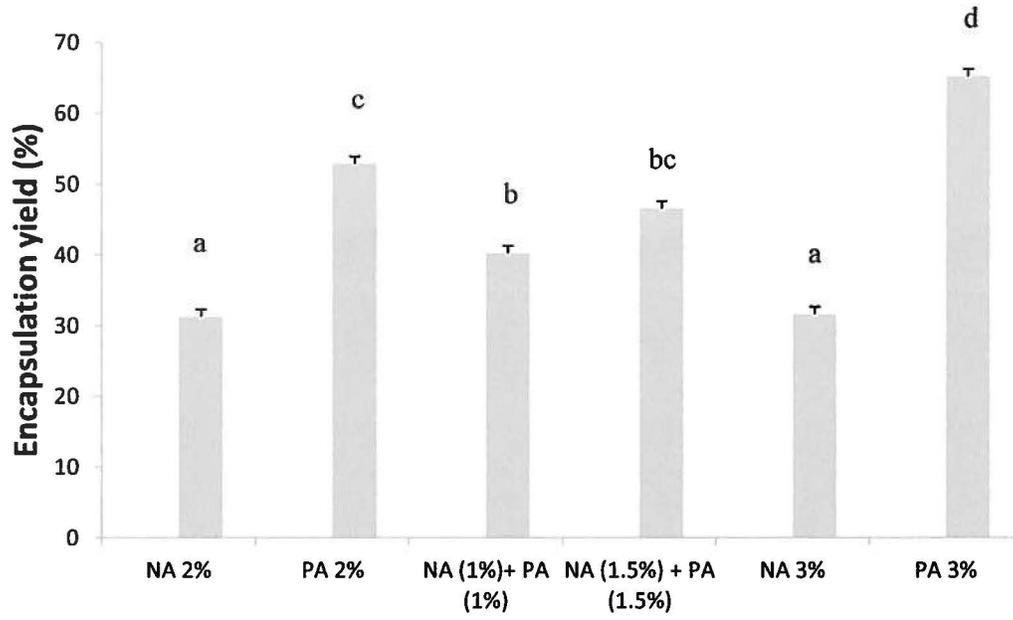


Figure 1

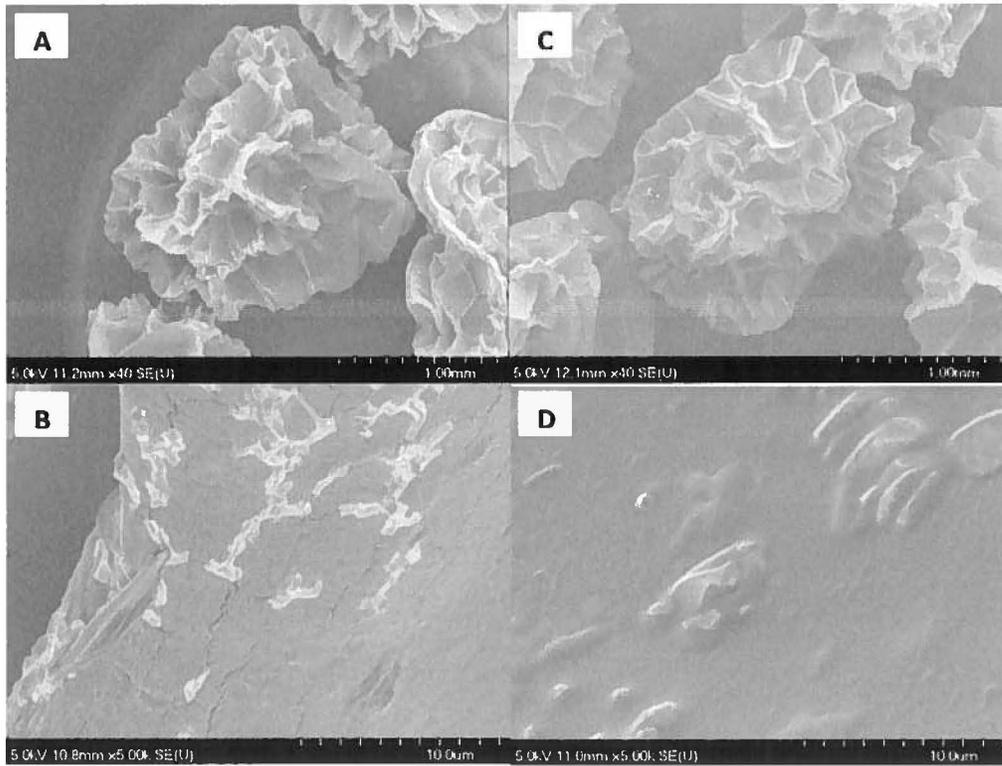


Figure 2

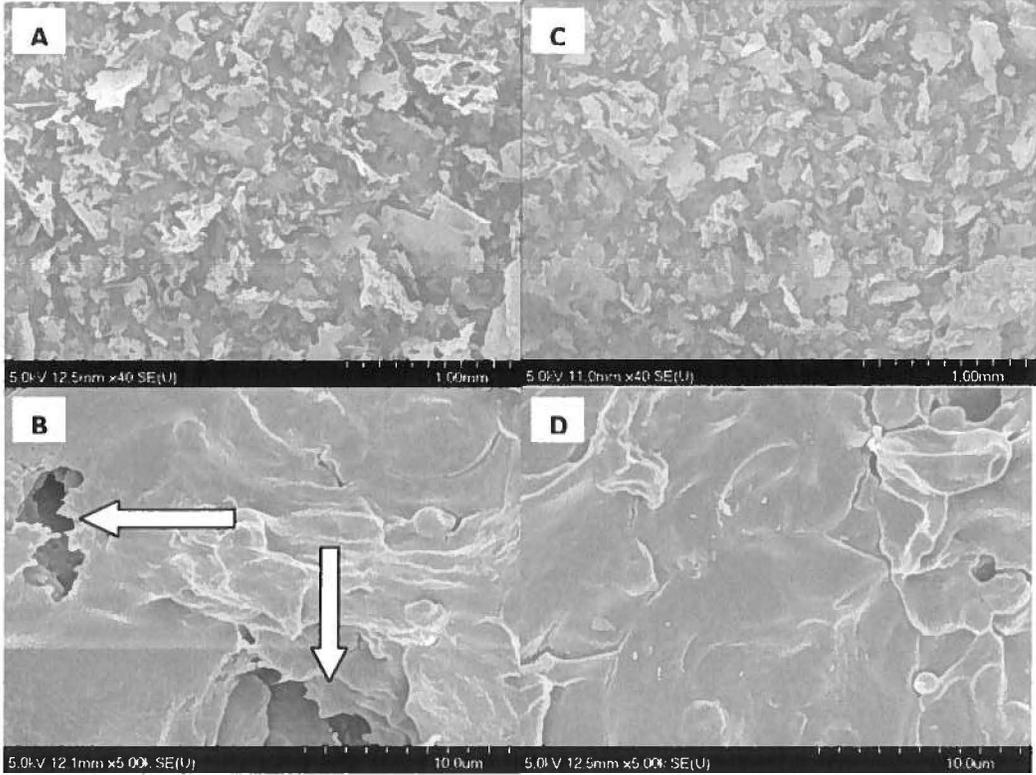


Figure 3

6.2. «Survival of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Cheddar cheese during production and storage».

Khalie Mahamad Amine, Claude P. Champagne, Yves Raymond, Daniel St-Gelais, Michel Britten, Patrick Fustier, Stéphane Salmieri and Monique Lacroix.

Submitted to Food Control, 2013

Rôle des auteurs

J'ai participé à l'élaboration des protocoles, à la réalisation des expériences ainsi qu'à la rédaction de l'article. Dr Champagne est mon codirecteur de recherche. Il a participé activement de part son expertise en microencapsulation pour les bactéries probiotiques à l'élaboration des protocoles, à l'interprétation des résultats et à la correction de l'article. Yves Raymond a aidé à la réalisation des expériences en microencapsulation, en fromagerie et à l'interprétation des résultats. Dr St-Gelais, Dr Britten et Dr Fustier ont collaboré grâce à leur expertise en fromagerie et en transformation laitière, à la prise de décisions concernant le projet et à la correction de l'article. Stéphane Salmieri a aidé à la mise au point du protocole, à l'interprétation des résultats et pour la correction de l'article. Dr Lacroix est la coordinatrice du projet et ma directrice de recherche. Elle a participé à toutes les prises de décisions, les discussions et les corrections de l'article.

Survival of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Cheddar cheese during production and storage

Khalie Mahamad Amine¹, Claude P. Champagne^{2,3}, Yves Raymond², Daniel St-Gelais^{2,3}, Michel Britten^{2,3}, Patrick Fustier², Stéphane Salmieri¹ and Monique Lacroix^{1,3}*

¹ Research Laboratories in Sciences Applied to Food, INRS-Institut Armand-Frappier, Canadian Irradiation Center, 531 boulevard des Prairies, Laval (QC), Canada H7V 1B7;

² Food Research and Development Center, Agriculture and Agri-Food Canada, 3600 boul. Casavant Ouest, St. Hyacinthe QC, Canada J2S 8E2

³ Institute of Nutraceutical and Functional Foods (INAF), Laval University, Quebec, Canada G1K 7P4

Keywords: *Microencapsulation, Cheddar cheese, probiotic bacteria, alginate, palmitoylation, spray noozle, emulsion, gastro-intestinal survival*

* Author to whom correspondence should be addressed, Telephone: +1-450-687-5010;
Fax: +1-450-686-5501; E-mail: monique.lacroix@iaf.inrs.ca

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of microencapsulation (ME) in alginate beads on the viability of *Bifidobacterium longum* 15708 in terms of their tolerance to freezing, storage in a frozen state, cheddar cheese manufacturing and storage as well as to a simulated gastro-intestinal environment. Two ME methods namely i) droplet extrusion method (ADE) and ii) emulsion method, involving two polymers (native (NA) and palmitoylated alginate (PA)) were compared. Results showed that ADE maintained higher viability of *B. longum* after 24 h freezing at -80°C with no viability loss as compared to the emulsion process and free cells which lost approximately 0.8 and 1.5 log CFU/mL respectively. However, during a 4 weeks storage period at -80°C, no significant

difference ($P > 0.05$) was observed in the survival of free and immobilized *B. longum*, with no loss of viability. Cheddar cheeses supplemented with *B. longum* culture were prepared and analyzed during storage at 4°C. After 21 days of storage, Cheddar cheese containing encapsulated *B. longum* in NA and PA polymers produced with the emulsion process showed a good survival with 2 log CFU/ml reduction after 21 days, as compared to ADE-encapsulated *B. longum* and free cells with 3 and 4 log CFU/mL reductions respectively. The immobilized bacteria in both polymers were also more resistant than free cells to simulated gastric and intestinal environments by a factor of 30.

