

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques  
Département de Biochimie – Microbiologie

## Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Biologie

Option : Biochimie Appliquée

### THEME:

*La technologie de la microencapsulation  
et l'analyse physico-chimique de quelques  
produits alimentaires*

Présenté par : SMATEL Tilleli

OUDIAI Zina

Devant le jury composés de :

Promotrice : Melle DERMECHE S.

Maitre assistante Classe A UMMTO

Président : Mr TITOUCHE Y.

Maitre assistant Classe A UMMTO

Examineur : Mme ISSELNANE S.

Maitre assistante Classe A UMMTO

Promotion 2015/2016

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques  
Département de Biochimie – Microbiologie

## Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Biologie

Option : Biochimie Appliquée

### THEME:

*La technologie de la microencapsulation  
et l'analyse physico-chimique de quelques  
produits alimentaires*

Présenté par : SMATEL Tilleli

OUDIAI Zina

Devant le jury composés de :

Promotrice : Melle DERMECHE S.

Maitre assistante Classe A UMMTO

Président : Mr TITOUCHE Y.

Maitre assistant Classe A UMMTO

Examineur : Mme ISSELNANE S.

Maitre assistante Classe A UMMTO

Promotion 2015/2016

## **REMERCIEMENTS**

*Merci à toi, Dieu, autant de fois qu'il y a de particules dans l'univers, d'eau dans la mer et de vies sur terre.*

*Qu'il me soit permis d'exprimer ma gratitude à monsieur MATI A., de m'avoir accueilli parmi les siens, de m'avoir proposé ce sujet, mis à ma disposition les conditions nécessaires pour la réalisation de ce travail. J'ai beaucoup apprécié ses conseils et sa naturelle bienveillance.*

*Un remerciement spécial et sincère à madame DERMACHE qui, sans sa collaboration et son aide, je n'aurais pu surmonter bon nombre de difficultés dans mon travail.*

*Egalement remerciée doit être., maitre de conférences à l'UMMTO pour avoir accepté de présider le jury.*

*Mes sincères remerciements s'adressent également aux autres membres de jury-*

*Enfin, tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

*A tous, mes plus vifs remerciements.*

# DÉDICACES

Avec un grand plaisir que je dédie ce travail a mes très chers

Parents qui m'ont souvent encouragé.

A mon frère djoudi et ma sœur souhila.

A ma belle mère.

A toi mon cher mari samir, ton soutien moral et matériel,

Ton profond attachement,

M'ont permis de réussir mes études.

A ma binôme tilleli ainsi qu'à toute sa famille.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit

Possible, je vous dis merci.

**ZINA**

## Liste des abréviations

**$\alpha$ -la** : alpha lactalbumine

**$\beta$ -lg** : beta lactoglobuline

**BSA** : albumine sérum bovine

**DNS** : l'acide 3,5 dinitrosalicylique

**DO** : densité optique

**Da** : dalton

**DCPIP** : 2,6 dichlorophenol indophénol

**NaCO<sub>3</sub>** : bicarbonate de sodium

**KOH** : potasse alcoolique

**g** : gramme

**v** : volume

**ml** : millilitre

**Ia** : indice d'acidité

**N** : normalité

**m** : masse de la solution

**M** : masse molaire

**Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** : thiosulfate de sodium

**Ii** : indice d'iode

**P** : poids

**nI** : nombre d'instauration

**MI<sub>2</sub>** : masse molaire de l'iode

**L** : litre

**nm** : nanomètre

**Na Cl** : chlorure de sodium

**mg** : milligramme

**Ph** : potentiel d'hydrogène

**UMMTO** : Université Mouloud Mammeri Tizi ouzou

**V<sub>o</sub>** : volume mort

**Hcl** : chlorure d'hydrogène

**µl** : microlitre

**SDS** : dodicyl sulfate de sodium

**PAGE** : électrophorèse sur gel de polyacrilamide

**T%** : % d'acrylamide et de bis acrylamide dans le volume v du tampon

**LABAB** : Laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies

**TEMED** : N, N, N, N- tetraméthylènediamine

**V** : volte

**ma** : milliampère

**λ** : lambda

**TCA** : acide trichloracétique

**CN** : caséine

**PS** : protéines sériques

**HPLC** : chromatographie liquide haut pression

**FPLC** : chromatographie liquide rapide des protéines

**ED** : eau distillé

**2-βME** : 2β Mercapto Ethanol

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>** : persulfate d'amoniim

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

<b>FIGURES .....</b>	<b>Pages</b>
<b>Figure 01 :</b> Morphologie d'une microcapsule .....	02
<b>Figure 02 :</b> Protocole de l'encapsulation par atomisation .....	03
<b>Figure 03 :</b> Schéma de principe du procédé de microencapsulation par coacervation complexe	05
<b>Figure 04 :</b> Différents techniques de la microencapsulation .....	07
<b>Figure 05 :</b> Schéma de principe du procédé d'encapsulation par refroidissement spray chilling/spray cooling. (BELOUADEH.Ch, 2012) .....	08
<b>Figure 06 :</b> Deux principes de la délivrance des substances encapsulées .....	09
<b>Figure 07 :</b> Illustration schématique des différents procédés d'encapsulation des composés aromatiques .....	15
<b>Figure 08 :</b> Structure chimique de phénol .....	16
<b>Figure 09 :</b> Bactéries les plus utilisées en complément aux produits alimentaires .....	19
<b>Figure 10 :</b> Structure chimique d'alginate .....	22
<b>Figure 11 :</b> Formation de la boîte à œuf .....	23
<b>Figure 12 :</b> Structure chimique du chitosane .....	24
<b>Figure 13 :</b> Structure chimique de la vitamine C .....	28
<b>Figure 14 :</b> Réaction de l'oxydation de la vitamine C .....	29
<b>Figure 15 :</b> Réaction chimique du DNS sur les sucres réducteurs .....	30
<b>Figure 16 :</b> Courbe étalon du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS, réalisée avec du glucose comme sucre de référence .....	31
<b>Figure 17 :</b> Structure de bleu de coomassie .....	32
<b>Figure 18 :</b> Courbe étalon de dosage des protéines par la méthode de LOWRY et al (1951), réalisée avec le Sérum Albumine Bovine (BSA) comme protéine de référence .....	32
<b>Figure 19 :</b> Photographie d'une unité de chromatographie basse pression .....	33
<b>Figure 20 :</b> Elution des protéines à travers le gel de Séphacryl S200 .....	34
<b>Figure 21 :</b> mécanisme d'action de la trypsine .....	34
<b>Figure 22 :</b> Dépôt des échantillons en électrophorèse .....	36
<b>Figure 23 :</b> Photographie d'une unité d'électrophorèse (HOEFFER SE 260) A : générateur de courant ; B : cuve de migration .....	37
<b>Figure 24 :</b> Structure du dodecyl sulfate de sodium (SDS) .....	37
<b>Figure 25 :</b> Teneur en glucides dans différents jus de fruit .....	43

<b>Figure 26 :</b> chromatogramme des protéines sériques du lait de vache sur Séphacryl S200 ; F1, F2, F3 : les fractions éluées respectivement à : 11, 21, 51 ml d'éluant .....	45
<b>Figure 27 :</b> Electrophorégramme des fractions récupérées par la chromatographie de perméation (PAGE-native) ; gel à T = 12 %, C = 2,7 % .....	47
<b>Figure 28:</b> Electrophorégramme des hydrolysats (protéines sériques lyophilisées du lait de vache) en PAGE-SDS ; gel de concentration (T= 4% et C= 2.7%), gel de séparation (T= 17% et C= 2.7%) .....	48

# Tableau

<b>Tableau I</b> : Mécanismes de la libération contrôlée des arômes .....	10
<b>Tableau II</b> : Quelques exemples de composés encapsulés dans le domaine alimentaire .....	12
<b>Tableau III</b> : Domaine d'application des différentes méthodes d'encapsulation dans l'industrie alimentaire .....	13
<b>Tableau IV</b> : Classification et structure chimique des polyphénols .....	17
<b>Tableau V</b> : Appareillage et verrerie utilisés au cours de stage pratique.....	26
<b>Tableau VI</b> : Echantillons utilisés.....	27
<b>Tableau VII</b> : Les pH et les teneurs en vitamine C (g/l) enregistrés dans différents jus de fruits commercialisés.....	39
<b>Tableau VIII</b> : Indice d'iode et d'acidité de l'huile d'olive et de tournesol.....	42
<b>Tableau IX</b> : Concentration en protéines totales et protéines sériques des échantillons dosés par la méthode de BRADFORD et al.....	43

## ANNEXES

**Annexe 01 :** Dosage de la vitamine C dans un jus de fruit par la méthode au 2-6-DPIP.

**Annexe 02 :** Détermination d'indice d'acidité d'une matière grasse.

**Annexe 03 :** Détermination d'indice d'iode d'une matière grasse.

**Annexe 04 :** Dosage des glucides, méthode utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS).

**Annexe 05 :** Détermination de la teneur en protéines par la méthode de BRADFORD et al (1976).

**Annexe 06 :** Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200.

**Annexe 07 :** Hydrolyse enzymatique des protéines du lait de vache (caséines et protéines lyophilisées) par la trypsine.

**Annexe 08 :** Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE native).

**Annexe 09 :** Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes, en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS).

**Annexe 10 :** Révélation des bandes de migration électrophorétiques (native et SDS).

# **TABLE DES MATIERES**

## **I. Synthèse des données bibliographiques**

### **Introduction**

#### **1.1- Généralités sur la microencapsulation**

1.1.1-Définition

1.1.2-Classification de la microencapsulation

#### **1.1.3 - Techniques de microencapsulation**

1.1.3.1- Microencapsulation par séchage par atomisation (spray drying)

1.1.3.2 - Microencapsulation par gélification ionotropique

1.1.3.3 - Microencapsulation par coacervation

1.1.3.4- Microencapsulation par interactions électrostatiques

1.1.3.5- Microencapsulation par émulsion

1.1.3.6- Microencapsulation par refroidissement spray chilling/spray cooling

1.1.4- Biopolymères les plus utilisés dans le domaine alimentaire

1.1.5 - Composés encapsulés dans le domaine alimentaire

1.1.6 -Intérêts de la microencapsulation

#### **1.2- Microencapsulation des arômes**

1.1.6.1-La microencapsulation garantit une bonne protection de la substance encapsulée

1.1.6.2- La microencapsulation permet de contrôler la libération de la substance encapsulée

1.1.6.3- Libération contrôlée des arômes

1.1.7- Composés encapsulés dans le domaine alimentaire

1.1.8- Domaine d'application des techniques d'encapsulation

#### **1.3- Microencapsulation des molécules antioxydantes**

1.2.1. Les polyphénols des antioxydants modèles

1.2.2. Microencapsulation des composés phénoliques

#### **1.4- Les probiotiques dans l'alimentation**

##### **1.4.1 - Généralités**

1.4.1.1- Définition

- 1.4.1.2- Classification des probiotiques
- 1.4.1.3- Utilisation des probiotiques
- 1.4.1.4- Les effets des probiotiques dans l'alimentation
- 1.4.1.5- Microencapsulation pour les bactéries probiotiques
- 1.4.1.6- Importance de l'encapsulation des probiotiques
- 1.4.1.7 - Polymères employés dans la microencapsulation des probiotiques
  - 1.4.1.7.1- Alginate
  - 1.4.1.7.2- Chitosane

## **Conclusion**

## **II. Etude expérimentale**

### **Introduction**

#### **1. Matériels et méthodes**

##### **1.1. Matériel**

- 1.1.1- Verrerie et appareillage
- 1.1.2- Matériel biologique (Echantillons utilisés)
  - 1.1.3 - Produits chimiques et réactifs

##### **1.2- Méthodes expérimentales**

- 1.2.1- Méthodes physicochimiques
  - 1.2.1.1- Mesure du pH
  - 1.2.1.2- Détermination de la teneur en vitamine C dans un jus d'orange
  - 1.2.1.3- Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse
    - 1.2.1.3.1- Détermination d'indice d'acidité d'une matière grasse
    - 1.2.1.3.2- Détermination d'indice d'iode d'une matière grasse
  - 1.2.1.4- Dosage des glucides (sucres réducteurs) par la méthode utilisant l'acide 3-5 dinitrosalicylique (DNS)
  - 1.2.1.5- Dosage des protéines : méthode de BRADFORD et al (1976)
- 1.2.2- Méthodes chromatographiques
  - 1.2.2.1- La dialyse des protéines sériques des caséines du lait de vache
  - 1.2.2.2- Congélation et lyophilisation
  - 1.2.2.3- Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200

1.2.3- Hydrolyse enzymatique des protéines lyophilisées du lait de vache : les caséines et les protéines sériques par la trypsine

1.2.4-Méthodes électrophorétiques

1.2.4.1-Définition et principe général

1.2.4.2-Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

1.2.4.2.1-Conditions générales

1.2.4.2.2- Méthode d'électrophorèse

1.2.4.3- En conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE- native)

1.2.4.4 - En présence du SDS et de 2-β ME (PAGE-SDS)

1.2.4.5- Révélation des bandes de migration électrophorétique

## **2.2- Résultats et discussion**

2.2.1-Qualité physicochimique

2.2.1.1-Mesure de pH

2.2.1.2- Teneur en vitamine C dans un jus

2.2.1.3. Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse

2.2.1.3.1. Indice d'acidité

2.2.1.3.2. L'indice d'iode

2.2.1.4. Teneur en glucides dans un jus de fruit méthode utilisant le DNS

2.2.1.5. Teneur en protéines

2.2.2. Méthodes chromatographiques

2.2.2.1. Purification des protéines par chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S200

2.2.3.1. Isolement et caractérisation électrophorétiques des protéines sériques du lait de vache en PAGE-native

2.2.3.2. Isolement et caractérisation électrophorétiques des caséines et protéines sériques lyophilisées du lait de vache en PAGE-SDS

**Conclusion générale**

**Références bibliographiques**

**Annexes**

## Introduction

L'encapsulation trouve ses applications dans de nombreux domaines techniques et en particulier le domaine alimentaire où elle permet une stabilisation des matières encapsulées. Dans l'industrie alimentaire, l'encapsulation est un moyen idéal en vue de masquer les goûts de certaines substances telles que les vitamines. Elle peut permettre aussi d'éviter les interactions entre les différents composants d'un complexe alimentaire et de protéger les principes actifs vis-à-vis de l'oxydation (protection des arômes) ou encore de l'humidité (protection du sel et du sucre). L'utilisation de microcapsules est même envisagée afin de réduire le volume gras et créer de nouveaux produits allégés (AUGUSTIN *et al*, 2001). L'encapsulation permet de transformer un liquide en solide, de masquer une odeur ou un goût désagréable, de protéger des substances sensibles des effets délétères de l'environnement extérieur, ainsi que d'obtenir une libération contrôlée et ciblée des principes actifs (CIOBANU, 2004).

La microencapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant/support contenant une matière active. Les microparticules présentent une taille comprise entre 1  $\mu\text{m}$  et 1 mm et contiennent typiquement entre 5 et 90% (en masse) de matière active (RICHARD *et BENOIT* 2013). De nombreuses méthodes d'encapsulation ont été développées afin de s'adapter à divers types de substances actives et matériaux enrobant. Ces différentes méthodes permettent d'obtenir des particules aux caractéristiques variées (taille, épaisseur de la paroi, perméabilité) permettant de moduler la libération de substance active. Deux types de morphologies de microparticules peuvent être obtenus : la microsphère et la microcapsule.

Les techniques d'encapsulation sont des procédés qui existent depuis des décennies. En effet, la microencapsulation a été utilisée pour la première fois en 1954 dans l'industrie du papier sans carbone qui atteignait des productions de plus de 500 000 tonnes par année (DZIEZAK, 1988). L'utilisation de cette méthode dans divers domaines tels que la pharmacie et le domaine agro-alimentaire. Dans le domaine alimentaire, les méthodes d'encapsulation sont diverses. Elles peuvent être divisées en méthodes physiques incluant le séchage par atomisation (spray-drying), le séchage par suspension (air suspension), l'extrusion, l'encapsulation par jet refroidissant (spray-chilling ou spray-cooling), l'encapsulation par inclusion, et les méthodes chimiques qui incluent la formation de complexes par séparation de phases associative (VIERSIC, 1988; DZIEZAK, 1988; TODD, 1970).

Donc ces techniques d'encapsulations vont nous permettre de présenter nos arômes sous des formes diverses et notamment des pâtes, des poudres, des granulés, des sphères, des capsules sans soudure, des microcapsules au niveau moléculaire. Toutes ces formes ont une spécificité et il n'y a pas une forme de présentation de l'arôme qui pourrait être une solution technique ou une technologie universelle. L'industrie agroalimentaire met sur le marché des aliments de plus en plus élaborés et complexe susceptible de séduire le consommateur par l'adjonction de nouveaux aromes (arome de thé ou de menthe dans les yaourts). (KANG, 2014).

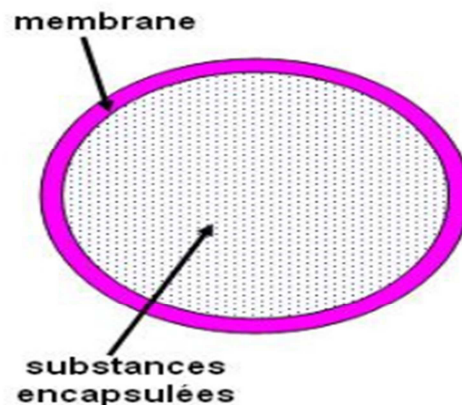
La microencapsulation est notamment utilisée dans le domaine alimentaire pour enrichir des aliments en arômes, vitamines, minéraux, probiotiques, acides gras et antioxydants. Par

exemple, les bactéries probiotiques sont encapsulées afin d'améliorer leur viabilité au cours des procédés de fabrication des produits alimentaires et aussi pour permettre une libération ciblée au niveau du tractus gastro intestinal. Les caroténoïdes (lutéine et lycopène) sont quant à eux encapsulés afin d'améliorer leur stabilité vis-à-vis de la lumière, de l'humidité et de la température (ROCHA *et al*, 2012), tandis que les huiles riches en acides gras poly insaturés (oméga3), telles que l'huile de microalgue et l'huile de thon sont encapsulées afin d'augmenter la stabilité des acides gras vis-à-vis de l'oxydation (WANG *et al*, 2014).

### 1.1. Généralité sur la microencapsulation

#### 1.1.1. 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 prolongé (figure 01). Elle est utilisée pour masquer le goût désagréable de certains ingrédients ou tout simplement transformer des substances liquides en solides (CHAPAGNE, 2013).



**Figure 01** : Morphologie d'une microcapsule (BELOUADEH, 2012).

#### 1.1.2. Classification des méthodes de la microencapsulation

La diversité des méthodes rend complexe le choix de la technique la plus en adéquation avec les objectifs spécifiques recherchés. La classification des méthodes d'encapsulation est difficile et peut prêter souvent à confusion. L'une des difficultés réside dans le fait que plusieurs termes peuvent désigner la même méthode. C'est le cas par exemple des termes spray-cooling, spray-freezing et spray-congealing qui désignent la pulvérisation d'un liquide dans une chambre froide en vue de l'obtention de fines particules sèches ou encore le terme extrusion retrouvé dans la littérature sous l'appellation de prilling. C'est également le cas pour la gélification ionotropique et la coacervation, respectivement appelées méthode électrostatique et méthode de séparation de phases (BELOUADEH, 2012).

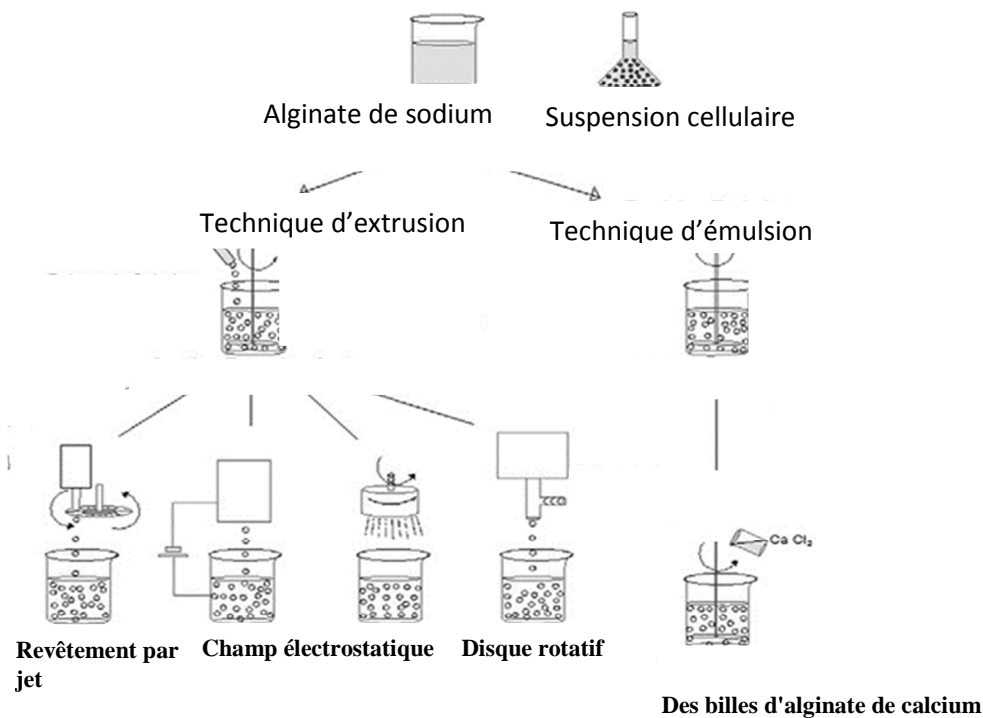
## Partie bibliographique

L'autre difficulté de cette classification est liée à l'interdépendance des procédés utilisés durant les étapes de l'encapsulation. L'émulsification (procédé permettant de former des capsules huileuses ou aqueuses) est une technique d'encapsulation à part entière. Les capsules obtenues peuvent être réticulées dans un bain de solution gélifiante ou subir une évaporation du solvant. La réticulation par gélification et l'évaporation de solvant sont aussi considérées comme des méthodes d'encapsulation à part entière. Dans un souci de simplification, PONCELET et ses collaborateurs (2008) ont proposé une description basée sur les différentes étapes de l'encapsulation et non sur les méthodes :

Étape1 : Incorporation de l'ingrédient bioactif dans la matrice ;

Étape2 : Encapsulation proprement dite par des procédés mécaniques ;

Étape3 : Stabilisation du système par des procédés chimiques ou physicochimiques.



**Figure 04** : Différents techniques de la microencapsulation (MARIA, 2014).

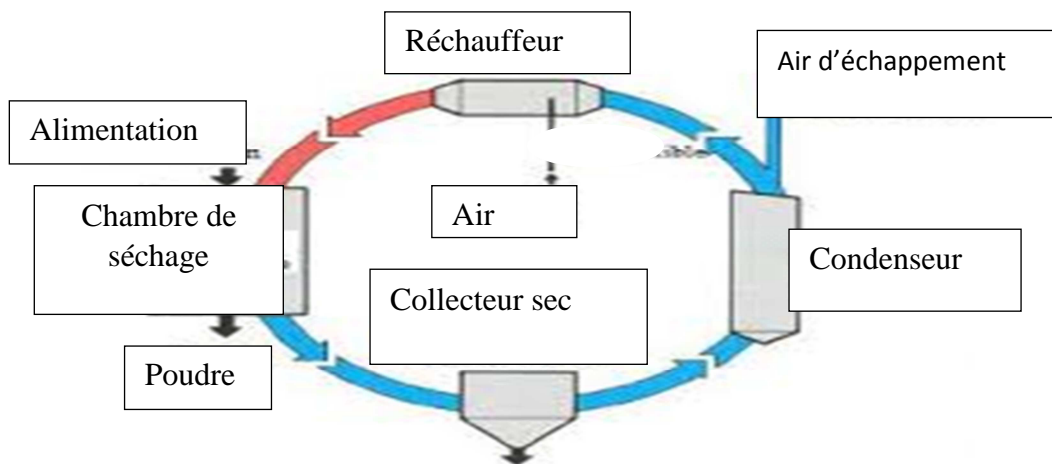
Plusieurs techniques pour la microencapsulation ont été développées au cours des années et utilisées avec succès dans l'industrie alimentaire. En voici quelques exemples.

### 1.1.3.1. Microencapsulation par séchage par atomisation (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 (figure 02), 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).

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 lorsqu'ils s'agissent d'encapsuler des probiotiques. 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 probiotiques lorsque les cellules ont été encapsulées par spray-drying (O'RIORDAN *et al*, 2002).



**Figure 02 :** Protocole de l'encapsulation par atomisation (BARBOSA *et al.*, 2005).

### 1.1.3.2. Microencapsulation par gélification ionotropique

La microencapsulation par gélification ionotropique est le procédé le plus ancien et le plus commun pour la production de capsules hydro colloïdales. En général, il s'agit d'une méthode simple, peu coûteuse et douce, ce qui assure la viabilité relativement élevée de cellules probiotiques (THERON, 2009).

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 micro gels sphériques et insolubles (THERON., 2009).

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 (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 (FUSTIER, 2007).

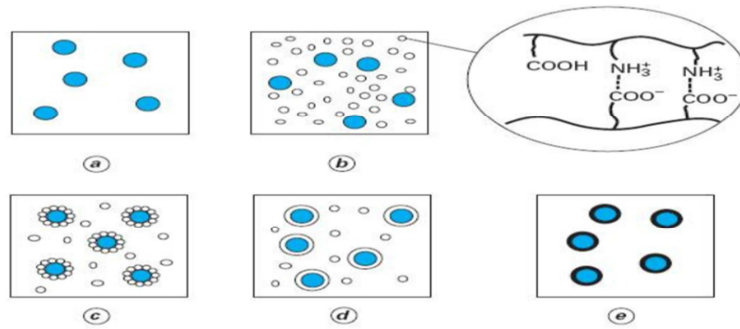
### 1.1.3.3. Microencapsulation par coacervation

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 (KOUADIO *et al.*, 2008). 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 (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 : 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 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 (DELPHINE ,2014). La figure 03 qui suit présente le principe de la microencapsulation par coacervation :



**Figure 03 :** Schéma du principe du procédé de microencapsulation par coacervation complexe. RICHARD et BENOIT (2008).

- (a) produit à encapsuler dispersé dans solution contenant des polymères ;
- (b) ajuster le pH de la solution afin d'équilibrer les charges des polymères ;
- (c) attraction électrostatique suivie de la formation des gouttelettes de coacervat qui vont s'adsorber à la surface de la matière à encapsuler et former un enrobage ;
- (d) l'enrobage est consolidé par réticulation ;
- (e) macromolécules constitutives du coacervat (LECLERC, 2009).

### 1.1.3.4. Microencapsulation par 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 (DIATTA *et al.*, 2014). 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. Les polyélectrolytes sont des macromolécules transportant un nombre relativement élevé de groupement fonctionnel 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 (hydroxy propyl méthyl cellulose), 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 (Devi, 2009).

### 1.1.3.5. Microencapsulation par 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. (DALGLEISH, 1997).

Les émulsions doubles sont des émulsions constituées de trois phases, dans ce cas-là, 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 (EIH/E) et huile-dans-eau-dans-huile (HIEIH). Les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables à cause des risques de floculation, séparation gravitationnelle, et de coalescence (GUERY *et al.*, 2006). 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).

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 (GARTI, 1997).

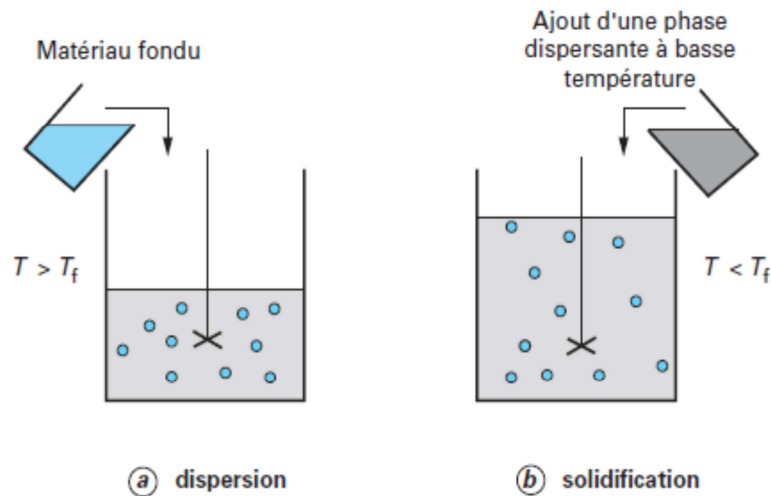
Cette technique est simple et facilement réalisable à grande échelle. Plusieurs études ont démontré une bonne viabilité des organismes probiotiques lors du processus de microencapsulation, ainsi que pendant le traitement et le stockage des aliments fonctionnels, car il s'agit d'un processus doux qui n'est pas physiquement stressant pour les cellules (ARGYRI *et al.*, 2012). Il y a cependant plusieurs inconvénients quant à l'utilisation de la technique d'émulsion parmi les quels 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 variés. (ARGYRI *et al.*, 2012).