1. Introduction

Functional foods are defined as foods containing health-promoting components that extend beyond traditional nutrients (Halsted, 2003). Many ingredients serve to enrich the food matrix to develop such functional foods, and probiotics are amongst the most popular to this effect. Probiotics are live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host (Araya *et al.*, 2002). These microorganisms should remain viable in food until the time of consumption at a minimum level of 10^7 CFU/g to have positive effects on health (Heidebach *et al.*, 2009; Chavarri *et al.*, 2010). There is increasing demand for dairy foods containing probiotics and many studies have been done in the incorporation of probiotics in yoghurt (Sultana *et al.*, 2000; Sun & Griffiths, 2000; Iyer & Kailasapathy, 2005; Brinques & Ayub, 2011), ice-cream (Godward & Kailasapathy, 2003) and cheese (Bergamini *et al.*, 2005; Ong & Shah, 2009). However, the low pH of fermented milks and the aerobic conditions of production and packaging are detrimental to their survival (Chan & Zhang, 2002; Reid *et al.*, 2007).

Cheese is an interesting food-based delivery vehicle of probiotics to the gastro-intestinal tract due to a higher pH, a higher fat content and a more solid consistency (Bergamini *et al.*, 2005; Ozer *et al.* 2008) than yoghurt, the most frequently used food matrix for probiotics. Cheddar cheese is the most widely produced and consumed hard cheese worldwide. However, this matrix can be detrimental to the viability of probiotic organisms due to the presence of many factors such as salt, oxygen and temperature (Ozer *et al.*, 2008; Fortin *et al.*, 2011a). It was reported that Cheddar cheese produced with added *B. longum* showed a decrease of probiotics during storage (Fortin *et al.*, 2011b). Similar results were obtained by Godward and Kailasapathy (2002). On the other hand, some studies have reported more successful results using *B. bifidum* and *Lactobacillus paracasei* (Dinakar & Mistry, 1994; Gardiner *et al.*, 2002). Therefore, some probiotic strains are not stable in Cheddar cheese and means to improve it are needed.

Micorencapsulation (ME) of probiotic bacteria in biopolymers has received considerable research interest in order to prevent viability losses of probiotic bacteria in foods and during gastro-intestinal transit. Among ME methods, extrusion and emulsion methods are the most common techniques for probiotics (Mortazavian *et al.*, 2007; Albertini *et al.*, 2010). These processes help limit the exposure of probiotic to oxygen (Talwalkar & Kailasapathy, 2003). ME by emulsion also reduces the particle size so as to not alter the sensory properties of food (Anal & Singh, 2007; McClements *et al.*, 2007).

Alginate is the most commonly used biopolymer for the immobilization of probiotic bacteria due to its non-toxic nature, easy-handling, bioavailability, biocompatibility, low cost and easy bead-formation capacity by ionotropic gelation (Gombotz & Wee, 1998; Le-Tien *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2008). However, the effectiveness of alginate as a matrix for ME is limited due to its porous nature that can enable diffusion of water and other low molecular weight compounds into the matrix (Cui *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2002; Chandramouli *et al.*, 2004). To overcome this problem, coatings of alginate particles were investigated. Most strategies involve coating with chitosan or poly-L-lysine (Burgain *et al.* 2011). An outer oil coating has also proved effective in protecting cells towards acidity (Ding & Shah, 2009a), but the literature contains very few studies on the efficiency of modifying alginate itself by fatty acids.

Le-Tien *et al.* (2004) used *N*-palmitoylated alginate and succinylated alginate to increase the survival of *Lactobacillus rhamnosus* during passage 30 min into simulated gastric fluid (pH 1.5). Similar results were reported by Han *et al.* (2008) with *O*-palmitoylated alginate in order to protect the stability of vitamins during storage under high temperature and relative humidity. Therefore, alginate modification has improved its functionality in a gastric environment, but it is unknown if it also protects probiotic cells against some stressful conditions in a cheese matrix (salt, acid).

The objective of this study was to compare the effects of two ME techniques, using two polymers namely native alginate (NA) and palmitoylated (PA) alginate, on the viability of *B. longum* 15708 in Cheddar cheese after 21 days of storage. The effect of ME

technique and alginate polymer on the protection of *B. longum* to simulated gastrointestinal fluids was also examined.

2. Material and methods

2.1. Materials

Raw milk was provided by Agropur (Granby, QC, Canada). Sodium alginate (Sigma, Oakville, Ontario, Canada, from brown algae, Mw 1.5×10^5 Da, $[\eta] = 620$ ml/g, containing approx. 67% of L-guluronate residues), calcium chloride, sodium citrate, sodium hydroxide, glycerol and Bacto-peptone were purchased from Sigma (St-Louis, MO, USA). MRS-grown and BHI were supplied from Difco (Detroit, MI, USA). Tween 80, palmitoyl chloride, acetone and methanol were purchased from Laboratoire Mat (Beauport, Quebec, Canada). Canola oil (100% pure canola oil) was purchased from a local supermarket.

2.2. Strains and cultures conditions

Bifidobacterium longum ATCC 15708 was purchased as freeze-dried cultures from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). Stock cultures were obtained by mixing a MRS-grown (Difco / Becton-Dickinson, 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 this cell suspension in cryovials (Nalgene; Rochester, NY, USA) and storing at -80°C . *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* and *L. lactis* ssp. *lactis* H-102 were obtained from CH-Hansen (Milwaukee, WI, USA) and used as primary starter for Cheddar cheese production.

B. longum were grown in MRS broth (Becton-Dickinson, Mississauga, ON, Canada) 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) at 37°C until a pH 4.5 was reached. Cells were harvested

by centrifugation at 6000 g for 10 min at 4°C. The pellets were washed and resuspended at 1/20 in 0.1% peptone water. The cell suspensions were referred to as the free cells and were used either directly in assays or subjected to ME as described subsequently.

The starter (*L. lactis* ssp. *cremoris* and *L. lactis* ssp. *lactis* H-102) was prepared by inoculating 0.2% (w/w) of a thawed commercial culture of lactic acid bacteria 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, in order to reach a pH of 4.5, and used within 2 h after this incubation time.

2.3. Production of *B. longum* microencapsulated culture

2.3.1. *O*-palmitoylation of alginate

Alginate *O*-palmitoylation was carried out following a modified method of Han *et al.* (2008). An amount of 5 g of sodium alginate were dissolved in 300 mL distilled water. The polymeric solution was heated at 70°C and the pH was adjusted to 7.5. A volume of 20 mL of palmitoyl chloride was then slowly added, maintaining the pH at 7.2-7.5 with 0.5 M NaOH solution. After 2 h, the reaction medium was neutralized (pH 7.0) and the product was precipitated in 1 L ethanol, collected by filtration and washed at least three times with ethanol to eliminate free (non-reacted) fatty acid. Finally, purification was performed by washing with methanol heated at 50°C, and the precipitate was dried at 40°C to obtain the corresponding powder.

2.3.2. Microencapsulation of *B. longum* by co-axial air flow droplet extrusion

The conventional extrusion method was carried out using a nozzle system which is driven by co-axial air flow (Var J1 System, Nisco Engineering, Zurich, Switzerland). This system enables the production of smaller droplets than the traditional syringe methods and will be referred to as the co-axial air-flow droplet extrusion (ADE) process. A volume of 100 mL of 2 % (w/v) NA or a blend of NA/PA in a 1:1 ratio was prepared in

sterile 1 g/L peptone water. Prior to use, all polymers were sterilized at the Canadian Irradiation Centre (Laval, QC, Canada) by γ -irradiation at a dose of 10 kGy using a ^{60}Co source irradiator (γ -Cell 220, Nordion, Kanata, ON, Canada). The sterile alginate solution was mixed with 15 mL of the washed bacterial cell suspension which had 10^9 CFU/mL. The polymeric matrix solution was sprayed at a pressure of 90 psi using the nozzle system attached to a peristaltic pump and the pumping rate was 2 mL/min in a 30 g/L CaCl_2 solution supplemented with 1 g/L peptone (Difco/BD, Franklin Lakes, NJ, USA), 1 g/L tryptone (Difco/BD) and 0.5 g/L yeast extract (Difco/BD) under mild stirring. The pH of this calcium-based gelation solution was of 6.5. The microbeads were allowed to stand for 30 min for hardening, filtered with a Whatman #1 filter paper and then rinsed with sterile 1 g/L peptone water. All samples were resuspended (1:1 ratio) in a cryoprotective medium composed of 200 g/kg rehydrated skim milk powder (Agropur, Granby, Canada), poured in 15 mL plastic tubes and then frozen for 24 h at -80°C . Viable counts of the frozen samples were ascertained during 30 days of storage. In assays on survival to freezing, the free-cell suspensions were suspended in 100 g/kg skim milk.

2.3.3. Microencapsulation of B. longum by emulsion

Bifidobacterium longum were also encapsulated using a modified method of Ding and Shah (2009b,c). Alginate solutions (100 mL) were prepared as described above and mixed with 15 mL of 10^9 CFU/mL probiotic organisms that had been washed and concentrated in sterile 0.1% peptone water. A volume of 300 mL of sterile canola oil containing 0.2 % of sterile Tween 80 was also prepared in a glass beaker and stirred for 10 min at room temperature. A water-in-oil emulsion was made by mixing the bacterial alginate cell suspension with the canola oil under stirring with a magnetic bar. After 10 min stirring, a calcium chloride solution (0.1 M) supplemented with 1 g/L Bacto peptone (Difco/BD), 1 g/L tryptone (Difco/BD) and 0.5 g/L yeast extract (Difco/BD) was gently added down the side of the beaker until phase separation occurred. Microbeads were collected by draining the oil over a sterile Whatman #1 filter paper and then rinsed with sterile 0.1% peptone water. All samples were resuspended (1:1 ratio) in a cryoprotective medium composed of 20% (w/w) rehydrated skim milk powder (Agropur, Granby,

Canada) and poured in plastic tubes then frozen for 24 h at -80°C . Viable counts in these frozen *B. longum* cultures were followed during 30 days of storage.

2.4. Laboratory-scale Cheddar manufacturing system

Cheddar cheese production in 2 L milk batches was carried out as described by Fortin *et al.* (2011b). The frozen probiotic cultures were thawed at room temperature and added in milk in order to achieve a 10^7 CFU/mL level. In short, 2 L of milk at 30°C was inoculated with a H102 starter (Chr Hansen, Denmark) at 10^7 CFU/mL as well as with the free or ME cultures, also at 10^7 CFU/mL, 0.5 mL rennet was added and, the curd was cut with a stainless steel mesh having 1 cm distance between strings. The traditional steps of cooking, stirring, whey drainage, cheddarization, curd cutting and salting were then carried out. Curds were incubated at room temperature (25°C) for 24 h, which is allowed for this product by Quebec governmental legislation, and subsequently stored at 4°C . Samples were taken on the production day as well as at days 1, 7, 14 and 21 of storage for pH and viable counts.

2.5. Resistance to gastrointestinal media

2.5.1. Preparation of simulated gastric and intestinal fluids

The gastric and intestinal solutions were formulated according to the United States Pharmacopeia (USP) test solutions (TS). Simulated gastric fluid (SGF) was prepared by dissolving 2 g of NaCl and 3.2 g of porcine mucosa pepsin (1100 U/mg of protein; P-7000; Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Canada) in 900 mL of water. The pH was then adjusted by HCl (1 N; Fisher Scientific Company, ON, Canada) to obtain a final pH of 2.0. The solution was completed with water for a final volume of 1000 mL.

Simulated intestinal fluid (SIF) was prepared by dissolving 6.8 g of KH_2PO_4 (Laboratoire Mat) in 250 mL of water. Then, 77 mL of NaOH (0.2 N) and 500 mL of water were added under mild stirring. A quantity of 1.25 g of pancreatin (Sigma-Aldrich) and 3 g of

bile salts (Oxgall; Sigma-Aldrich) were added to complete the solution. The pH was adjusted to 6.8 ± 0.1 with NaOH (0.2 N) or HCl (0.2 N) and the SIF was completed by adding water to obtain a final volume of 1000 mL.

2.5.2. Treatment of *B. longum* in SGF and SIF

The SGF and SIF were pre-incubated at 37°C for 60 min to simulate body temperature. A quantity of 1 g of frozen microspheres with entrapped bacteria or 1 mL of frozen free cell suspensions of *B. longum* were thawed at room temperature and then mixed in 25 mL of SGF in triplicate and incubated for 90 min at 37 °C with stirring (200 rpm) using an incubator-shaker (Environmental Shaker G24, New Brunswick Scientific Co. Inc.; Edison, NJ, USA) to simulate bowel movements. After incubation, 1 ml of SGF was transferred in 24 mL of SIF in triplicate. The intestinal suspensions were incubated at 37°C for 180 minutes and sampled at the end of the incubation period. The determination of surviving bacteria concentrations was performed as described below. The experiment was repeated 3 times.

2.6. Determination of viable cells counts (VCC)

Total viable cells counts (VCC) of *B. longum* were determined by a pour plate method. A quantity of 2 g of free cells or microbeads were resuspended in 98 mL of a 20 g/L sodium citrate solution at 45°C followed by homogenization in a stomacher (Stomacher 400, Seward Medical, West Sussex, UK) for 1 min. For milk, curd or whey, 10 g of product was added to 90 ml of a 20 g/L sodium citrate solution at 45°C. To allow a good release of bacteria in frozen microbeads, this homogenate was incubated at room temperature for 15 min and further homogenized with Omni-Tips generator probes (Omni THQ Digital Tissue Homogenizer; Omni International, Kennesaw, GA USA) for 30 s at 27000 rpm. Appropriate dilutions from free cells and beads dissolved in sodium citrate solution were subsequently done in sterile peptone water (1 g/L) and poured on LP agar plates which contained, per L of medium: 35 g liver infusion, 10 g lactose, 10 g bacto-peptone, 2 g NaCl, 2 g LiCl, 3 g sodium propionate and 14 g agar (Fortin *et al.* 2011b). Plates were incubated for 48 h at 37°C in an anaerobic (85% N₂/10%H₂/5%CO₂) atmosphere. VCC of

bifidobacteria was carried out by Darkfield Quebec Colony Counter 3330 (American Optical Company, New York, U.S.A.), expressed as log CFU/g.

2.7. Statistical analysis

Each experiment was performed independently in triplicate ($n = 3$) in a completely randomized design. All analyses and enumerations of each independent assay were done in duplicate to adjust for intra-experimental errors. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) using the software package PASW Statistics 18.0 (IBM Corporation, Somers, NY, USA) and multiple comparisons were performed by Duncan's test. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant. Linear regression analyses between CFU values in curds and corresponding values in whey were carried out with SigmaPlot 12 (Systat Software, San Jose CA, USA).

3. Results and discussion

3.1. Microencapsulation of *B. longum*: effect of freezing

Cheese manufacturers will not prepare microencapsulated probiotic bacteria on the plant site. Rather, they would purchase the cultures from specialized suppliers. Commercial probiotics are marketed in either a frozen or freeze-dried form. Therefore, in order to assess the technological challenge the suppliers of probiotics would encounter, as well as using industry-related experimental conditions, assays were carried out on the freezing of the cultures.

The VCC of free and microencapsulated cells after freezing are shown in **Table 1**. Results indicated that freezing reduced the VCC of *B. longum* by 1.28 log CFU/mL in free cells. The probiotic culture used in this study is known to be sensitive to oxygen, freezing and drying (Bolduc *et al.*, 2006; Fortin *et al.*, 2011a). However, the drops in VCC were much lower in the microencapsulated cells with emulsion process and negligible with the ADE system (**Table 1**). The beneficial effect of ME on survival to

freezing is well documented and these data confirm that of the literature (Sheu *et al.*, 1993; Shah & Ravula, 2000).

Preliminary studies comparing PA and NA alginate and with peptone as the freeze-drying medium instead of milk, showed much greater viability losses (Data not shown). These observations suggest that the use of skim milk with porous alginate matrix can have contributed to protect the probiotic bacteria against adverse environment such as freezing, confirming the usefulness of milk in freezing and drying of cultures (Yu *et al.*, 2001; Albertini *et al.*, 2010). On the other hand, emulsion process led to a significant ($P \leq 0.05$) lower VCC after freezing in NA and PA microbeads as compared to ADE process (Table 1). It could be hypothesized that the addition of oil during ME limited the diffusion of cryoprotectants into the bead and protecting probiotic bacteria during freezing (Gbassi & Vandamme 2012). Homayouni *et al.* (2007) also reported that Tween 80 used for emulsion process has detrimental effect on the viability of probiotic bacteria.

The ADE process generates beads of approximately 500 μm (Nisco Engineering AG, 2012) while the emulsion process results in smaller particles (Ding & Shah, 2009b). Preliminary data comparing survival of the same probiotic strain in alginate beads produced by two extrusion methods which generated beads of 2 mm or 200-250 μm sizes, revealed that smaller beads enabled greater survival to freeze-drying in a peptone medium. In the present study, however, a lower survival to freezing was registered with the smaller beads obtained by emulsion. This is in line with various data which report inferior survival of probiotics in smaller particles to freezing (Sheu *et al.*, 1993) or to gastro-intestinal stresses (Lee & Heo, 2000; Muthukumarasamy *et al.*, 2006). In most cases where small beads are used, the emulsion technique served to manufacture them. Therefore, it is unknown if the inferior stability of the emulsion-generated beads is solely linked to their smaller size or if the production process is involved as well.

Evidently the use of milk instead of peptone as a protective medium improved the survival level, as compared to data in a previous study (Data not shown). The ME process strongly influences the subsequent survival of *B. longum* to freezing, but palmitoylation

of the alginate had a negligible effect on survival to freezing (**Table 1**), in agreement with previous data (Data not shown).

3.2.VCC in microbeads during storage

Results showing the survival of *B. longum* 15708 under 30 days of storage at -80°C are presented in **Table 2**. Data show that the probiotic cultures were rather stable during their storage at -80°C. There was a mean reduction of only 0.15 Log /CFU/g or CFU/ml over 30 days of storage at -80°C. No statistically significant effect ($P > 0.05$) of ME or of the type of alginate was noted on this viability loss (data not shown). Such a minimal loss in viability may be due to the use of an appropriate freezing matrix and of a low storage temperature. The appropriateness of milk as a freezing matrix for lactic cultures has long been demonstrated (Wood & Kriel, 1978) and data from this study show that this observation also applies to bifidobacteria. Furthermore, a temperature of -80°C for storage is recommendable for lactic cultures (Thunell *et al.*, 1984). Commercial freezers at -20°C are inappropriate for the storage of frozen starters and probiotics, and it is advisable to be lower than -40°C (Champagne & Møllgaard, 2008). This recommendation was followed in the experimental design of this study. However, many small cheesemaking units might not have such facilities and data on higher storage temperatures in the frozen state might be of interest.

3.3.VCC during Cheddar cheese production

Frozen *B. longum* cultures were added during Cheddar cheese production in order to evaluate the interest of ME process in industrial conditions of manufacture. Results in **Table 3** show VCC of *B. longum* 15708 during Cheddar at different steps of the cheese manufacturing process. Viable counts on the concentrates had been carried out and CFUs in milk before renneting should theoretically have been identical. However, the VCC of beads prepared with NA in the ADE process were higher than those prepared by emulsion. The reason for this small difference has not been established. There are two

possibilities: variations in survival to thawing and variable loss of viability upon inoculation. Since the viability issues are only minor (**Table 3**), it is understandable that little is known on the interaction between thawing conditions and inoculation practices in milk (Champagne *et al.*, 2011).