### 1.1.3.6. Microencapsulation par refroidissement 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°C. Le relargage 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).

**Figure 04** : Schéma de principe du procédé d'encapsulation par (BELOUADEH.Ch, 2012) par refroidissement spray chilling/spray cooling.

### 1.1.4. Biopolymères les plus utilisés dans le domaine alimentaire

Selon BARTHESE-BIESEL et LECLERC (2009), Des matériaux différents peuvent être utilisés pour enrober de différents produits, tels que le nylon, la poly lysine, la gélatine, les bicouches lipidiques, etc. Ils sont d'origines différentes :

- Les polymères d'origine naturelle, animale ou végétale, tels que la gélatine, le chitosan, l'alginate de sodium, l'agarose, l'amidon et les amidons modifiés ;
- Les polymères semi-synthétiques dérivés de la cellulose, tels que l'éthylcellulose ;
- Les polymères synthétiques, tels que les copolymères d'esters acryliques et méthacryliques fonctionnalisés ;
- Les lipides solides à température ambiante, tels que les acides gras les alcools gras, les glycérides à longues chaînes les dérivés cholestériques les cires d'origines diverses, comme la cire de Carnauba, la cire d'abeille.

Noter que les protéines de lactosérum et la pectine sont des composés naturels retrouvés dans le lait et les agrumes, respectivement. Ces composés alimentaires sont largement disponibles à l'état purifié sur le marché, ce qui fait d'eux une source très intéressante de matériaux nécessaires à la formation de complexes pour l'encapsulation d'ingrédients hydrosolubles et exempts de restriction gouvernementale. Ce sont des biopolymères chargés qui permettent de former des complexes sur une large gamme de pH. Ceci est très intéressant pour l'encapsulation d'ingrédients hydrosolubles polaires ou chargés qui peuvent être attirés par l'un ou l'autre des polymères pendant la formation de complexes (GERARD *et al.*, 2008).

### 1.1.5. Intérêts de la microencapsulation

L'objectif de l'encapsulation étant la confection d'une barrière entre la substance active et son milieu environnant, celle-ci doit permettre une protection contre l'oxygène, l'eau, la lumière ou la chaleur et de réduire les interactions entre le composé à protéger et les ingrédients de la matrice alimentaire. L'encapsulation transforme des produits liquides en poudre afin de résoudre les problèmes liés au stockage, à la conservation, et à la commodité d'emploi. Elle assure aussi une libération contrôlée des principes actifs.

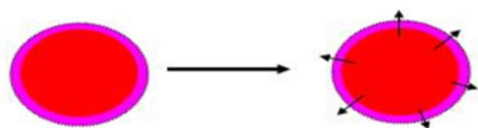
Selon BIESEL et LECLERC (2009), BENOIT *et al* (2013) la microencapsulation est mise en œuvre pour : « Assurer la protection, la compatibilité et la stabilisation d'une matière active dans une formulation, améliorer la présentation d'un produit, masquer un goût ou une odeur, modifier et maîtriser le profil de libération d'une matière active pour obtenir, par exemple, un effet prolongé ou déclenché ». Parmi les majeurs avantages de la microencapsulation on trouve que :

La microencapsulation permet non seulement d'éviter la pollution secondaire du contenu encapsulé, mais permet aussi une fonction d'isolation de matériaux fonctionnels sensibles à la lumière ou à l'oxygène d'un environnement extérieur, ce qui maintient le contenu encapsulé stable sur une durée de vie plus longue ;

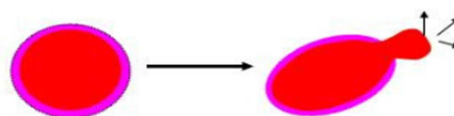
La microencapsulation permet le transfert de masse entre l'intérieur et l'extérieur d'une capsule via le contrôle des propriétés physiques et chimiques de la membrane. Il y a deux types de processus différent :

Soit la diffusion à travers la membrane qui permet de contrôler la délivrance continue des principes encapsulés (figure 05 a) par exemple : un arôme encapsulé qui fonctionne beaucoup plus longtemps qu'un arôme libre ;

Soit par éclatement de la membrane (figure 05b) un exemple est le dentifrice encapsulé qui s'éclate sous condition de frottement mécanique de la brosse à dents.



(a) Diffusion à travers la membrane.



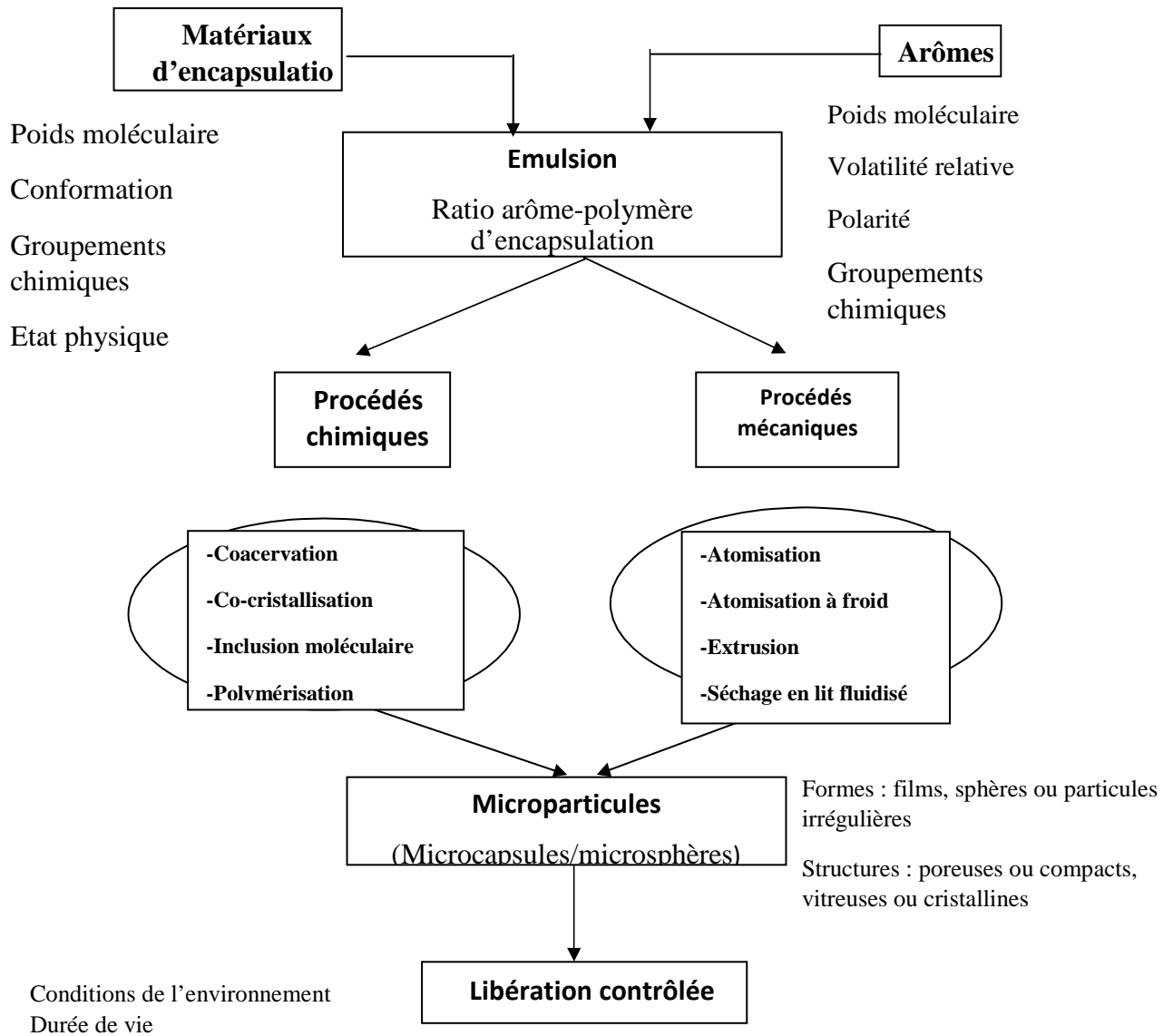
(b) Eclatement de la membrane.

**Figure 05** : Deux principes de la délivrance des substances encapsulées

BIESEL et LECLERC (2009).

## 1.1.6. Microencapsulation des arômes

Les composés d'arômes de par leurs propriétés physicochimiques sont aussi des molécules instables et sensibles dont l'utilisation directe est difficile en aromatisation. Une étape de formulation est souvent nécessaire : l'encapsulation, qui utilise les propriétés filmogènes, absorbantes et ou émulsifiantes de macromolécules pour piéger ou enrober des composés sensibles dans une microcapsule, est une technologie de plus en plus utilisée et qui répond à plusieurs attentes (MADENE, 2006). L'illustration schématique de différents procédés d'encapsulation des composés aromatiques représentés sur la figure 06.



**Figure 06 :** Illustration schématique des différents procédés d'encapsulation des composés aromatiques. (MADENE, 2006)

### 1.1.6.1. Libération contrôlée des arômes

La libération contrôlée peut être définie comme une méthode par laquelle un ou plusieurs principes actifs ou ingrédients se rendent disponibles sur un site à un moment désiré avec une teneur spécifique (MADENE, 2006). Le mécanisme de libération contrôlée du principe actif peut être basé sur la fonte, la diffusion, ou la dégradation (tableau I).

**Tableau I:** Mécanismes de la libération contrôlée des arômes (RICHARD *et* BENOIT, 2000).

Technique d'encapsulation	Mécanisme de la libération contrôlée
- Coacervation simple	- Libération prolongée
- Coacervation complexe	- Libération prolongée (diffusion) et libération déclenchée (pH, déshydratation, action mécanique ou enzymatique, dissolution)
- Atomisation	- Libération prolongée et libération déclenchée
- Séchage en lit fluidisé	- Libération déclenchée (pH ou traitement thermique)
- Extrusion	- Libération prolongée

Dans les mécanismes de libération des molécules encapsulées on distingue :

- Les systèmes à libération déclenchée qui sont constitués d'une membrane imperméable qui peut subir une rupture sous l'effet d'une pression (osmotique ou mécanique) ou par fusion sous l'effet d'une modification de pH ou de température ;
- Les systèmes à libération prolongée qui se distinguent les uns des autres par les mécanismes de libération mis en jeu (diffusion passive, dégradation/dissolution du matériau enrobant) et par leur structure (microcapsules ou microsphère) qui va directement influencer la cinétique de libération résultante. Les microparticules à libération prolongée sont très largement utilisées dans les domaines alimentaires et pharmaceutiques.

### 1.1.7 - Composés encapsulés dans le domaine alimentaire

Les aliments dans leur récolte, leur traitement et leur fabrication sont souvent convertis d'une forme à une autre. Généralement, la conversion implique la réduction de la taille des particules ou le séchage des mélanges liquides en poudre.

On cite quelques exemples (tableau II) de composés encapsulés dans le domaine alimentaire (GERARD *et al.*, 2008). Selon le procédé d'encapsulation utilisé, les matrices d'enrobage

## Partie bibliographique

présentent diverses formes (films, sphères, particules irrégulières) et diverses structures (poreuses ou compactes, caoutchouteuses ou vitreuses, amorphes ou cristallines). Les propriétés physiques des capsules peuvent influencer la diffusion des arômes ou des substances externes (l'oxygène, solvant) et la stabilité du produit alimentaire durant le stockage.

**Tableau II :** Quelques exemples de composés encapsulés dans le domaine alimentaire (GERARD *et al.*, 2008).

Composés encapsulés	Intérêts de l'encapsulation
Acides gras Oméga3 Ethyl ester, huile de thon, Huile de poisson, huile de microalgue)	-Masquer le goût ; -Améliorer la dispersion en milieu aqueux ; -Retarder et minimiser les dégradations oxydatives ; -Permettre une libération contrôlée.
Antioxydants (Huile d'ail, polyphénols)	-Permettre une libération prolongée ; -Diminuer l'évaporation ; -Réduire l'oxydation ; -Masquer l'odeur.
Arômes	-Transformer un liquide en solide ; -Protéger de l'oxydation et de l'évaporation ; -Permettre une libération contrôlée ; -Résister à la congélation.
Probiotiques	-Améliorer la viabilité au cours des procédés de fabrication des produits alimentaires ; -Améliorer la survie dans le tractus gastro-intestinal.

### 1.1.8. Domaine d'application des techniques d'encapsulation

Les principales applications de différentes techniques d'encapsulation sont rapportées dans le tableau III (MADENE 2006).

**Tableau III :** Domaine d'application des différentes méthodes d'encapsulation dans l'industrie alimentaire (MADENE 2006).

<b>Techniques d'encapsulation</b>	<b>Type de capsule</b>	<b>Domaine d'application</b>
Coacervation	Pâte/poudre/capsule	Chewing-gum, biscuiterie.
Atomisation	Poudre	Confiseries, Poudre de lait, Instantanées
Atomisation à froid	Poudre	Plats préparés, glaces.
Extrusion	Poudre/granule	Boissons Instantanées, thé, confiserie.

### 1.2. Microencapsulation des molécules antioxydantes

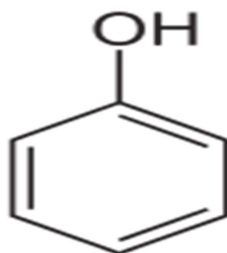
Ces dernières années, l'ajout d'antioxydants dans l'alimentation a suscité un formidable engouement et le marché des produits alimentaires enrichis en antioxydants a connu une croissance exponentielle. En effet leur action préventive a été corrélée à une diminution du risque de maladies chroniques comme le cancer, les maladies cardiovasculaires et d'autres maladies liées au vieillissement. Cependant, de nombreux progrès restent à réaliser dans la conception des modes de supplémentations afin de potentialiser pleinement les effets bénéfiques des antioxydants. Les microcapsules contenant ses antioxydants devront résister aux conditions digestives de l'intestin et faciliter la mise en œuvre d'enrichissement de produits alimentaires et de mises en formulation (ROSSI, 2011).