Cultures prepared by the emulsification method had the lowest viable counts in the coagulum, with no apparent growth after 30 min of coagulation and cutting (**Table 3**). This would suggest that ME by emulsification reduced the retention of probiotics in curds, but it was not the case. Indeed, a lower recovery level in the curd would result in greater losses of cells in whey. This was not the case, since low VCC counts in whey were also observed with ME-emulsion treatment (**Table 3**). Increases in VCC were obtained in all cheese curds after cutting and cheddaring and before salting. This could be related to either/both growth in the curd and physical concentration of the cells in the matrix due to gel contraction. The VCC in the post-cheddarization curds were lower with the ME by emulsion (**Table 3**) but this was due to the lower initial VCC in the post-cutting curd. A significant correlation ($R^2 = 0.88$; $P = 0.02$) was calculated between post-cutting and post cheddaring VCC values.

Salting reduced the viability of *B. longum* and ME did not prevent this. These data confirmed the detrimental effect of salting on probiotics noted in a previous study under the same free-cell conditions (Fortin *et al.*, 2011). Higher VCC levels were noted in the whey draws off at salting as that after cutting the coagulum. This would presumably be due to a higher VCC level in the curd from which the whey was obtained. Again, lower VCC counts were obtained in the whey of curds containing the probiotic ME by the emulsion technology. This would suggest a link between VCC in post-cheddaring curds and VCC in whey-of during salting. However, a linear regression analysis did not find the relationship to be quite statistically significant ($R^2 = 0.62$; $P = 0.10$). Therefore, cell release in whey at salting was not solely linked to viable counts in the curd prior to salting. Presumably, the lower CFUs in wheys obtained from curds having the emulsion-based beads were not solely linked to lower CFUs in curds but might actually be associated a higher retention level in the curd of the emulsion-produced ME particles. It

remains to be ascertained if this is linked to the small size of the emulsion-made particles or to the properties of the beads resulting from this encapsulation process.

3.4. Stability of VCC during storage of Cheddar cheese

The survival profiles of free and microencapsulated *B. longum* 15708 in Cheddar cheese are presented in **Figure 1**. The counts of *B. longum* in all fresh curds ranged from 7.44 to 7.77 log CFU/g (**Table 3**). Curds were incubated at room temperature for 24 h which is allowed for this product by governmental legislation (1 day at 25°C and subsequently at 4°C) (Gouvernement du Québec, 2013). After one day of storage at room temperature, plate counts for probiotic bacteria decreased significantly ($P \leq 0.05$) for cheese formulated with ADE NA and PA respectively (**Figure 1**). At 7 days of storage, VCC for all cheeses was reduced by 1.5 to 2 log CFU/g respectively as compared to day 0. Fortin *et al.* (2011b) reported that high temperature (in first 24 h storage) and salting could affect the viability of *B. longum* during the first days of storage. Further reductions in VCCs were noted after 14 days of storage for all formulations (**Figure 1**). Indeed, some studies showed that during exposure to continuous acidification of cheeses during storage, low values of pH would be responsible for low stability of probiotic during this period (Fritzen-Freire *et al.*, 2010). However, in our study, after 21 days of storage, maximum viability was found in cheese produced with emulsified PA and NA beads, with only 2 log CFU/g reduction as compared to ADE formulation and free cells showing 3 and 4 log CFU/g reduction in cheese respectively. It could be hypothesized that lipid content in the alginate and/or residual oil from the emulsion process could be involved in the protection of probiotic bacteria.

3.5. Resistance to gastrointestinal media

Figure 2 presents viable cell populations of the cultures during simulated gastrointestinal (GI) transit. To determine the survival of bacteria under GI conditions, the assessment of their survival was performed at the initial time ($t = 0$) and at the end of intestinal

treatment. The differences between the two CFU values was analysed. A significantly higher loss in viability ($P \leq 0.05$) was observed in free cells as compared to those which were microencapsulated (**Figure 2**). This may be attributed to the fact that the highly sensitive bacteria used in this study were more extensively exposed to harmful media of gastric fluid and bile salts as free cells than the microencapsulated cells. The protective effect of alginate ME on survival of probiotics to gastric stresses is well documented (Lee & Heo, 2000; Guerin *et al.*, 2003; Heidebach *et al.*, 2012) and data from this study are in line with these results. Furthermore, there was a significantly higher viability ($P \leq 0.05$) of bacteria after GI passage in NA microbeads than those prepared with the PA matrix, and for both bead production processes, with less than 1 log reduction. It seems that the presence of fatty acids in functionalized polymers (PA) did not have any influence on the protection of *B. longum* during the GI transit. Presumably, the minor losses of probiotics noted with the ME cultures could be assigned to cells remaining on or close to bead surface that are more accessible to acidic medium and bile salts. Therefore, these results suggest that ME of bacteria limited the diffusion of enzymatic and acidic environments, resulting in a higher survival rate of the cultures in alginate matrix as compared to free cells. Several studies have reported that the GI survival of probiotic bacteria increased when the probiotics were encapsulated in alginate particles (Champagne & Kailasapathy, 2008). In addition, some studies have shown that probiotic strains survived better to stressful GI conditions in a milk matrix (Siró *et al.*, 2008; Lo Curto *et al.*, 2011; Tompkins *et al.*, 2011). These results could be related to the buffering effect of milk which could protect the strains against harmful effect of gastric and duodenal environment.

4. Conclusions

Numerous studies have examined the benefits of microencapsulation in the protection of probiotics. This study is original by the fact that the effect of two encapsulation methods and two types of alginate are compared: co-axial air flow droplet extrusion and emulsion involving two alginate polymers NA and PA. This work also has novelty in its scope,

which not only examined the gastro-intestinal protection of probiotics but also at two industrial applications: culture freezing for suppliers and stability in cheese or food processors.

The results generated 10 contributions to science. A first series consist on confirmation of data previously published: 1) ME improves survival of probiotics to freezing, 2) salting of the curd has a negative effect on the viability of *B. longum*, 3) ME in alginate beads improves survival of probiotics to simulated gastro-intestinal conditions.

Original information was also generated in this study: 1) ME by using ADE-produced beads enabled a higher survival of *B. longum* to freezing than those produced by the emulsion technique, 2) *O*-palmitoylation of alginate does not improve survival to freezing of the microencapsulated probiotic, 3) there is no significant difference between free and ME *B. longum* during storage of the cultures at -80°C, 4) more extensive growth of *B. longum* occurs in the initial steps of Cheddar cheesemaking with free cells than with those in alginate capsules, 5) cell release in whey at salting is not solely linked to viable counts in the curd prior to salting, which suggests an effect of ME, 6) *B. longum* encapsulated in the PA-emulsion were more stable during storage of Cheddar than were free cells 7) there is higher viability of bacteria after passage through the in-vitro GI in NA microbeads than those prepared with the PA matrix.

From the present study it can be concluded that the use of ME is a promising strategy for maintaining viability of *B. longum* in cheese and during the gastro-intestinal transit because it benefits three areas of the sequence of use of probiotics by consumers: culture processing sector, food manufacturing sector and in the consumer itself. Alginate modification appears to be a novel approach and this polymer could be use for preserving the viability of some probiotics in food matrix. However, further research on these issues still need to be carried out in order to develop probiotic-containing cheese with highly sensitive cultures such as *B. longum* 15708. Indeed, although there were about 100 times lower viability losses with the best ME culture during the four technological steps that lead to consumption, there was still a loss of over two logs in CFU after the 21 day

storage. This is still too high for commercial use which should presumably not be greater than one log CFU.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQNT), the Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ), Novalait, Inc. as well as Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC). Thanks are due to Canadian Irradiation Center for irradiation treatments. The technical and scientific assistance of Gaétan Belanger, Nancy Guertin and Annie Caron is gratefully acknowledged.

Références

- Albertini, B., B. Vitali, N. Passerini, F. Cruciani, M. Di Sabatino, L. Rodriguez & P. Brigidi (2010). "Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*." European Journal of Pharmaceutical Sciences **40**(4): 359-366.
- Anal, A. K. & H. Singh (2007). "Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery." Trends in Food Science & Technology **18**(5): 240-251.
- Araya, M., L. Morelli, G. Reid, M. Sanders, C. Stanton, M. Pineiro & P. Ben Embarek (2002). "Guidelines for the evaluation of probiotics in food." Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada.
- Bergamini, C. V., E. R. Hynes, A. Quiberoni, V. B. Suárez & C. A. Zalazar (2005). "Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese." Food Research International **38**(5): 597-604.
- Bolduc, M. P., Y. Raymond, P. Fustier, C. P. Champagne & J. C. Vuilleumard (2006). "Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk." International Dairy Journal **16**(9): 1038-1048.
- Brinques, G. B. & M. A. Z. Ayub (2011). "Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt." Journal of Food Engineering **103**(2): 123-128.
- Burgain, J., C. Gaiani, M. Linder & J. Scher (2011). "Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications." Journal of Food Engineering **104**(4): 467-483.
- Champagne, C. P. & K. Kailasapathy (2008). Encapsulation of probiotics. Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals. N. Garti. London, Woodhead Publishing, CRC Press: 344-369.
- Champagne, C. P. & H. Møllgaard (2008). Production of probiotic cultures and their addition in fermented foods. Handbook of fermented functional foods. E. R. Farnworth. Boca Raton, CRC Press (Taylor & Francis). **2**: 71-88.

Champagne, C. P., R. P. Ross, M. Saarela, K. F. Hansen & D. Charalampopoulos (2011). "Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices." International Journal of Food Microbiology **149**(3): 185-193.

Chan, E. S. & Z. Zhang (2002). "Encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* by direct compression." Food and Bioprocess Processing **80**(C2): 78-82.

Chandramouli, V., K. Kailasapathy, P. Peiris & M. Jones (2004). "An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions." Journal of Microbiological Methods **56**(1): 27-35.

Chavarri, M., I. Maranon, R. Ares, F. C. Ibanez, F. Marzo & M. D. Villaran (2010). "Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions." International Journal of Food Microbiology **142**(1-2): 185-189.

Cui, J. H., J. S. Goh, P. H. Kim, S. H. Choi & B. J. Lee (2000). "Survival and stability of Bifidobacteria loaded in alginate poly- l-lysine microparticles." International journal of pharmaceutics **210**(1): 51-59.

Dinakar, P. & V. V. Mistry (1994). "Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese." Journal of dairy science **77**(10): 2854-2864.

Ding, W. & N. P. Shah (2009a). "An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage." Journal of Food Science **74**(2): M53-M61.