#### 1.2.1. Les polyphénols des antioxydants modèles

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents dans toutes les plantes vasculaires, et constituent à partir de molécules simples à des structures complexes. Ces substances naturelles ont en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyle et dérivant du métabolisme de poly acétate.

Un bon nombre de ces molécules possèdent un goût très astringent et amer, ce qui limite leur utilisation dans les aliments ou dans les médicaments oraux. Pour contourner ces inconvénients, les systèmes de livraison ont été développés, et parmi eux, l'encapsulation semblent être une approche prometteuse (VINCENZO, 2009)

La structure chimique est identique à tous les polyphénols : un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés (figure 07). Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des éléments qui les relient.



**Figure 07** : Structure chimique de phénol.

### 1.2.2. Microencapsulation des composés phénoliques

Les polyphénols sont parmi les composés actifs les plus puissants synthétisés par les plantes, et montrent une combinaison unique d'activités chimiques, biologiques et physiologiques. Cependant, leur stabilité et / ou une solubilité limitée, souvent combinée à une faible biodisponibilité, doivent être résolus afin de rendre ces composés plus en mesure de répondre à la demande croissante dans la nutrition et la santé (KOLODZIEJCZYK, 2011).

Des résultats d'études récentes mettant en œuvre diverses techniques d'encapsulation appliquées aux extraits et / ou des composés polyphénoliques de plantes ont confirmé que l'encapsulation est un moyen pour éviter le goût et l'odeur indésirable des composés phénoliques ; ainsi, étant la meilleure méthode qui sert pour but d'étendre leur durée de vie (PANG *et al.*, 2014).

Plus récemment, SANCHEZ *et al* ont travaillé sur un extrait de soja riche en polyphénols est immobilisé au sein d'une matrice composée d'amidon ou d'une silice dans le but de réduire la dégradation des polyphénols encapsulé et protégé son activité antioxydante.

Les Carraghénanes représentent des matériaux intéressant comme moyen de conservation de l'activité antioxydante pour l'encapsulation de divers extraits naturels riches en polyphénols (SANCHEZ *et al.*, 2011).

CHANDRASEKHAR (2010) se sont aussi focalisé sur l'optimisation de l'extraction des antioxydants phénoliques avec des micro-ondes à partir d'une pomme ainsi que l'encapsulation de l'extrait dans les cyclo dextrines.



### 1.3. Les probiotiques dans l'alimentation

#### 1.3.1. Généralités

##### 1.3.1.1. 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 bénéfique sur la santé de l'hôte » (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2001).

##### 1.3.1.2. Classification des probiotiques

Ils peuvent être présents ou introduits dans certains aliments (compléments alimentaires) ou encore dans certains médicaments (ex : Lactéol contenant des *Lactobacillus* LB). Les probiotiques les plus connus sont les bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Lactococcus*) et les Bifidobactéries, largement utilisés dans les yaourts et autres produits laitiers fermentés (Bile, 2012).

Probiotique s'oppose ainsi à antibiotique. Dans l'alimentation on parle donc de probiotiques en désignant les microorganismes (bactéries, levures) qui sont utilisés depuis une dizaine d'année dans les produits alimentaires lacto-fermentés (figure 08).

Les bactéries sont sélectionnées et incorporées aux produits alimentaires, toujours pour leur capacité à modifier les caractères organoleptiques du produit, mais également pour induire des effets bénéfiques sur la santé humaine. Les micro-organismes tués par la chaleur ne répondent pas à la définition des probiotiques, même si certains effets thérapeutiques leur ont été attribués. (Farineau, 2001).

On utilise également le terme de probiotiques en désignant des produits enrichis en organismes et dont les effets sont supposés bons pour le corps. On peut dans ce cas parler plus généralement d'alicaments (pour aliment + médicament), nutricaments ou nutraceutiques. D'après le Dr Philippe Lagarde, la définition des alicaments est la suivante : « Les alicaments sont un nouveau type d'aliments industriels qui aurait pour but de non seulement nourrir le corps, mais aussi de le soigner » (Gaudreau, 2015).



Les Lactobacilles

Les Bifidobactéries

Les Levures

**Figure 08 :** Bactéries les plus utilisées en complément aux produits alimentaires (FRANÇOIS, 2011).

### 1.3.1.3. Utilisation des probiotiques

Les probiotiques sont utilisés dans l'alimentation pour améliorer la qualité nutritionnelle de certains produits, notamment dans les laits fermentés ou yogourts. L'objectif de leur utilisation est soit pour l'inhibition de la flore pathogène présente dans le système digestif et enrichir la flore intestinale si importante pour le processus de la digestion. Ces organismes sont également utilisés pour des procédés tels que la conservation des aliments, la production d'alcool et l'amélioration du goût de certains aliments (LAFFARGUE, 2014).

### 1.3.1.4. Les effets des probiotiques dans l'alimentation

Les probiotiques jouent un rôle important sur la qualité et la composition de la flore intestinale. Celle-ci doit notamment jouer un rôle mécanique sur le transit intestinal et la fonction digestive, participer à l'élaboration de substances ou enzymes indispensables à l'organisme, participer à l'absorption de minéraux, vitamines, enzymes, médicaments, etc. Elle doit encore participer au métabolisme et à l'équilibre du cholestérol, lutter contre certains bacilles ou champignons, participer au bon équilibre des défenses immunitaires. La liste des bienfaits pourrait être rallongée pour un bon nombre de substances (GUARNER *et al* 2011). Prenons par exemple :

**Le Kéfir :** une boisson issue de la fermentation du lait par des graines composées de bactéries et levures actives ancrées dans une matrice de polysaccharides et de protéines de lait et dont les applications présumées, avec une posologie plus ou moins importante sont : troubles de la vessie, bronchite et asthme, anémie, pression sanguine élevée, vésicule, jaunisse et constipation, problèmes de nerfs, reins, infections, ulcères internes, éruptions et eczéma.

La dose ingérée des probiotiques est un facteur important pour obtenir des concentrations élevées dans différentes parties du tube digestif. A titre exemple SAXELIN *et al* (2000) ont montré que la quantité de  $10^{10}$  UFC devait être consommée pour déterminer *L.rhamnosus G* dans les fèces.

### 1.3.1.5. Microencapsulation des 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, 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), les crèmes glacées et le fromage (FORTIN *et al.*, 2011). 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 (GODWARD, 2003).

### 1.3.1.6. Importance de l'encapsulation des probiotiques

Les probiotiques sont censés exercer un effet bénéfique sur la santé. Pour y parvenir, ils doivent se retrouver vivants au niveau intestinal après avoir été consommé. Cela suppose qu'ils doivent passer la barrière de l'estomac. Malheureusement, ce passage n'est pas sans obstacle du fait de l'acidité qui règne dans cette zone. Dans la littérature, plusieurs études ont été consacrées à la viabilité des probiotiques en milieu acide. L'estomac étant la première barrière à franchir avant d'atteindre l'intestin grêle, une évaluation de la survie des probiotiques en conditions gastriques demeure primordiale (LACROIX, 2004).

Ce qu'il faut surtout retenir, c'est la nécessité de protéger ces probiotiques de l'acidité gastrique, et l'encapsulation est une alternative prometteuse. Elle est surtout basée sur l'encapsulation de bactéries probiotiques dans des matrices de biopolymères - de protéines et de polysaccharides - que ce soit sous forme de gels ou de particules, par exemple (GUERIN *et al.*, 2003).

La rétention physique des bactéries dans une matrice d'encapsulation limite leur exposition directe aux facteurs néfastes de l'environnement comme la lumière, l'humidité, l'oxygène et les bas pH. La microencapsulation permettrait une réduction de l'exposition à l'oxygène des bactéries, ce qui limiterait la perte de viabilité des souches sensibles à

l'oxygène (TALWALKA,2004). Ainsi, la microencapsulation a permis de diminuer la perte de viabilité de six souches de bifidobactéries lors d'un entreposage en présence d'oxygène dans du yogourt. Mr Master et al. (2005) ont aussi montré une augmentation de la tolérance à l'oxygène de bifidobactéries lorsque qu'encapsulées dans des billes de gel. Cependant, l'efficacité de la microencapsulation pour la protection de bactéries probiotiques dépend du degré de sensibilité à l'oxygène des bactéries et du niveau d'oxygène dissous dans le produit (MANOJLOVIC *et al.*, 2010).

Les techniques de microencapsulation utilisées pour la protection des cellules bactériennes ont grandement contribué à l'amélioration de la survie de ces microorganismes dans les produits alimentaires ainsi que durant leur passage dans le tractus gastro-intestinal. Le choix du procédé et de la matrice d'enrobage pour la microencapsulation de bactéries probiotiques est cependant crucial et doit tenir compte de la sensibilité des bactéries à certains facteurs tels que l'oxygène et/ou l'acidité par exemple, de leur incorporation ou non dans des aliments ainsi que de leur libération ciblée ou non dans l'hôte (CHAVARRI *et al.*, 2012).

Différents procédés de microencapsulation ont été utilisés pour la protection de bactéries. Il s'agit de l'extrusion, du séchage par atomisation, du refroidissement par atomisation (spray chilling ou spray cooling), de l'enrobage sur lit fluidisé (spray-coating), l'émulsion et de l'émulsion avec gélification interne (GONZALEZ *et al.*, 2013).

### **1.3.1.7. Polymères employés dans la microencapsulation des probiotiques**

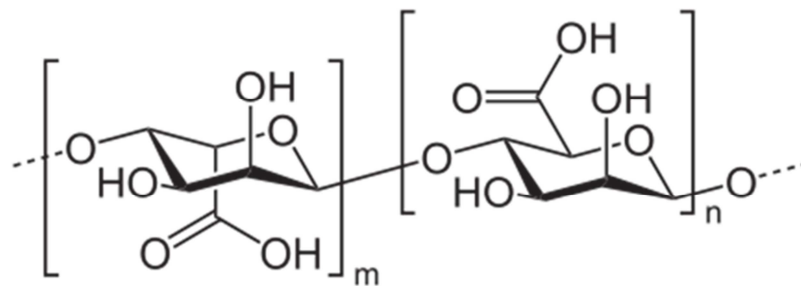
Les matériaux employés comme agents d'encapsulation comprennent les glucides tels que cellulose et ses dérivés, les lipides, les protéines et les gommes (BERTOLINI *et al.*,2007). La sélection du polymère est une étape préliminaire qui nécessite une approche méthodologique rigoureuse, en effet elle détermine 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,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 (RIAZ *et MASUD*, 2013), ci-dessous quelques exemples sont couramment utilisés.

### 1.3.1.7.1. Alginate

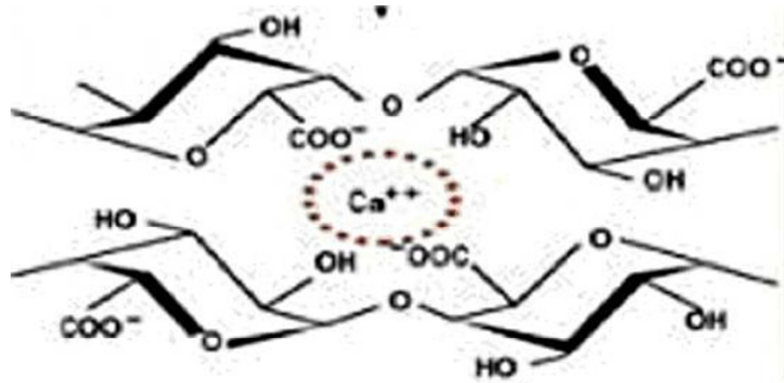
L'alginate est un polysaccharide naturel extrait des algues brunes et de certaines bactéries tels qu'*Azotobacter* et plusieurs espèces du genre *Pseudomonas* (FANG et al., 2007). C'est un polymère avec des séquences en alternance des résidus d'acide P-D mannuronique (M) et  $\alpha$ -L-guluronique (G) (Figure 09). 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 (SINGH, 2007).



**Figure 09 :** Structure chimique d'alginate (GEORGE, 2006).

Une caractéristique importante de l'alginate est qu'il forme des billes par gélification ionotrope avec des cations divalents tels que  $\text{Ca}^{2+}$  ou des cations multivalents (RANTAMAKI, 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 A œuf (Figure 10). Le gel formé est soluble à un pH neutre ou supérieur mais insoluble à un pH plus bas (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 (SINGH, 2007).



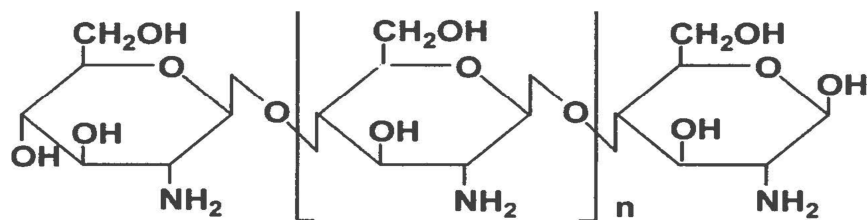
**Figure 10** : Formation de la boîte à œuf (ABRAHAM, 2006).

### 1.3.1.7.2. Chitosane

Le chitosane est un polysaccharide cationique obtenu à partir de la déacétylation partielle de la chitine, le principal constituant du squelette des crustacés. C'est un copolymère comprenant la N-acétyl-D-glucosamine et la D-glucosamine (Figure 11) (Yoksan *et al.*, 2010). Ce polysaccharide est un bon marché, possède d'excellentes propriétés adhésives des cellules (biocompatible), en plus d'être soluble dans l'eau dans des conditions acides ( $\text{pH} < 6$ ) (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).

L'interaction électrostatique des groupes carboxyliques de l'alginate avec les groupes amines du chitosane résultent en la formation de billes ou de films beaucoup plus résistants permettant une meilleure rétention des cellules encapsulées (ZHU, 2002).



**Figure 11** : Structure chimique du chitosane (ISLAM *et al.*, 2010).

### Conclusion

De nos jours, de nombreuses méthodes d'encapsulation se réalisent dans le but d'élaborer de nouveaux procédés pour la préparation de nouvelles particules à bases de nouveaux polymères et de nouvelles technologies.