Ding, W. K. & N. P. Shah (2009b). "Effect of homogenization techniques on reducing the size of microcapsules and the survival of probiotic bacteria therein." J Food Sci **74**(6): M231-236.

Ding, W. K. & N. P. Shah (2009c). "Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria." J Food Sci **74**(2): M100-107.

Fortin, M. H., C. P. Champagne, D. St-Gelais, M. Britten, P. Fustier & M. Lacroix (2011a). "Viability of *bifidobacterium longum* in cheddar cheese curd during manufacture and storage: Effect of microencapsulation and point of inoculation." Dairy Science and Technology **91**(5): 599-614.

Fortin, M. H., C. P. Champagne, D. St-Gelais, M. Britten, P. Fustier & M. Lacroix (2011b). "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**(2): 75-82.

- Fritzen-Freire, C. B., C. M. O. Mueller, J. B. Laurindo, R. D. D. E. Amboni & E. S. Prudêncio (2010). "The effect of direct acidification on the microbiological, physicochemical and sensory properties of probiotic Minas Frescal cheese." International Journal of Dairy Technology.
- Gardiner, G. E., P. Bouchier, E. O'Sullivan, J. Kelly, J. Kevin Collins, G. Fitzgerald, R. Paul Ross & C. Stanton (2002). "A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture." International Dairy Journal 12(9): 749-756.
- Gbassi, G. K. & T. Vandamme (2012). "Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut." Pharmaceutics 4(1): 149-163.
- Godward, G. & K. Kailasapathy (2003). "Viability and survival of free and encapsulated probiotic bacteria in cheddar cheese." Milchwissenschaft 58(11-12): 624-627.
- Gombotz, W. R. & S. F. Wee (1998). "Protein release from alginate matrices." Advanced Drug Delivery Reviews 31(3): 267-285.
- Gouvernement du Québec (2013) "Loi sur les produits alimentaires." Éditeur officiel du Québec, Québec,
http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=2&file=/P_29/P29.html [consulté le 26 mai 2013]
- Guerin, D., J.-C. Vuilleumard & M. Subirade (2003). "Protection of bifidobacteria encapsulated in polysaccharide-protein gel beads against gastric juice and bile." Journal of Food Protection 66(11): 2076-2084.
- Halsted, C. H. (2003). "Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin?" Am J Clin Nutr 77(4 Suppl): 1001S-1007S.
- Han, J., A. S. Guenier, S. Salmieri & M. Lacroix (2008). "Alginate and chitosan functionalization for micronutrient encapsulation." Journal of Agricultural and Food Chemistry 56(7): 2528-2535.
- Hansen, L. T., P. M. Allan-Wojtas, Y. L. Jin & A. T. Paulson (2002). "Survival of Calcium alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions." Food Microbiology 19(1): 35-45.
- Heidebach, T., P. Forst & U. Kulozik (2012). "Microencapsulation of probiotic cells for food applications." Crit Rev Food Sci Nutr 52(4): 291-311.

- Heidebach, T., P. Först & U. Kulozik (2009). "Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins." Food Hydrocolloids **23**(7): 1670-1677.
- Homayouni, A., M. R. Ehsani, A. Azizi, M. S. Yarmand and S. H. Razavi (2007). "Effect of lecithin and calcium chloride solution on the microencapsulation process yield of calcium alginate beads." Iranian Polymer Journal **16**(9): 597.
- Iyer, C. & K. Kailasapathy (2005). "Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt." Journal of Food Science **70**(1): M18-M23.
- Kailasapathy, K. (2002). "Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications." Current issues in intestinal microbiology **3**(2): 39-48.
- Le-Tien, C., M. Millette, M. A. Mateescu & M. Lacroix (2004). "Modified alginate and chitosan for lactic acid bacteria immobilization." Biotechnol Appl Biochem **39**(Pt 3): 347-354.
- Lee, K. Y. & T. R. Heo (2000). "Survival of Bifidobacterium longum immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution." Applied and Environmental Microbiology **66**(2): 869-873.
- Lo Curto, A., I. Pitino, G. Mandalari, J. R. Dainty, R. M. Faulks & M. S. John Wickham (2011). "Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an in vitro gastric model of digestion." Food Microbiology **28**(7): 1359-1366.
- McClements, D. J., E. A. Decker & J. Weiss (2007). "Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components." J Food Sci **72**(8): R109-124.
- Mortazavian, A., S. H. Razavi, M. R. Ehsani & S. Sohrabvandi (2007). "Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms." Iranian Journal of Biotechnology (IJB) **5**(1).
- Muthukumarasamy, P., P. Allan-Wojtas & R. A. Holley (2006). "Stability of Lactobacillus reuteri in different types of microcapsules." Journal of Food Science **71**(1): M20-M24.
- Ong, L. & N. P. Shah (2009). "Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles." LWT - Food Science and Technology **42**(7): 1260-1268.

- Ozer, B., Y. S. Uzun & H. A. Kirmaci (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**(3): 237-244.
- Reid, A. A., C. P. Champagne, N. Gardner, P. Fustier & J. C. Vuilleumard (2007). "Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles." J Food Sci **72**(1): M031-037.
- Shah, N. & R. Ravula (2000). "Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts." Australian Journal of Dairy Technology **55**(3): 139-144.
- Sheu, T. Y., R. T. Marshall & H. Heymann (1993). "Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment." J Dairy Sci **76**(7): 1902-1907.
- Siró, I., E. Kápolna, B. Kápolna & A. Lugasi (2008). "Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review." Appetite **51**(3): 456-467.
- Sultana, K., G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris & K. Kailasapathy (2000). "Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt." Int J Food Microbiol **62**(1-2): 47-55.
- Sun, W. R. & M. W. Griffiths (2000). "Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads." International Journal of Food Microbiology **61**(1): 17-25.
- Talwalkar, A. & K. Kailasapathy (2003). "Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria." Australian Journal of Dairy Technology **58**(1): 36-39.
- Thunell, R., W. Sandine & F. Bodyfelt (1984). "Frozen starters from internal pH control grown cultures." Journal of Dairy Science **67**(1): 24-36.
- Tompkins, T. A., I. Mainville & Y. Arcand (2011). "The impact of meals on a probiotic during transit through a model of the human upper gastrointestinal tract." Beneficial Microbes **2**(4): 295-303.
- Wood, L. A. & J. B. Kriel (1978). "Preservation of starters by freezing of milk inoculated with starter bacteria." South African Journal of Dairy Technology **10**(1): 29-30.
- Yu, W.-K., T.-B. Yim, K.-Y. Lee & T.-R. Heo (2001). "Effect of skim milk-alginate beads on survival rate of bifidobacteria." Biotechnology and Bioprocess Engineering **6**(2): 133-138.

Table 1 Effect of freezing on viable counts of microencapsulated *B. longum* 15708.

Condition	Viable cell count (log CFU mL ⁻¹ or log CFU g ⁻¹)				
	Free cells (control)	Microencapsulated			
		NA ¹ -ADE	PA-ADE	NA-emulsion	PA-emulsion
Fresh	9.21 ± 0.11 ^{aA}	9.30 ± 0.26 ^{aA}	9.28 ± 0.17 ^{aA}	9.10 ± 0.21 ^{aA}	9.31 ± 0.10 ^{aA}
Frozen	7.93 ± 0.36 ^{aB}	9.21 ± 0.22 ^{cA}	9.06 ± 0.14 ^{cA}	8.34 ± 0.15 ^{bB}	8.44 ± 0.10 ^{bB}

Values represent average Log CFU.mL⁻¹ ± standard deviation

¹ NA = native alginate; PA = palmitoylated alginate; ADE = co axial air-flow droplet extrusion

^{a,b,c} Means in the same row followed by different lower case are significantly different (P ≤ 0.05).

^{A,B} Means in the same column followed by different upper case are significantly different (P ≤ 0.05).

Table 2 Influence of storage at -80°C on the survival of microencapsulated *B. longum* 15708

Storage time (days)	Viable cell count (log CFU mL ⁻¹ or log CFU g ⁻¹)				
	Free cells (control)	Microencapsulated			
		NA ¹ -ADE	PA-ADE	NA-emulsion	PA-emulsion
1	6.93± 0.16 ^a	7.04±0.15 ^a	6.92±0.20 ^a	6.90±0.18 ^a	6.91±0,10 ^a
7	6.78±0.09 ^a	6.90±0.11 ^a	6.68±0.16 ^a	6.73±0.08 ^a	6.72±0.18 ^a
14	6.79±0.07 ^a	6.74±0.08 ^a	6.72±0.10 ^a	6.76±0.16 ^a	6.76±0.10 ^a
30	6.85±0.14 ^a	6.86±0.07 ^a	6.85±0.10 ^a	6.69±0.09 ^a	6.81±0.05 ^a

Values represent average Log CFU.mL⁻¹ ± standard deviation

¹ NA = native alginate; PA = palmitoylated alginate; ADE = co axial air-flow droplet extrusion

^a Values which are followed by the same letter are not significantly different (P > 0.05)

Table 3 Effect of microencapsulation on viable counts of *B. longum* 15708 during Cheddar cheese production.

Cheddar production step or sample	Viable cell count (log CFU mL ⁻¹ or log CFU g ⁻¹)				
	Free cells (control)	Microencapsulated			
		NA ¹ -ADE	PA-ADE	NA-emulsion	PA-emulsion
Milk before renneting	6.85 ±0.07 ^{ab}	6.93 ±0.09 ^a	6.76±0.14 ^b	6.73±0.04 ^b	6.76±0.05 ^b
Coagulum after cutting	7.18 ±0.22 ^a	7.10±0.18 ^a	6.97±0.33 ^{ab}	6.65±0.05 ^b	6.77±0.06 ^b
Whey after cutting	6.53 ±0.10 ^a	6.00±0.22 ^b	5.98±0.22 ^b	5.76±0.15 ^b	5.91±0.17 ^b
Curds after cheddarization (before salting)	7.98 ±0.14 ^a	7.85±0.23 ^a	7.90±0.19 ^a	7.53±0.14 ^b	7.54±0.12 ^b
Salted curds	7.77 ±0.20 ^a	7.76±0,25 ^a	7.60±0.14 ^a	7.36±0.22 ^b	7.44±0,12 ^b
Whey draw off before salting	6.63 ±0.09 ^b	6.77±0.16 ^b	6.70±0.24 ^b	6.51±0.29 ^a	6.35±0.25 ^a

¹ NA = native alginate; PA = palmitoylated alginate; ADE = co axial air-flow droplet extrusion

^{a,b} In a given row, values which are followed by the same letter are not significantly different (P > 0.05)

List of captions

Figure 1 Viable counts of *B. longum* 15708 in model cheese throughout storage (1 day at 22 °C and 20 days at 4 °C). (◆-----) free cells; (□— • —) NA-ADE; (▲•••••) PA-ADE; (O— — —) NA-Emulsion; (X——) PA-emulsion. Error bars represent standard deviation of the means.

Figure 2 Survival of free and microencapsulated *B. longum* 15708 after 1 h 30 incubation in simulated gastric fluid (pH 2.0) and 3 h in simulated intestinal fluid (pH 6.8). Error bars represent standard deviation of the means.

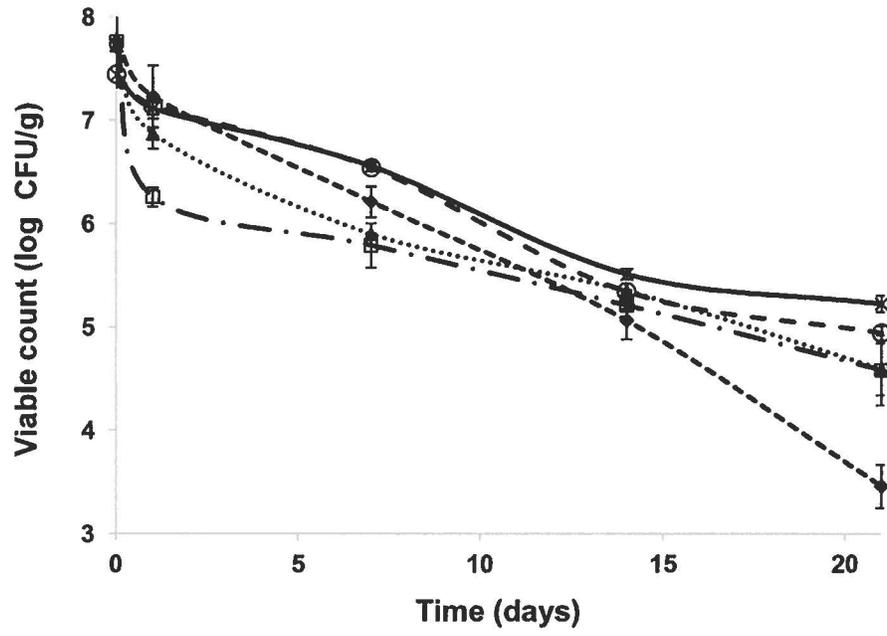


Figure 1

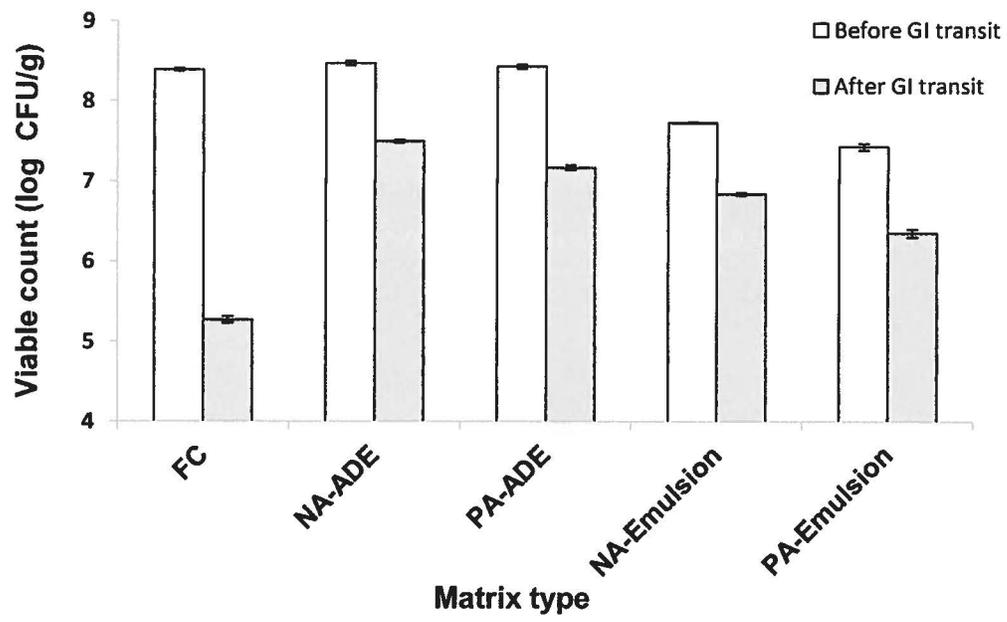


Figure 2

Discussion et conclusion

L'ajout de probiotiques dans les produits laitiers comme le fromage vise à améliorer les effets nutritifs des produits laitiers tout en leur donnant un aspect nutraceutique. L'utilisation de probiotiques sensibles à l'oxygène représente cependant un défi. Pour pallier à ce problème, il fallait mettre au point une méthode de microencapsulation qui va permettre de préserver la viabilité de *B. longum* dans le fromage Cheddar, pendant l'entreposage et en conditions gastro-intestinales. En parallèle, il fallait aussi s'assurer des conditions dans lesquelles les probiotiques encapsulés devraient être conservés.

La première étape consistait à développer une ou deux techniques qui assureraient la viabilité de *B. longum*. Ces techniques se doivent d'être simples, rapides et efficaces. Pour ce faire, le choix reposa sur deux méthodes qui sont la gélification ionotropique de l'alginate dans le calcium et la technique d'émulsion de l'eau dans l'huile. Deux polymères ont été testés, à savoir l'alginate natif et l'alginate palmitoylé.

Des pré-tests sur l'encapsulation ont été effectués afin de vérifier si l'utilisation de polymères modifiés permettait une meilleure survie bactérienne. Le but de l'encapsulation était aussi de déterminer les concentrations optimales des polymères permettant l'obtention d'une meilleure viabilité des probiotiques. Les meilleurs rendements d'encapsulation ont été obtenus avec l'alginate palmitoylé à une concentration de 3%. Ceci démontre que la palmitoylation, qui constitue en l'ajout d'acides gras à l'alginate, a rendu l'alginate plus hydrophobe (diminution de la porosité) et ainsi de mieux préserver la viabilité des probiotiques. Des analyses en SEM ont permis de confirmer la nature moins poreuse de l'alginate palmitoylé lorsque comparé à l'alginate natif. Aussi, on démontre une diminution de la viabilité proportionnellement à une concentration faible d'alginate palmitoylé (2%) ou bien par rapport à l'alginate natif aux deux concentrations testées.

Deux tests de conservation des billes par congélation ont été menés, le premier sans agents cryoprotecteurs et le deuxième utilisant le lait écrémé comme agent

cryoprotecteur. Pour l'effet de la congélation sans cryoprotecteurs, les résultats indiquent une meilleure survie des probiotiques lorsqu'ils sont microencapsulés (gélification ionotropique utilisant le spray ou la technique d'émulsion). On dénombre cependant une perte moins importante pour les cellules encapsulées (gélification ionotropique utilisant la seringue) comparativement aux cellules libres. En présence de cryoprotecteurs, les résultats indiquent une forte survie des probiotiques que ce soit sous formes libres ou microencapsulés, avec aucune perte de viabilité significative suite à une exposition pendant 30 jours à -80°C .

La lyophilisation a un effet néfaste sur la survie de *B. longum* aussi bien sous forme libre qu'encapsulée ou microencapsulée. Ce procédé n'a donc pas été retenu pour la conservation des microbilles et leur incorporation pour les fabrications fromagères.

L'ajout de probiotiques en matrice fromagère indiquent qu'il n'y pas de différence significative ($P > 0.05$) lors des différentes étapes du procédé de fabrication et ce pour tous les traitements (avec ou sans microencapsulation). Une légère croissance a même été notée lors de la cheddarisation. Cependant, une plus grande quantité de probiotiques se sont retrouvées dans le lactosérum. Ces résultats étaient plutôt prévisibles puisqu'avant le drainage du lactosérum, le caillé est découpé en petits morceaux et une bonne partie des probiotiques va se retrouver en dehors du caillé. Comme prévu, le salage du caillé a eu un effet négatif sur la survie de *B. longum*. Mais l'impact est demeuré le même aussi bien pour les cellules libres que microencapsulées.

Une fois les fromages mis au point, une évaluation de la survie des probiotiques pendant le temps d'entreposage a été effectuée. Les fromages ont été entreposés à température ambiante pour la première journée et par la suite à 4°C . L'hypothèse voulant que la microencapsulation protège les probiotiques pendant l'entreposage a donc été vérifiée. Plusieurs résultats en découlent, tout d'abord le fait que la microencapsulation a mieux préservé la survie de *B. longum* pendant les 21 jours du test comparativement aux cellules non protégées. Aussi, la technique d'émulsion utilisant l'alginate palmitoylé s'est avérée être la meilleure. Ce qui s'explique par la double hydrophobicité rencontrée, à savoir

l'utilisation de l'alginate couplé à des acides gras (palmitoylation) et l'utilisation de l'huile végétale pour l'émulsion.

En dernier lieu, des tests simulant les conditions gastriques et intestinales ont été réalisés. Ceci permettait de voir s'il y a une différence lorsque les microbilles sont exposées en conditions acides. Une fois de plus, la microencapsulation s'est avérée efficace avec une meilleure protection des probiotiques dans les différents matrices d'alginate.

En conclusion, ce projet a permis le développement de deux techniques pour la microencapsulation de *B. longum*. L'utilisation de matrice d'alginate ne s'est pas toujours avérée efficace pour la protection des cellules. Cependant, la palmitoylation a permis de préserver la viabilité bactérienne dans la matrice fromagère au cours du temps. Aussi, la microencapsulation a quand même réduit la mortalité dans la plupart des cas. Une meilleure survie des probiotiques a été observée aussi bien lorsque les cellules ont été soumises au froid intense pendant plusieurs jours que pendant une exposition prolongée dans le fromage Cheddar. Le bénéfice de la microencapsulation a aussi été soutenu en conditions gastro-intestinales. Par contre, en conditions gastro-intestinales, aucune différence n'a été observée entre l'alginate natif et palmitoylé. Ainsi, la plupart des défis ont pu être relevés. Toutefois, les techniques utilisées pourraient être améliorées dans le but de générer un produit acceptable qui rencontre les normes industrielles (10^7 UFC/g à la fin de la période d'entreposage). À cet effet, un changement au niveau de la formulation des microbilles d'alginate pourrait être envisageable afin de réduire l'exposition des probiotiques à l'oxygène. D'autres polymères tels que la gomme de gellane, la gomme de xanthane ou la gélatine pourraient être combinées à l'alginate dans le but d'en augmenter le rendement d'encapsulation.