Le véritable enjeu dans l'industrie alimentaire et dans l'élaboration de produits fonctionnels est d'obtenir une encapsulation efficace des ingrédients à forte valeur ajoutée, tels que les antioxydants arômes et les vitamines. Plusieurs recherches ont été effectuées dans le domaine de l'encapsulation de molécules et cellules actives incorporés dans des matrices alimentaires.

Les techniques biotechnologiques d'encapsulation trouvent une évolution vers l'utilisation de nouveaux supports et l'élaboration de nouvelles techniques plus douces donc plus adaptées aux contraintes dues à la nature des substances actives.

Le choix d'une méthode d'encapsulation appropriée dépend des propriétés des composés ou cellules concernées, du degré de stabilité et ou viabilité exigée pendant l'élaboration des produits et stockage, des propriétés des ingrédients alimentaires, des propriétés spécifiques requises pour une libération contrôlée, de la quantité du produit dans la matrice d'encapsulation et du coût de production. En effet, chaque procédé d'encapsulation, généralement développé pour remédier un problème particulier, présente des avantages et des inconvénients.

Une meilleure compréhension des technologies d'encapsulation permet de répondre aux exigences requises sur un produit, telles que les propriétés souhaitables, la commodité d'emploi, l'amélioration de la durée de conservation et le contrôle du mécanisme de libération des principes actifs. Le plus important dans la recherche et développement est de trouver un compromis entre les contraintes et les conditions industrielles, pour permettre une production à grande échelle du produit fini.

## Partie expérimentale

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies de l'université MOULOUD MAMMERI de TIZI OUZOU. Au cours de notre stage pratique, nous avons effectué une évaluation physicochimique afin de s'assurer de la qualité de quelques produits alimentaires commercialisés et cela par le dosage de différents paramètres physicochimiques.

### 1. Matériels et méthodes

#### 1.1. Matériel

##### 1.1.1. Appareillage et verrerie

Le tableau 05 regroupe l'ensemble Appareillages et verreries utilisées durant notre stage.

**Tableau V** : Appareillage et verrerie utilisés au cours de stage pratique.

Verrerie	Appareillage
-Tubes à essai ; -Béchers (50, 100, 250, 500 et 1000ml) ; -pipettes graduées (1 ml, 5ml et 10ml) ; -Fioles à jauger (10, 25, 50, 100, 250 et 500ml) ; -Éprouvettes (50 et 250 ml), burettes (100ml) ; -seringue d'Hamilton ; -Colonne de chromatographie (20X1Cm) ; plaque en verre d'électrophorèse (10 X 8 X 0,75 Cm, 12 X 8 X 0,75 Cm).	-Unité d'électrophorèse sur mini cuves ; -Verticales comprenant : cuves d'électrophorèse ; -Générateur de courant ; -Plaques en verre et en hydroxyde d'alumine (10 x 8 cm) ; -Des espaseurs, peigne ; -Unité de chromatographie liquide basse pression comprenant : une colonne chromatographique contenant le gel (dimension 1.6 x 30 cm) ; - Un détecteur UV, une pompe péristaltique ; - Un collecteur et un enregistreur graphique ; -Centrifugeuse réfrigérée, max 2000 x g (SIGMA) ; -Agitateurs variés (de tubes, à plateau, à barreaux magnétiques chauffant et non chauffant...) ; -Pompe pour le dégazage.

##### 1.1.2-Autres matériels

Bavettes, gants, spatules, coupelles, pissettes, cuves, barreaux magnétiques, barre à aimant, poires, portoirs, micropipettes (20-200 $\mu$ l), (100-1000 $\mu$ l), papier Ph, pince.

### 1.1.3- Matériel biologique (Echantillons utilisés)

Le tableau suivant regroupe l'ensemble des échantillons de jus, de laits des matières grasses utilisées dans le cadre de cette étude (tableau VI).

**Tableau VI : Echantillons utilisés**

Jus	Lait	Corps gras
- Jus lactée - Jus Orangé 01 - Jus à base de fruit - Jus enrichis en vitamine - Jus Orange 02	- Lait de vache - Lait UHT - Lait de sachet	- Huile d'olive - Huile de tournesol

### 1.1.4. Produits chimiques et réactifs

**- Dosage de la vitamine C :** 2,6 dichlorophénol indophénol (DCPIP), bicarbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), acide ascorbique, acide acétique glacial.

**- Détermination des indices d'iode et d'acidité :** empois d'amidon, éthanol, lugol, potasse (KOH), phénolphthaléine, thiosulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) ;

**- Dosage des glucides :** Acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS) ;

**- Dosage des protéines :**  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhydre 2% dans NaOH, 0,1 M,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,5%, tartrate de Na et K, 1%, BSA (Albumine Sérique Bovine), réactif de Folin – ciocalteu ;

**- Hydrolyse acide des sucres :**  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (72%, V/V), solution d'ammoniaque ;

**- Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200 :** gel de séphacryl S200, tampon tris-HCl 0,02M, pH 8,4, bleu de dextran ;

**- L'hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la papaïne :** Tampon tris- HCl, 0,5 M, pH 6,4, la papaïne.

## 1.2. Méthodes expérimentales

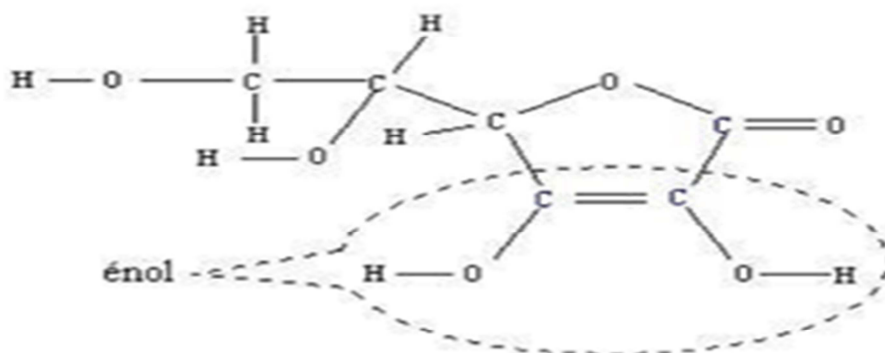
### 1.2.1. Méthodes physicochimiques

#### 1.2.1.1. Mesure du pH

Après immersion de l'électrode dans les différents échantillons du jus, la valeur du pH est lue directement sur le pH mètre.

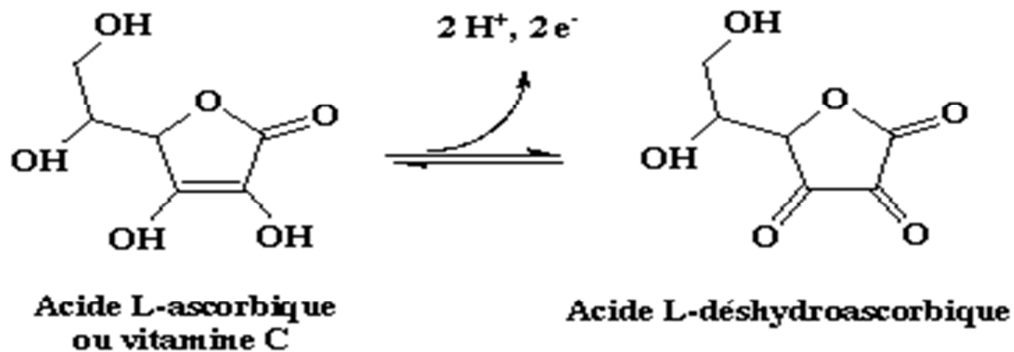
#### 1.2.1.2. Détermination de la teneur en vitamine C dans un jus d'orange

Les fruits contiennent de nombreuses molécules indispensables à l'organisme humain, notamment des sucres, des acides aminés et des vitamines. La vitamine C, appelée également acide ascorbique (figure 12) de formule  $C_6H_8O_6$ . Sa masse molaire moléculaire est  $M=176$  g/mol. Elle est hydrosoluble, naturelle, est particulièrement concentrée dans les agrumes et les kiwis (BORTH, 2009). La vitamine C est aussi un anti-oxygène utilisé comme additif alimentaire dans des boissons sous le code E 300.



**Figure 12 :** Structure chimique de la vitamine C

Le dosage de la vitamine C est effectué par titrimétrie. Il est basé sur la réduction par l'acide ascorbique d'un colorant : le 2-6-dichlorophenolindophenol (2-6-DPIP) qui est rouge en milieu acide et bleu en milieu neutre. Les conditions utilisées sont celles recommandées par AUDIGIE et al (1978) (Annexe 01). La solution du 2-6-DPIP est étalonnée par l'emploi d'une solution d'acide ascorbique de concentration connue. La réaction d'oxydation de cette Vitamine est décrite comme suit (figure13) :

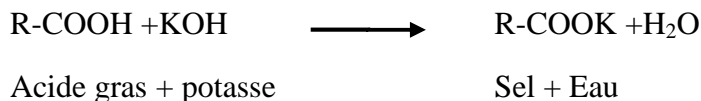


**Figure 13 :** Réaction de l'oxydation de la vitamine C (AUDIGIE et *al.*,1978)

### 1.2.1.3. Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse

#### 1.2.1.3.1. Détermination d'indice d'acidité d'une matière grasse

Une huile de table est essentiellement constituée d'un mélange de triesters. Cependant une quantité faible et variable d'acides gras libres peuvent être présente. On appelle indice d'acide d'une huile, la masse en mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire au dosage de tous les acides libres (AGL) présents dans 1 g de cette huile (KANDJI, 2001). Le protocole expérimental est mentionné en annexe 02. L'équation de la réaction est la suivante :



#### 1.2.1.3.2. Détermination d'indice d'iode d'une matière grasse

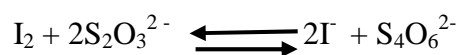
##### Principe du titrage

Les composés présentant une ou plusieurs doubles liaisons sont susceptibles d'entrer en jeu dans une réaction d'addition avec le diiode par exemple. L'indice d'iode nous renseigne sur le nombre de doubles liaisons des chaînes hydrocarbonées des substances qui composent un corps gras, acides gras libres, lipides dont les triglycérides et celles de l'insaponifiable. L'indice d'iode est le degré d'insaturation variant dans le même sens. Le protocole expérimental est résumé en annexe 03.

La fixation des molécules d'iode sur les insaturations des acides gras se représente par la réaction suivante :



L'iode ( $\text{I}_2$ ) est introduit en excès est alors titré par une solution de thiosulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 0.1N) selon la réaction suivante :

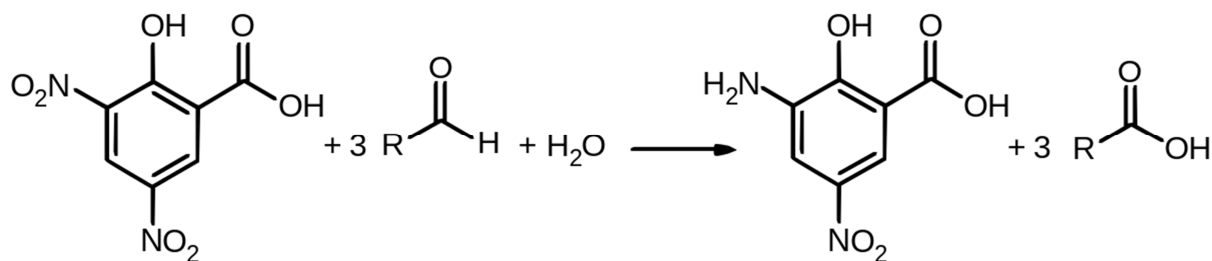


#### 1.2.1.4. Dosage des glucides (sucres réducteurs) par la méthode utilisant l'acide 3-5 dinitrosalicylique (DNS)

Les méthodes réductométriques sont fondées sur le pouvoir réducteur des oses et osides, pouvoir lié à la présence d'une fonction hémiacétalique libre. Ce pouvoir réducteur s'exprime en milieu basique et à chaud. L'oxydation des sucres réducteurs dans ces conditions est une réaction complexe et non stœchiométrique :

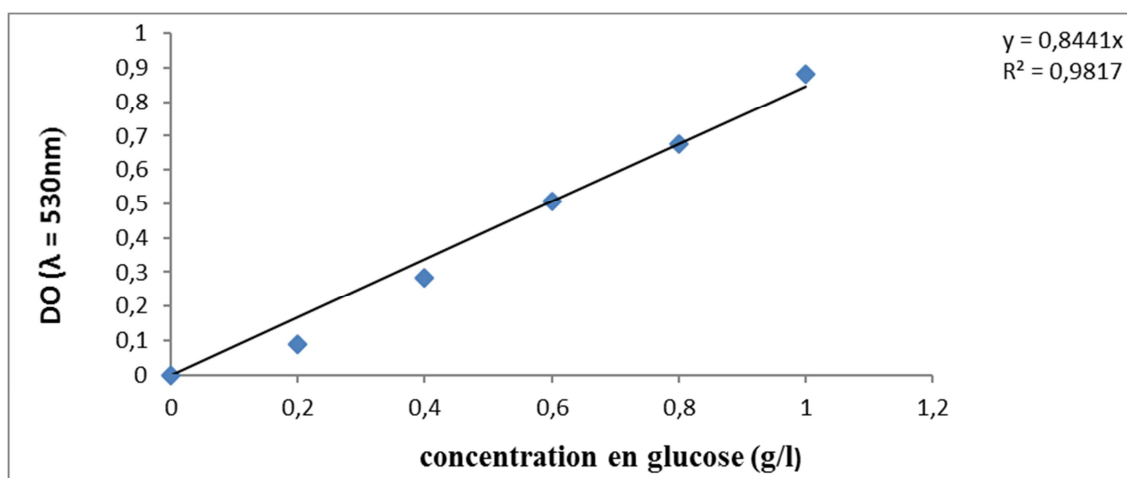
Sucres réducteurs  $\xrightarrow{\quad}$  Produits d'oxydation + n e<sup>-</sup>

L'acide 3,5 dinitrosalicylique réagit avec les oses réducteurs et autre molécules réductrices pour former l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique qui absorbe fortement la lumière à 540 nm. Dans cette réaction (figure 14), la couleur de la solution passe du jaune-orange au rouge. Durant notre étude On utilise les propriétés réductrices du glucose (annexe 04). Les densités optiques (DO) obtenues permettent de déterminer les concentrations des échantillons analysés en se référant à une courbe d'étalonnage DO (figure 15).