Le transfert technologique de cette étude pourrait être envisageable pour d'autres bactéries sensibles à l'oxygène. Par ailleurs, ces connaissances peuvent ouvrir de nouveaux champs d'application industrielle pour les probiotiques tant au niveau alimentaire que pharmaceutique.

Références

Agriculture et Agroalimentaire Canada (2006). Enquête sur les aliments fonctionnels et les nutraceutiques-Résumé. Ottawa: 29.

Albertini, B., B. Vitali, N. Passerini, F. Cruciani, M. Di Sabatino, L. Rodriguez et P. Brigidi (2010). "Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*." European Journal of Pharmaceutical Sciences **40**(4): 359-366.

Anal, A. K. & H. Singh (2007). "Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery." Trends in Food Science & Technology **18**(5): 240-251.

Araya, M., L. Morelli, G. Reid, M. Sanders, C. Stanton, M. Pineiro et P. Ben Embarek (2002). "Guidelines for the evaluation of probiotics in food." Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada.

Argyri, A. A., G. Zoumpopoulou, K.-A. G. Karatzas, E. Tsakalidou, G.-J. E. Nychas, E. Z. Panagou & C. C. Tassou (2012). "Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests." Food Microbiology.

Aureli, P., L. Capurso, A. M. Castellazzi, M. Clerici, M. Giovannini, L. Morelli, A. Poli, F. Pregliasco, F. Salvini & G. V. Zuccotti (2011). "Probiotics and health: an evidence-based review." Pharmacological research **63**(5): 366-376.

Baranauskiene, R., E. Bylaite, J. Zukauskaite & R. P. Venskutonis (2007). "Flavor retention of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil spray-dried in modified starches during encapsulation and storage." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(8): 3027-3036.

Benichou, A., A. Aserin & N. Garti (2007). "W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **294**(1): 20-32.

Bergamini, C., E. Hynes, C. Meinardi, V. Suárez, A. Quiberoni & C. Zalazar (2010). "Pategrás cheese as a suitable carrier for six probiotic cultures." Journal of Dairy Research **77**(3): 265-272.

Bergamini, C. V., E. R. Hynes, A. Quiberoni, V. B. Suárez & C. A. Zalazar (2005). "Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their

survival in a semi-hard Argentinean cheese." Food Research International **38**(5): 597-604.

Bertolini, A. C., A. C. Siani & C. R. F. Grosso (2001). "Stability of monoterpenes encapsulated in gum Arabic by spray-drying." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(2): 780-785.

Bielecka, M., E. Biedrzycka & A. Majkowska (2002). "Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness." Food Research International **35**(2): 125-131.

Blennow, A., T. H. Nielsen, L. Baunsgaard, R. Mikkelsen & S. B. Engelsen (2002). "Starch phosphorylation: a new front line in starch research." Trends in plant science **7**(10): 445-450.

Bolduc, M. P., Y. Raymond, P. Fustier, C. P. Champagne & J. C. Vuilleumard (2006). "Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk." International Dairy Journal **16**(9): 1038-1048.

Brinques, G. B. & M. A. Z. Ayub (2011). "Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt." Journal of Food Engineering **103**(2): 123-128.

Burgain, J., C. Gaiani, M. Linder & J. Scher (2011). "Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications." Journal of Food Engineering **104**(4): 467-483.

Canadian Dairy Commission, Dairy Farmers of Canada, Canada Dairy Section & Dairy Processors Association of Canada (2012). Statistics of the Canadian dairy industry L'industrie laitière canadienne en chiffres. Ottawa, Agriculture and Agri-Food Canada, Dairy Section Dairy Farmers of Canada : Dairy Processors Association of Canada : Canadian Dairy Commission.: 123.

Capela, P., T. K. C. Hay et N. P. Shah (2006). "Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt." Food Research International **39**(2): 203-211.

Carvalho, A. S., J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F. X. Malcata et P. Gibbs (2004). "Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*." Biotechnology Progress **20**(1): 248-254.

Champagne, C. P. & P. Fustier (2007). "Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods." Current opinion in biotechnology **18**(2): 184-190.

Champagne, C. P. et K. Kailasapathy (2008). Encapsulation of probiotics. Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals. N. Garti. London, Woodhead Publishing, CRC Press: 344-369.

Champagne, C. P. et H. Møllgaard (2008). Production of probiotic cultures and their addition in fermented foods. Handbook of fermented functional foods. E. R. Farnworth. Boca Raton, CRC Press (Taylor & Francis). **2**: 71-88.

Champagne, C. P., Y. Raymond et T. A. Tompkins (2010). "The determination of viable counts in probiotic cultures microencapsulated by spray-coating." Food Microbiology **27**(8): 1104-1111.

Champagne, C. P., R. P. Ross, M. Saarela, K. F. Hansen et D. Charalampopoulos (2011). "Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices." International Journal of Food Microbiology **149**(3): 185-193.

Chan, E. S. et Z. Zhang (2002). "Encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* by direct compression." Food and Bioproducts Processing **80**(C2): 78-82.

Chandramouli, V., K. Kailasapathy, P. Peiris et M. Jones (2004). "An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions." Journal of Microbiological Methods **56**(1): 27-35.

Chavarri, M., I. Maranon, R. Ares, F. C. Ibanez, F. Marzo et M. D. Villaran (2010). "Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions." International Journal of Food Microbiology **142**(1-2): 185-189.

Crittenden, R., A. Laitila, P. Forssell, J. Mättö, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm & P. Myllärinen (2001). "Adhesion of *Bifidobacteria* to granular starch and its implications in probiotic technologies." Applied and Environmental Microbiology **67**(8): 3469-3475.

Crittenden, R., R. Weerakkody, L. Sanguansri et M. Augustin (2006). "Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit." Applied and Environmental Microbiology **72**(3): 2280-2282.

Cruz, A. G., A. E. C. Antunes, A. L. O. P. Sousa, J. A. F. Faria & S. M. I. Saad (2009). "Ice-cream as a probiotic food carrier." Food Research International **42**(9): 1233-1239.

Cui, J. H., J. S. Goh, P. H. Kim, S. H. Choi & B. J. Lee (2000). "Survival and stability of Bifidobacteria loaded in alginate poly- l -lysine microparticles." International journal of pharmaceutics 210(1): 51-59.

Darukaradhy, J., M. Phillips & K. Kailasapathy (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(5): 439-445.

De Giulio, B., P. Orlando, G. Barba, R. Coppola, M. De Rosa, A. Sada, P. P. De Prisco & F. Nazzaro (2005). "Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying." World Journal of Microbiology & Biotechnology 21(5): 739-746.

Desai, K. G. H. & H. J. Park (2005). "Recent developments in microencapsulation of food ingredients." Drying Technology 23(7): 1361-1394.

Devi, N. & T. Maji (2009). "A novel microencapsulation of neem (Azadirachta Indica A. Juss.) seed oil (NSO) in polyelectrolyte complex of κ -carrageenan and chitosan." Journal of Applied Polymer Science 113(3): 1576-1583.

Dinakar, P. & V. V. Mistry (1994). "Growth and viability of Bifidobacterium bifidum in cheddar cheese." Journal of dairy science 77(10): 2854-2864.

Ding, W. & N. P. Shah (2009). "Effect of homogenization techniques on reducing the size of microcapsules and the survival of probiotic bacteria therein." Journal of Food Science 74(6): M231-M236.

Falshaw, R., H. Bixler & K. Johndro (2001). "Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts-I. Structure analysis." Food Hydrocolloids 15(4): 441-452.

Fang, Y., S. Al-Assaf, G. O. Phillips, K. Nishinari, T. Funami, P. A. Williams & L. Li (2007). "Multiple steps and critical behaviors of the binding of calcium to alginate." J Phys Chem B 111(10): 2456-2462.

Food and Agriculture Organization & World Health Organization (2001). Joint, FAO/WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina: 34.

Fortin, M. H., C. P. Champagne, D. St-Gelais, M. Britten, P. Fustier & M. Lacroix (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**(2): 75-82.

Fox, P. F. (1988). Cheese: an overview. Cheese : chemistry, physics, and microbiology. P. F. Fox. London, Elsevier Applied Science: 1-36.

Gardiner, G., E. O'sullivan, J. Kelly, M. Auty, G. Fitzgerald, J. Collins, R. Ross & C. Stanton (2000). "Comparative Survival Rates of Human-Derived Probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during Heat Treatment and Spray Drying." Applied and Environmental Microbiology **66**(6): 2605-2612.

Gardiner, G., C. Stanton, P. Lynch, J. Collins, G. Fitzgerald & R. Ross (1999). "Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract." Journal of Dairy Science **82**(7): 1379-1387.

Gardiner, G. E., P. Bouchier, E. O'Sullivan, J. Kelly, J. Kevin Collins, G. Fitzgerald, R. Paul Ross & C. Stanton (2002). "A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture." International Dairy Journal **12**(9): 749-756.

Gbassi, G. K. & T. Vandamme (2012). "Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut." Pharmaceutics **4**(1): 149-163.

George, M. & T. E. Abraham (2006). "Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review." Journal of Controlled Release **114**(1): 1-14.

Gibbs, F., S. Kermasha, I. Alli, N. Catherine & B. Mulligan (1999). "Encapsulation in the food industry: a review." International Journal of Food Sciences and Nutrition **50**(3): 213-224.

Gibson, G. R. (2004). "Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept)." Clinical Nutrition Supplements **1**(2): 25-31.

Godward, G. & K. Kailasapathy (2003). "Viability and survival of free and encapsulated probiotic bacteria in cheddar cheese." Milchwissenschaft **58**(11-12): 624-627.