Acide 3,5dinitrosalicylique l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique

**Figure 14** : Réaction chimique du DNS sur les sucres réducteurs (AUDIGIE et al., 1978).

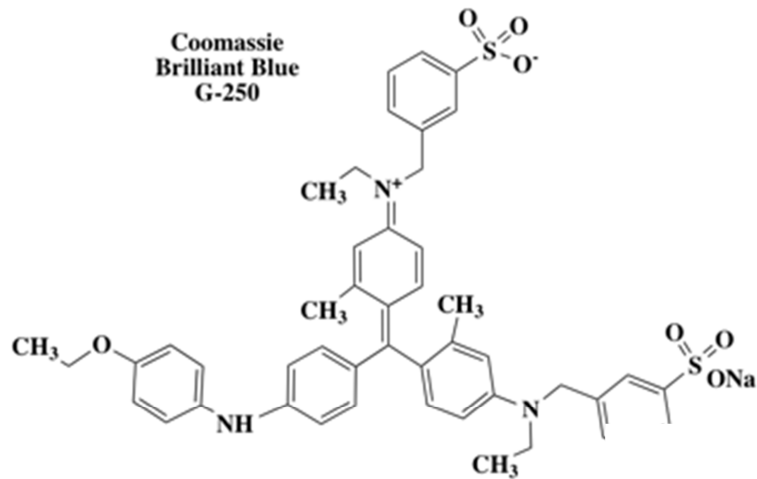


**Figure 15 :** Courbe étalon du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS, réalisée avec du glucose comme standard.

#### 1.2.1.5. Dosage des protéines : méthode de BRADFORD et al. (1976)

Le taux des protéines dans le lait et dans ses différentes fractions est dosé par l'emploi de la méthode colorimétrique de BRADFORD et al (1976), en utilisant l'albumine sérique bovine comme protéine de référence. Cette méthode est basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie (figure 16) G250 sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu. Elle se fait principalement par des liens ioniques avec des acides aminés basiques (arg, his, et lys) et des interactions hydrophobes (acides aminés hydrophobes).

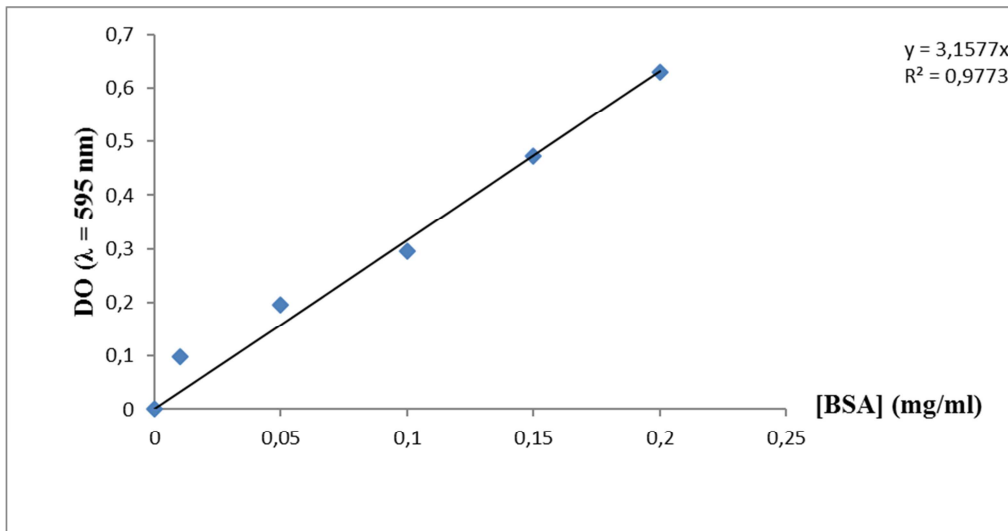
C'est une méthode très sensible (2-5  $\mu\text{g}$  de protéines) et très rapide. Elle est aussi assez résistante à la plupart des interférents qui nuisent à la plupart des autres méthodes. Seuls les détergents et autres surfactants, comme le Triton et le dodécylsulfate de Na (SDS), et des bases fortes interfèrent fortement avec cette méthode. Néanmoins c'est une méthode sensible, très simple et relativement fiable, peu coûteuse (annexe 05).



*E. Jaspard (2012)*

**Figure16** : Structure de bleu de coomasie (JASPARD et al.,2012).

Ainsi les DO obtenues à cette longueur d'onde permettent de déterminer les concentrations des échantillons analysés en se référant à une courbe d'étalonnage  $DO = f(C)$  (figure 17).



**Figure 17** : Courbe étalon de dosage des protéines par la méthode de BRADFORD et al (1976), réalisée avec le Sérum Albumine Bovine (BSA) comme protéine de référence.

## **1.2.2. Méthodes chromatographiques**

### **1.2.2.1. La dialyse des protéines sériques des caséines du lait de vache**

Cette étape permet de débarrasser les échantillons des molécules dont la taille est inférieure à 8000 Da (lactose, sels minéraux, composés azotés non protéiques). Les échantillons des protéines sériques et de caséines obtenues sont dialysés contre de l'eau distillée pendant 48 à 72 heures à +4°C et sous agitation douce, en utilisant des membranes de dialyse avec un seuil de coupure de 8000 Da. L'eau de contre dialyse est changée 2 fois par jour.

#### **1.2.2.2. Congélation et lyophilisation**

Après dialyse, les solutions de protéines obtenues sont étalées en fines couches dans des coupelles, congelées à -18°C pendant 72 heures, puis lyophilisées. Les protéines sont ainsi récupérées sous forme de poudre et conservées ainsi dans un dessiccateur (annexe 06).

#### **1.2.2.3. Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200**

La chromatographie de filtration sur gel permet de séparer des molécules selon leur taille et leur forme moléculaire, elle peut être grossièrement comparée à un tamis. Cette méthode utilise une phase stationnaire composée de billes poreuses de dimensions précises et uniformes dans lesquelles les molécules de dimensions appropriées peuvent s'insérer et être retenues un certain temps. Les molécules de grande taille passent quant à elles entre les sphères et sont rapidement éluées de la colonne par la phase mobile. Les conditions de la chromatographie sont modifiées et ajustées aux protéines étudiées. La séparation est effectuée sur une colonne de dimensions : 30 × 1,5 cm (figure 18).

Phase stationnaire utilisée c'est le Sephacryl S200 (poly allyle dextrane- CO-N- $\dot{N}$  - méthylène bisacrylamide) qui est composé d'acrylamide et d'un agent de pontage : le N- $\dot{N}$ -méthylène bisacrylamide. Ce gel présente un taux de réticulation élevé et une grande résistance aux contraintes mécaniques. Le seuil de coupure du Sephacryl S 200 est de 5 à 250 kDa(annexe06).

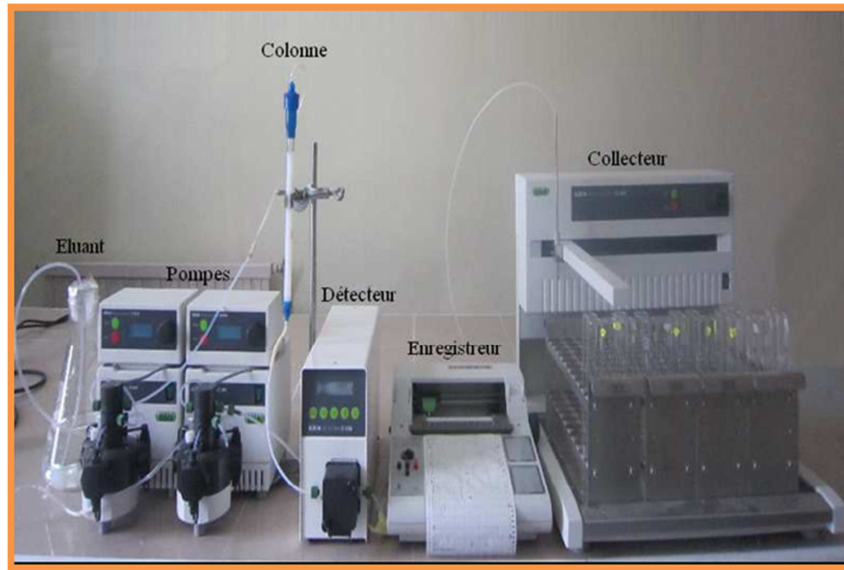


Figure 18 : Photographie d'une unité de chromatographie basse pression .

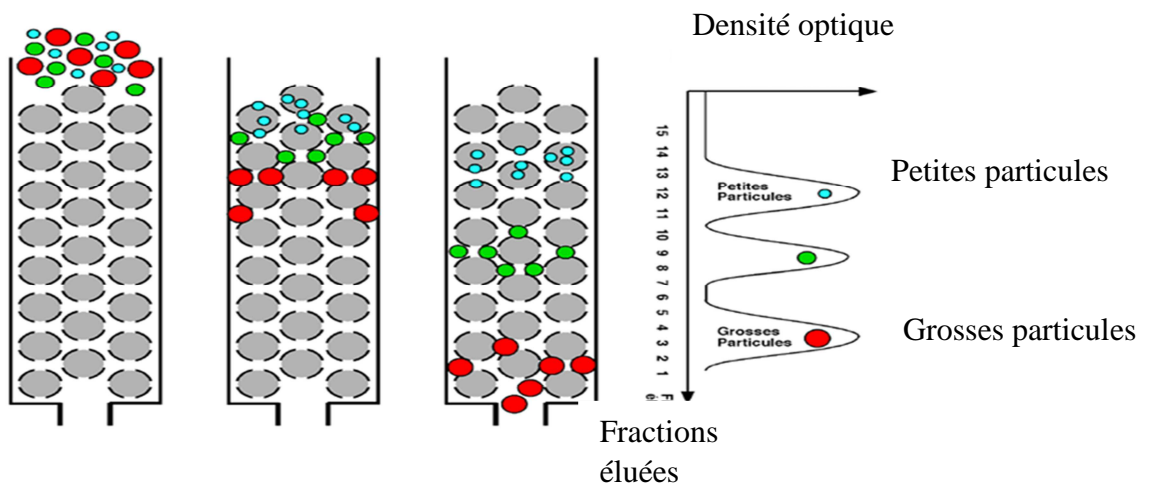


Figure 19 : Elution des protéines à travers le gel de Séphacryl S200

### 1.2.3 . Hydrolyse enzymatique des protéines lyophilisées du lait de vache : les caséines et les protéines sériques par la trypsine

La trypsine (MM 23,3 kDa) est une protéase à sérine, elle est la principale enzyme digestive intestinale responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires (figure 20). L'application de la trypsine dans l'industrie alimentaire est limitée à cause du goût très amer qu'elle entraîne (Rao et al., 1998). Annexe 07



Figure 20 : mécanisme d'action de la trypsine (JASPARD,2008).

### 1.2.3. Méthodes électrophorétiques

#### 1.2.3.1. Définition et principe général

L'électrophorèse est une méthode d'analyse basée sur la migration différentielle de particules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Les protéines du fait de leur caractère amphotère peuvent se comporter comme des anions ou des cations et se déplacer de ce fait soit vers l'anode ou la cathode. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, elles se matérialiseront sur l'électrophorégramme par des bandes de migration plus ou moins distinctes.

#### 1.2.3.2. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

##### 1.2.3.2.1. Conditions générales

La PAGE, est la technique la plus utilisée en raison des avantages qui sont offerts par les propriétés du gel qui sont la transparence, la reproductibilité élevée et une meilleure résolution liée à sa porosité.

La propriété de tamis des gels de polyacrylamide est liée à leur structure particulière, qui est celle d'un réseau tridimensionnel de fibres et de pores résultant du greffage d'unités de N, N-méthylène-bisacrylamide ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) bi fonctionnels sur des chaînes de polyacrylamide ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) adjacentes(Annexe 08).La polymérisation est catalysée par un générateur de radicaux libres composé de persulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  et de N, N, N, N- tetraméthylènediamine (TEMED).

##### 1.2.3.2.2- Méthode d'électrophorèse

Le gel est préparé en mélangeant les solutions d'acrylamide et de bis acrylamide avec une solution tampon, l'ensemble est dégazé puis additionné des agents initiateurs (persulfate d'ammonium et de TEMED).

Le mélange est immédiatement coulé entre 2 plaques (en verre et en alumine) séparées par des espaceurs et enfin un peigne y est introduit permettant la formation des puits après polymérisation du gel.

Les échantillons à analyser sont dissous à raison de 1 à 2 mg/ml dans un tampon approprié et additionnés du bleu de bromophenol qui est un indicateur coloré qui détermine le front de migration des protéines et permet de repérer la fin de l'électrophorèse. Les échantillons ainsi préparés sont déposés à raison de 10 à 20 µl dans chaque puits après avoir monté sur l'unité d'électrophorèse les 2 plaques renfermant le gel et remplis les cuves inférieures et supérieures de tampon d'électrode. L'unité est alors mise sous tension, courant et voltage constant : 20 mA, 250V

### **1.2.3.3. En conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE- native)**

La PAGE native est réalisée selon la méthode de HILLIER (1976), adaptée à un système de mini cuves HOEFFER au niveau du laboratoire LABAB, avec un gel de polyacrylamide de porosité (T= 12% ; C= 2,7%).

Le tampon de gel est constitué de Tris 0,75 M, pH 8,9. Le tampon d'électrode contient du Tris 5 mM, glycine 77 mM, pH 8,3. Les échantillons sont dissous dans le tampon d'échantillon composé du tampon de gel (1/10 v/v), de l'eau distillée (7/10 v/v) et du glycérol 10% (v/v) (annexe 09). Les échantillons sont déposés à raison de 10 à 15 µl dans chaque puits, à l'aide d'une seringue Hamilton après avoir monté l'unité électrophorétique et remplir les cuves supérieures et inférieures de tampon d'électrode. L'unité est mise sous tension/courant et voltages constants : 20mA, 250V (figure 21).