Gombotz, W. R. & S. F. Wee (1998). "Protein release from alginate matrices." Advanced Drug Delivery Reviews **31**(3): 267-285.

Gomes da Cruz, A., F. C. Alonso Buriti, C. H. Batista de Souza, J. A. Fonseca Faria & S. M. Isay Saad (2009). "Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects." Trends in Food Science & Technology **20**(8): 344-354.

- Gouin, S. (2004). "Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends." Trends in Food Science & Technology **15**(7-8): 330-347.
- Han, J., A. S. Guenier, S. Salmieri & M. Lacroix (2008). "Alginate and chitosan functionalization for micronutrient encapsulation." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(7): 2528-2535.
- Holzappel, W. H., P. Haberer, J. Snel & U. Schillinger (1998). "Overview of gut flora and probiotics." International Journal of Food Microbiology **41**(2): 85-101.
- Hort, J. & G. Le Grys (2001). "Developments in the textural and rheological properties of UK Cheddar cheese during ripening." International Dairy Journal **11**(4): 475-481.
- Hsu, C.-A., R.-C. Yu, S.-L. Lee & C.-C. Chou (2007). "Cultural condition affecting the growth and production of β -galactosidase by *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 in a jar fermenter." International Journal of Food Microbiology **116**(1): 186-189.
- Iijima, M., M. Shinozaki, T. Hatakeyama, M. Takahashi & H. Hatakeyama (2007). "AFM studies on gelation mechanism of xanthan gum hydrogels." Carbohydrate Polymers **68**(4): 701-707.
- Islam, M. A., C. H. Yun, Y. J. Choi & C. S. Cho (2010). "Microencapsulation of live probiotic bacteria." J Microbiol Biotechnol **20**(10): 1367-1377.
- Iyer, C. & K. Kailasapathy (2005). "Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt." Journal of Food Science **70**(1): M18-M23.
- Jankowski, T., M. Zielinska & A. Wusakowska (1997). "Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules." Biotechnology techniques **11**(1): 31-34.
- Kailasapathy, K. (2002). "Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications." Current issues in intestinal microbiology **3**(2): 39-48.
- Kaur, I. P., K. Chopra & A. Saini (2002). "Probiotics: potential pharmaceutical applications." European Journal of Pharmaceutical Sciences **15**(1): 1-9.
- Kheadr, E., N. Dabour, C. Le Lay, C. Lacroix & I. Fliss (2007). "Antibiotic susceptibility profile of bifidobacteria as affected by oxgall, acid, and hydrogen peroxide stress." Antimicrobial agents and chemotherapy **51**(1): 169-174.
- Klaenhammer, T. R. & M. J. Kullen (1999). "Selection and design of probiotics." International Journal of Food Microbiology **50**(1): 45-57.

Krasaekoopt, W., B. Bhandari & H. Deeth (2003). "Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt." International Dairy Journal **13**(1): 3-13.

Krishnan, S., R. Bhosale & R. S. Singhal (2005). "Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials." Carbohydrate Polymers **61**(1): 95-102.

Le-Tien, C., M. Millette, M. Lacroix & M. A. Mateescu (2004a). "Modified alginate matrices for the immobilization of bioactive agents." Biotechnol Appl Biochem **39**(Pt 2): 189-198.

Le-Tien, C., M. Millette, M. A. Mateescu & M. Lacroix (2004b). "Modified alginate and chitosan for lactic acid bacteria immobilization." Biotechnol Appl Biochem **39**(Pt 3): 347-354.

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

Madene, A., M. Jacquot, J. Scher & S. Desobry (2006). "Flavour encapsulation and controlled release - A review." International Journal of Food Science and Technology **41**(1): 1-21.

Marteau, P. & M. Boutron-Ruault (2002). "Nutritional advantages of probiotics and prebiotics." British Journal of Nutrition **87**(2): 153-158.

Martins, I. M., S. N. Rodrigues, F. Barreiro & A. E. Rodrigues (2009). "Microencapsulation of thyme oil by coacervation." Journal of Microencapsulation **26**(8): 667-675.

Matamoros, S., P. Savard & D. Roy (2011). "Genotyping of *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* strains by multilocus variable number of tandem repeats analysis." Journal of Microbiological Methods.

Mc Brearty, S., R. Ross, G. Fitzgerald, J. Collins, J. Wallace & C. Stanton (2001). "Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on Cheddar cheese quality." International Dairy Journal **11**(8): 599-610.

McClements, D. J., E. A. Decker & J. Weiss (2007). "Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components." J Food Sci **72**(8): R109-124.

Mortazavian, A., S. H. Razavi, M. R. Ehsani & S. Sohrabvandi (2007). "Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms." Iranian Journal of Biotechnology (IJB) 5(1).

O'riordan, K., D. Andrews, K. Buckle & P. Conway (2002). "Evaluation of microencapsulation of a Bifidobacterium strain with starch as an approach to prolonging viability during storage." Journal of applied microbiology 91(6): 1059-1066.

O'riordan, K. & G. Fitzgerald (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(1): 103-114.

Ogawa, E., R. Takahashi, H. Yajima & K. Nishinari (2006). "Effects of molar mass on the coil to helix transition of sodium-type gellan gums in aqueous solutions." Food Hydrocolloids 20(2): 378-385.

Özer, B., H. A. Kirmaci, E. Şenel, M. Atamer & A. Hayaloğlu (2009). "Improving the viability of Bifidobacterium bifidum BB-12 and Lactobacillus acidophilus LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation." International Dairy Journal 19(1): 22-29.

Ozer, B., Y. S. Uzun & H. A. Kirmaci (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(3): 237-244.

Pandey, P., H. Ramaswamy & D. St-Gelais (2003). "Evaluation of pH change kinetics during various stages of Cheddar cheese-making from raw, pasteurized, micro-filtered and high-pressure-treated milk." Lwt-Food Science and Technology 36(5): 497-506.

Parvez, S., K. Malik, S. Ah Kang & H. Y. Kim (2006). "Probiotics and their fermented food products are beneficial for health." Journal of applied microbiology 100(6): 1171-1185.

Peña, C., K. De la Caba, A. Eceiza, R. Ruseckaite & I. Mondragon (2010). "Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition." Bioresource Technology 101(17): 6836-6842.

Rahman, M. M., W.-S. Kim, T. Ito, H. Kumura & K.-i. Shimazaki (2009). "Growth promotion and cell binding ability of bovine lactoferrin to *Bifidobacterium longum*." Anaerobe 15(4): 133-137.

Rokka, S. & P. Rantamäki (2010). "Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications." European Food Research and Technology 231(1): 1-12.

Saad, N., C. Delattre, M. Urdaci, J. Schmitter & P. Bressollier (2012). "An overview of the last advances in Probiotic and Prebiotic field." Lwt-Food Science and Technology.

Saarela, M., G. Mogensen, R. Fondén, J. Mättö & T. Mattila-Sandholm (2000). "Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties." Journal of Biotechnology **84**(3): 197-215.

Sang, Y., S. Bean, P. A. Seib, J. Pedersen & Y. C. Shi (2008). "Structure and functional properties of sorghum starches differing in amylose content." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(15): 6680-6685.

Sankalia, M. G., R. C. Mashru, J. M. Sankalia & V. B. Sutariya (2007). "Reversed chitosan–alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: optimization and physicochemical characterization." European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics **65**(2): 215-232.

Saraf, N. M., D. V. Alat & R. Chakrabarti (2007). "Microencapsulation at an affordable price." Colourage **54**(9): 66.

Shu, X. & K. Zhu (2000). "A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery." International journal of pharmaceutics **201**(1): 51-58.

Shu, X. & K. Zhu (2002). "The release behavior of brilliant blue from calcium–alginate gel beads coated by chitosan: the preparation method effect." European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics **53**(2): 193-201.

Silva, D., J. Maciel, J. P. A. Feitosa, H. C. B. Paula & R. C. M. de Paula (2010). "Polysaccharide-based nanoparticles formation by polyelectrolyte complexation of carboxymethylated cashew gum and chitosan." Journal of materials science **45**(20): 5605-5610.

Simsek-Ege, F. A., G. M. Bond & J. Stringer (2003). "Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH." Journal of Applied Polymer Science **88**(2): 346-351.

Smidsrod, O. & G. Skjak-Braek (1990). "Alginate as immobilization matrix for cells." Trends in Biotechnology **8**(3): 71-78.

Stanton, C., G. Gardiner, H. Meehan, K. Collins, G. Fitzgerald, P. B. Lynch & R. P. Ross (2001). "Market potential for probiotics." The American journal of clinical nutrition **73**(2): 476s-483s.

Strompfova, V., A. Lauková & A. C. Ouwehand (2004). "Selection of enterococci for potential canine probiotic additives." Veterinary microbiology **100**(1): 107-114.

Sullivan, Å. & C. Nord (2002). "The place of probiotics in human intestinal infections." International journal of antimicrobial agents **20**(5): 313-319.

Sultana, K., G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris & K. Kailasapathy (2000). "Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt." Int J Food Microbiol **62**(1-2): 47-55.

Sun, W. R. & M. W. Griffiths (2000). "Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads." International Journal of Food Microbiology **61**(1): 17-25.

Van De Velde, F., N. D. Lourenço, H. M. Pinheiro & M. Bakker (2002). "Carrageenan: A Food-Grade and Biocompatible Support for Immobilisation Techniques." Advanced Synthesis and Catalysis **344**(8): 815-835.

Van der Graaf, S., C. Schroen & R. Boom (2005). "Preparation of double emulsions by membrane emulsification—a review." Journal of membrane science **251**(1): 7-15.

Vandamme, T. F., D. Poncelet & P. Subra-Paternault (2007). Microencapsulation, Lavoisier.

Vignola, C. L. (2002). Science et technologie du lait: transformation du lait, Presses Polytechnique de Montréal.

Wick, C., U. Nienabert, O. Anggraeni, T. H. Shellhammer & P. D. Courtney (2004). "Texture, proteolysis and viable lactic acid bacteria in commercial cheddar cheeses treated with high pressure." Journal of Dairy Research **71**(1): 107-115.

Wohlgemuth, S., G. Loh & M. Blaut (2010). "Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects." International Journal of Medical Microbiology **300**(1): 3-10.

Yoksan, R., J. Jirawutthiwongchai & K. Arpo (2010). "Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **76**(1): 292-297.