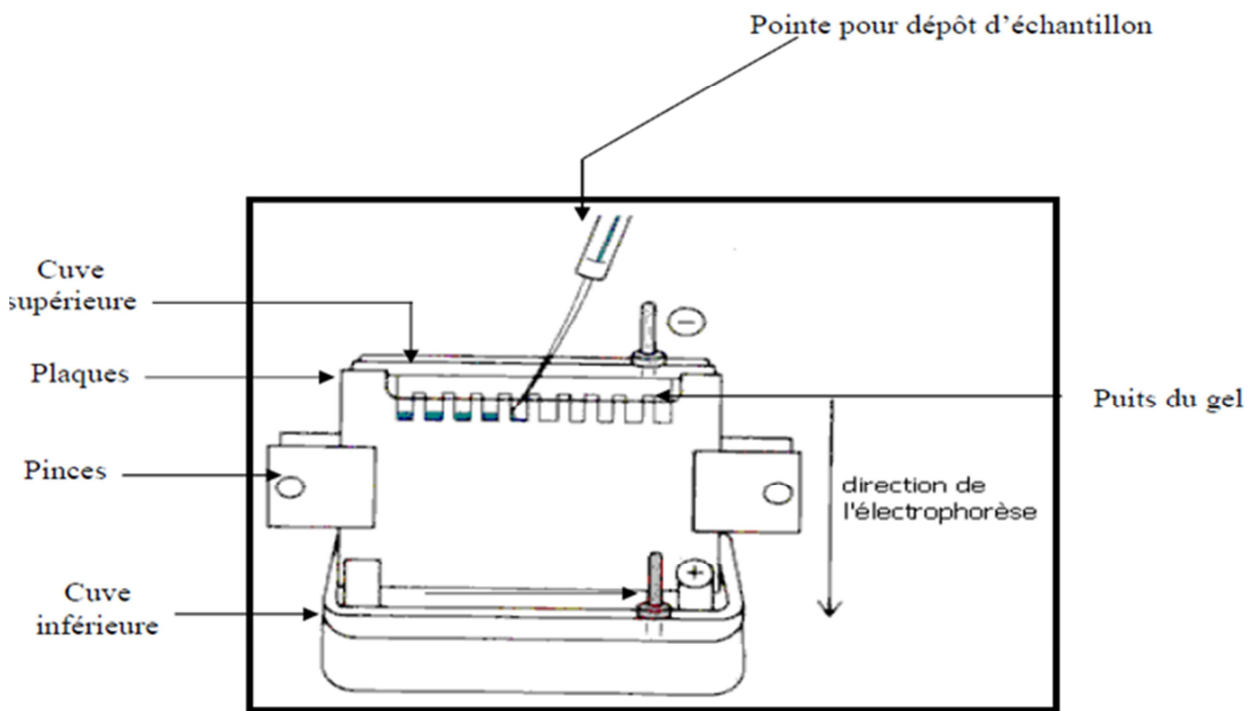
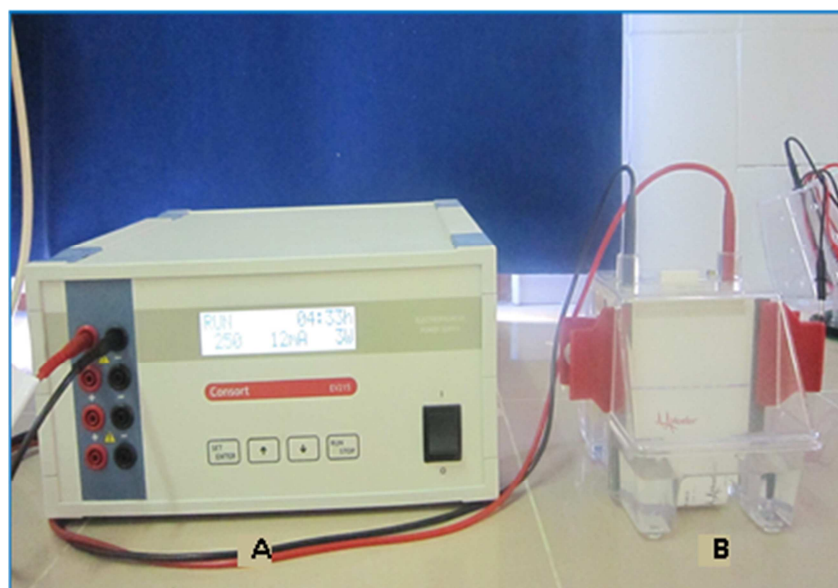


Figure 21 : Dépôt des échantillons en électrophorèse.

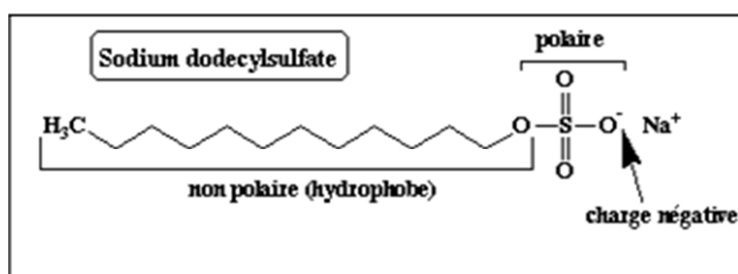


**Figure 22 :** Photographie d'une unité d'électrophorèse (HOEFFER SE 260) A : générateur de courant ; B : cuve de migration

### 1.2.3.4 . En présence du SDS et de 2-β ME (PAGE-SDS)

#### 1.2.3.4 .1. Principe

Un échantillon protéique est chauffé à 100°C pendant 5 min, en présence d'un détergent anionique le SDS (10% p/v) (figure 23) et d'un agent réducteur chargé de rompre les liaisons disulfures, le 2-βME (4% v/v). La plupart des polypeptides sont dans ce cas dissociés, ce qui permet la fixation du SDS sur les zones hydrophobes des chaînes peptidiques, les polypeptides acquièrent alors une forte charge négative et ne seront séparés que suivant leur taille dans un gel de porosité appropriée (annexe 09).



**Figure 23:** Structure du dodecyl sulfate de sodium (SDS).

### 1.2.3.5. Révélation des bandes de migration électrophorétique

A la fin de la migration, le gel est démoulé pour subir les opérations successives suivantes (figure 10).

**Fixation :** réalisée par immersion du gel dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) 12% (p/v) pendant 45min ;

**Coloration :** le gel est immergé 2 à 4 h dans une solution de coloration contenant du bleu de comassie 0.2 % (P/V) dissous dans une solution constituée du mélange eau distillée (1 volume), méthanol (1 volume) et TCA 2% (P/V) ;

**Décoloration :** réalisée par immersion du gel dans le mélange (eau/méthanol/acide acétique) dans les proportions respectives 3.12/1.5/0.37 (V/V/V). (Annexe 10)



## 2.2- Résultats et discussion

### 2.2.1-Qualité physicochimique

#### 2.2.1.1-Mesure de pH

Les valeurs de pH mesurées pour les différents échantillons de jus commercialisés sont différentes avec des pH de l'ordre de 3.16 ; 3.29 ;3.36, respectivement pour le jus orange 01, jus orange 02, jus enrichit en vitamine et jus à bas de fruit (tableau 07).

#### 2.2.1.2- Teneur en vitamine C dans un jus

Le dosage de la vitamine C est effectué par la méthode de titrimétries, cette dernière est basée sur les propriétés réductrices de l'acide L'ascorbique. Le réactif de titrage le plus utilisé est le dichloro-2,6 phénol indophénol (TILIMANS, 1932). Ce réactif est un oxydant idéal en raison de sa sélectivité pour l'acide ascorbique qui s'oxyde facilement en sa présence. D'autres réactifs ont été proposés, mais ils ne présentent pas une meilleure spécificité que le DCPIP, il s'agit par exemple de l'iode (RAO et PRASAD, 1976) et le dihaloiodate de potassium (SKURDIN, 1980).

Au cours de cette étude l'acide ascorbique s'oxyde avec le DCPIP qui est étalonné à l'aide d'une solution d'acide ascorbique pure de concentration connue ( $C_1=0.4g/l$ ). Le tableau 07 résume les résultats obtenus.

**Tableau VII :** Les pH et les teneurs en vitamine C (g/l) enregistrés dans différents jus de fruits commercialisés.

Types d'échantillons					
Paramètre Mesuré	Jus lacté	Jus orange 01	Jus enrichit en vitamine	Jus	Jus Orange 2
pH mesuré	4.18	3.16	3.29	3.36	3
Teneur en vitamine C (g/l)	0.34	0.32	0.28	0.24	0.38

On remarque que la teneur en vitamine C est variable dans les jus commercialisés. D'après TREMOLIERES et al (1984) la vitamine C est mieux conservée en milieu acide (pH bas). Cela pourrait être dû à la présence de conservateurs dans ce dernier qui a permis de protéger et ralentir l'oxydation de la vitamine C.

Les jus orange 01, jus enrichit en vitamine et jus à base de fruit sont moins riches en vitamine C avec des teneurs de 0,32 ; 0,28 et 0,24 g/l respectivement.

La variation de la quantité en vitamine C pourrait être liée à plusieurs types d'adjonction de cette dernière, soit par la restauration (compensation), l'enrichissement (E300 et ces dérivés) et la préservation.

La teneur en acide ascorbique peut être influencée par plusieurs facteurs tels que la variété du fruit, le stade de maturation, les conditions de culture, le temps, la température de stockage et la méthode d'extraction.

La perte en vitamine C est liée à la perméabilité de l'emballage vis-à-vis de l'oxygène et de la lumière. Donc la nature de l'emballage est très importante pour les jus de fruit. A température ambiante, la pénétration de 1 mg d'oxygène correspond à la perte de 11 mg de la Vit C d'un jus (BOURGEOIS, 2003).

### **2.2.1.3. Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse**

#### **2.2.1.3.1. Indice d'acidité**

Les huiles alimentaires occupent une place importante dans les habitudes alimentaires. Leur contrôle devient alors une absolue nécessité pour garantir la sécurité alimentaire et protéger les consommateurs aux risques liés à une éventuelle contamination ou fraude.

L'huile d'olive est très appréciée par sa qualité biologique et nutritionnelle. Elle nécessite donc une analyse qui permettra de la classer selon les critères de qualité données par les normes internationales.

L'huile de tournesol est appréciée pour son équilibre en acides gras, elle contient 12 % seulement d'acides gras saturés et beaucoup d'acides gras mono ou polyinsaturés, acide oléique, acide palmitique et surtout acide linoléique, qui est un acide gras essentiel. D'après les nutritionnistes, cette huile a d'excellentes qualités diététiques, par exemple pour combattre le diabète. C'est également une bonne source de vitamine E.

Selon les échantillons analysés, une grande variation de l'acidité libre est observée.

L'huile d'olive a un indice d'acide plus élevé qui est de l'ordre de 1,44 mg de KOH/g d'huile par rapport à l'huile de tournesol qui a un indice de 0,7 mg de KOH/ 1g d'huile. Un tableau récapitulatif de l'acidité et la comparaison qualitative des échantillons d'huile d'olive et de tournesol analysés.

Selon KANDJI (2001), une huile de bonne qualité doit présenter une acidité nulle ou faible, on ne saurait tolérer que celle-ci dépasse 2g % en acide oléique, correspondant à un indice d'acide d'environ 4 mg d'hydroxyde de potassium KOH/g.

L'acidité élevée peut être attribuée aux pratiques technologiques lors du processus de trituration et également au temps de séjour des olives avant la trituration. Les acides gras libres résultent de l'action des lipases sur les triglycérides, ou de toute autre activité

hydrolytique de ces triglycérides pouvant se produire avant, pendant ou après la trituration des olives. Cependant, un niveau élevé d'acidité peut être également attribué à l'état de maturité avancé du fruit et/ou au stockage prolongé et inadéquat avant trituration. Les olives peuvent subir dans ce cas des lésions qui peuvent engendrer des contaminations de l'huile et donner des huiles avec une forte acidité et des caractères organoleptiques altérés.

L'indice d'acidité est un indicateur qui permet d'évaluer la durée de conservation d'une huile et son altération, consécutive à de mauvais traitements ou à une mauvaise conservation (WOLFF, 1991). Ce paramètre d'acidité a, pour longtemps, été considéré comme un critère principal de qualité et de norme commerciale d'huile d'olive. Actuellement d'autres critères de qualité physico-chimiques et principalement organoleptiques, lui sont associés.

L'analyse des résultats indique que l'huile de tournesol et d'olive possèdent des indices d'acidité faible ce qui les fait des huiles consommables et de bonne qualité rejoignant ce qui est indiqué par KANDJI en 2001.

### 2.2.1.3.2. L'indice d'iode

L'indice diode permet de renseigner sur le degré d'insaturation globale des huiles. L'huile d'olive et de tournesol ont révélés des indices d'iode très faible, de 4,57 et 4,06 respectivement (tableau V) ces derniers ne sont pas compatibles avec les normes fixées par le codex alimentarius (2013) et qui doivent être comprise entre 75 – 94 d'I/100g pour l'huile d'olive et de 118- 141 d'I/100.g pour l'huile de tournesol. Les résultats obtenus dans notre étude pourraient être expliqué par l'hydrolyse des triglycérides.

L'indice d'iode de ces huiles diminue au cours de la conservation. Cette diminution est probablement due à une oxydation (CRAPISTE *et al.*, 1999) ou à une décomposition progressive des acides gras insaturés. Ou bien l'hydrogénation des acides gras insaturés par la fixation des molécules d'hydrogènes sur les doubles liaisons.

**Tableau VIII** : Indice d'iode et d'acidité de l'huile d'olive et de tournesol.

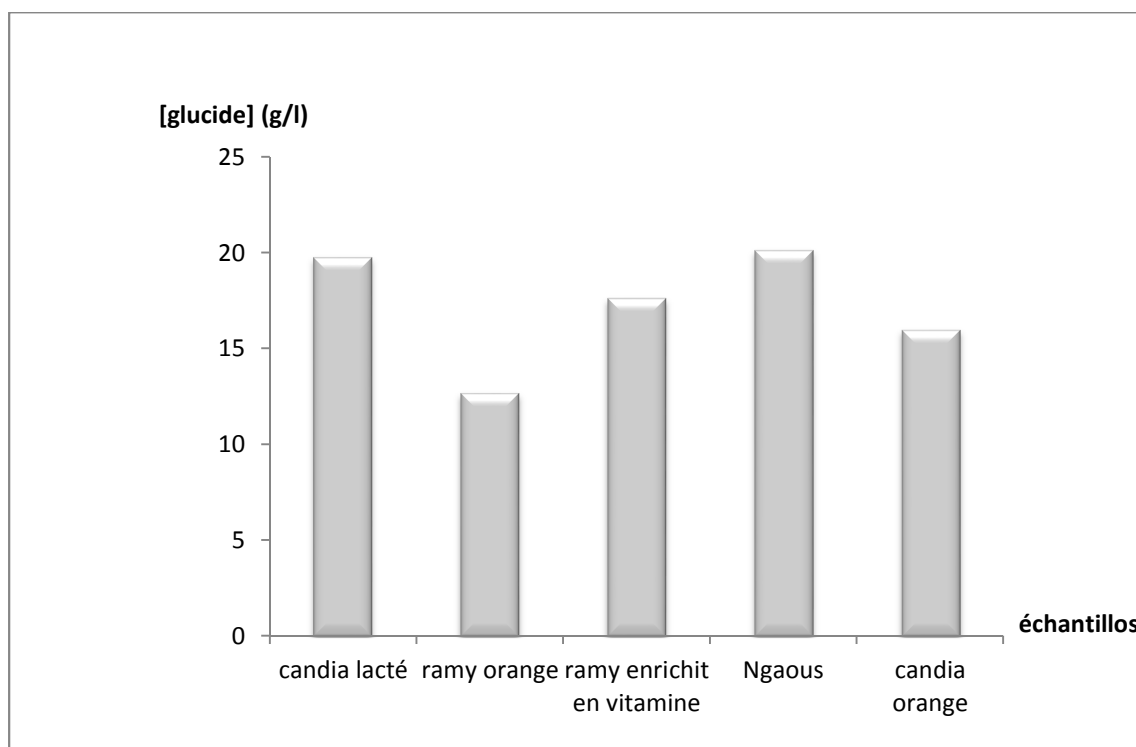
<b>Types D'échantillons</b>	<b>Huile d'olive</b>	<b>Huile de tournesol</b>
<b>Paramètres Mesuré</b>		
<b>L'indice d'acidité mg de KOH/g de matière grasse</b>	1.44	0.71
<b>L'indice d'iode g d'iode /100g de matière grasse</b>	4.57	4.06

#### 2.2.1.4. Teneur en glucides dans un jus de fruit (méthode utilisant le DNS)

Les résultats obtenus ne répondent pas aux normes AFNOR (1986) indiquées pour la concentration des jus en sucres réducteurs, elles doivent être comprises dans l'intervalle 40-100 g/l.

La teneur en sucres réducteurs est présentée par le fructose et le glucose. Au regard de l'histogramme (figure 24), nous constatons que les différents jus représentent des concentrations variables en sucres réducteurs.

La qualité d'un jus de fruit dépend en premier lieu de la qualité de la matière première, car certaines variétés sont aptes à donner de bon jus, donc la maturité doit être suffisante (CHEFTEL, 1982). En effet lors de la maturité des fruits le taux de sucres augmente (MOUFIDA et MARZOUK, 2003).



**Figure 24 :** Teneur en glucides dans différents jus de fruit.

### 2.2.1.5. Teneur en protéines

Les protéines du lactosérum constituent la fraction soluble des protéines du lait. Elles représentent 15 à 28% des protéines du lait de vache et 17% des matières azotées. Bien qu'en faible quantité dans le sérum, où elles ne représentent qu'environ 13 pour cent de sa matière sèche, leur extraction présente beaucoup d'intérêt en raison de leur grande valeur nutritionnelle et notamment de leur utilisation possible dans les domaines diététiques et thérapeutiques (DEBRY, 2001).

La concentration en protéines sériques du lait de vache obtenue dans notre étude est de 4g/l (tableau VI), cette concentration est proche à celle trouvés par ROLLERI *et al* (1956) qui varie entre 5,5 – 6,5 g/l...

La valeur obtenue concernant les protéines totale du lait de vache est de l'ordre de 35g/l cette concentration est relativement la même obtenue par BELHADI (2010) et par ALIAS *et al* (2008) qui est de 34 g/l. La teneur en protéines dans le lait dépend selon POUGHEON et GOURSAUD (2001) du génotype de la femelle laitière (race, espèce), de l'âge, la saison, le stade de lactation et l'alimentation.

L'analyse des résultats figurant dans le tableau 09, montre que les teneurs en protéines sont relativement similaires entre les laits commercialisés 29, 27 g/l pour lait UHT et lait de sachet respectivement).

## Partie expérimentale

De même, cette teneur révèle une grande différence avec celle enregistrée pour le lait de vache (35 g/l). Cela peut être expliqué par une dénaturation des protéines lors de traitement thermique au cours de processus de production.

**Tableau IX :** Concentration en protéines totales et protéines sériques des échantillons dosés par la méthode de BRADFORD *et al.*

Echantillons	Lait de vache	Lait UHT	Lait de Sachet
Types de protéines			
Protéines totales (g/l)	35	29	27
Protéines sériques (g/l)	4	3.4	3.2

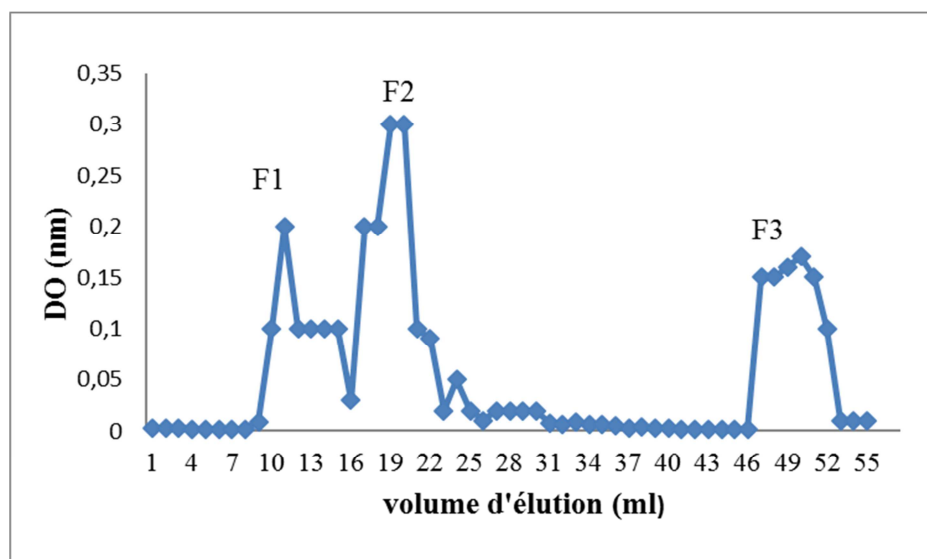
### 2.2.2. Méthodes chromatographiques

#### 2.2.2.1. Purification des protéines par chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S200

Vu le grand intérêt que présentent les protéines du lactosérum sur le plan fonctionnel et biologique, la mise en œuvre de méthodes faciles et peu coûteuses pour leur isolement et purification est toujours un objectif analytique qui suscite de l'intérêt. Pour cela, plusieurs protocoles d'isolement ont été développés initialement sur les protéines sériques bovines avant d'être appliqués sur d'autres laits de différentes espèces.

A côté des méthodes de fractionnement classiques utilisant le plus souvent la précipitation des protéines par les sels qui aboutissent généralement à des niveaux de pureté faibles, les méthodes chromatographiques sont très indiquées pour l'isolement et la purification des protéines que ce soit en basse ou à haute pression.

Dans ce cadre, nous avons essayé de fractionner les protéines sériques du lait de vache, en utilisant la chromatographie de perméation sur Sephacryl S200. Après plusieurs essais d'optimisation des paramètres de séparation, les protéines ont été éluées comme indiqué dans le chromatogramme (figure 25) caractérisé par l'apparition de trois pics d'absorption, d'intensité et de volume différents, notés F1, F2 et F3. Ces dernières ont été contrôlées par une PAGE native. Le débit utilisé est de 28ml/h. l'élution du bleu de dextrane a donné un volume mort  $V_0 = 7$ ml.



**Figure 25** : chromatogramme des protéines sériques du lait de vache sur Séphacryl S200 ; F1, F2, F3 : les fractions éluées respectivement à : 11, 21, 51 ml d'éluant.

### 2.2.3. Méthodes électrophorétiques

#### 2.2.3. Méthodes électrophorétiques

Plus généralement, cette chromatographie a été utilisée de façon avantageuse pour le fractionnement des protéines sériques du lait de plusieurs espèces. Ainsi, FELIPE et ANDREW (1997) ont appliqué le Superdex en FPLC pour séparer les séroprotéines du lait de vache, de brebis et de chèvre aboutissant à une très bonne séparation de la  $\beta$ -Lg et de l' $\alpha$ -La. YOSHIDA (1990), en utilisant le Sephacryl S200, a obtenu 5 pics principaux sur le lait bovin qui ont été par la suite purifiés par d'autres méthodes. NEYESTANI et al (2003) de leur côté, ont utilisé le Sephadex G50 pour l'isolement de l' $\alpha$ -La bovine après avoir précipité les globulines au sulfate d'ammonium à un seuil de 50%.

Il ressort de ces résultats que le procédé de séparation utilisé sur les protéines sérique du lait de vache est intéressant. Cependant, la séparation des protéines sériques avec une pureté plus élevée impose le recour à d'autres méthodes chromatographiques plus fines (chromatographie d'affinité, HPLC...).

#### 2.2.3.1. Contrôles électrophorétiques des protéines sériques du lait de vache en PAGE-native

L'électrophorèse en PAGE-native permet de garder les protéines dans leur état natif, ce qui fait de la PAGE-native une technique résolutive et bien adaptée à la séparation des protéines sériques du lait bovin (MATI, 1992). Les molécules sont séparées selon leurs poids

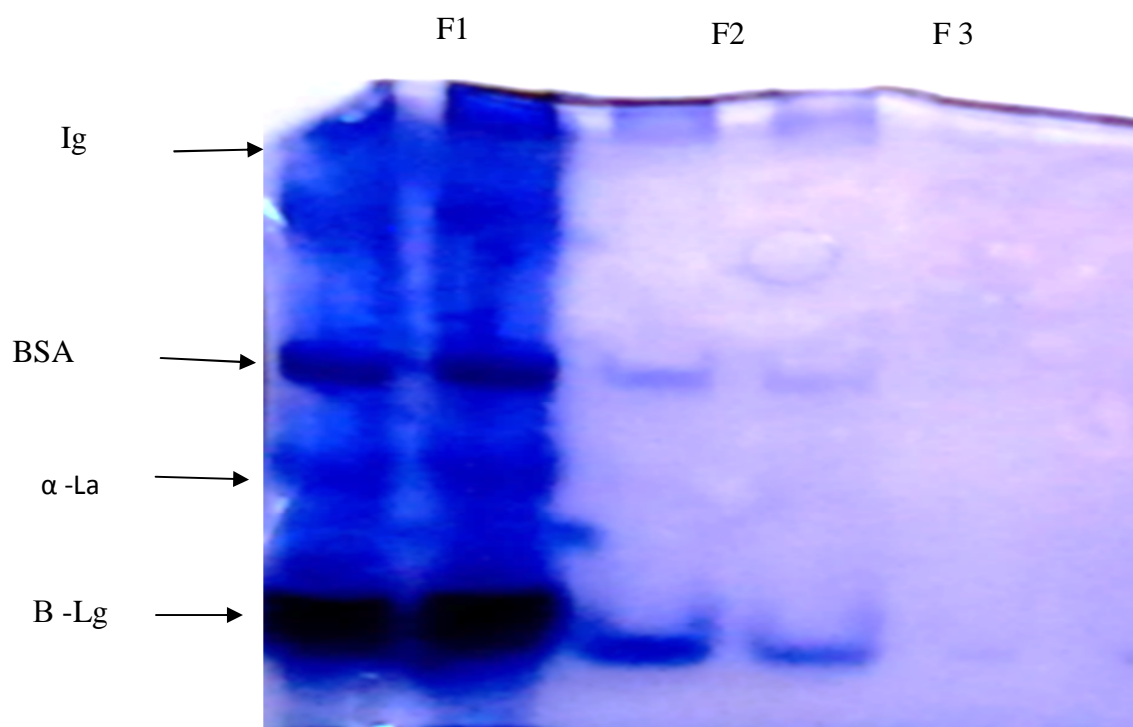
moléculaire ainsi que leur charge (WITTIG *et al.*, 2007) et apparaissent sous forme de bande de migration variant par leur position et leur intensité.

Comme il est apparu sur le profil électrophorétique mentionner dans la (figure 26), a par la chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S200.

Dans ces conditions, les protéines sériques du lait de vache migrent en quatre bandes correspondant dans l'ordre croissant de leur mobilité électrophorétiqueaux immunoglobulines (Ig = 250 000Da), le sérum albumine bovine (BSA = 64 000Da), l'alpha-lactalbumine ( $\alpha$ -La = 18 000Da) et à la fin de migration la bêta-lactoglobuline ( $\beta$ -Lg = 16 000Da).

Les Ig ont une mobilité très faible sur le gel de migration, cela dépend de leur PM très élevé qui ne leur permet pas de migrer plus loin, alors que la  $\beta$ -Lg représente la principale protéine du lactosérum du lait (bovin, ovin et caprin) avec un taux de 55 % des protéines sériques du lait de vache a le niveau de migration le plus loin (DEBRY, 2001). Alors que l' $\alpha$ -lactalbumine est la protéine du lactosérum du lait des camélidés (CANTISANI *et al.*, 1990), des rongeurs (VILOTTE, 1992) et du lait de l'homme (BRIGNON *et al.*, 1990).

La fraction F1 récupérée a révélé quatre bandes de protéines représentant ainsi les protéines majeures du lait. Par contre la F2 n'a révélé que la migration de trois bandes très fines et beaucoup moins intenses : les Ig, la BSA et  $\beta$ -Lg, pour ce qui concerne la fraction F3 récupéré lors de l'élution, le profil électrophorétiques n'a donné aucune bande cela pourrait être dû à la faible concentration en protéines ou bien on a récupéré les impuretés.



**Figure 26** : Electrophorogramme des fractions récupérées par la chromatographie de perméation (PAGE-native) ; gel à T = 12 %, C = 2,7 %.

### 2.2.3.2. Isolement et caractérisation électrophorétiques des caséines et protéines sériques lyophilisées du lait de vache en PAGE-SDS

On a obtenu des hydrolysats à différents temps d'incubation notés en minutes comme suit : T'0', T'15, T'30, T'45, T'60 et T'120.

Selon les méthodes classiques c'est possible de séparer les protéines sériques et les caséines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec la présence de 2-mercaptoéthanol comme agent réducteur, Cet agent agit en dénaturant les protéines par destruction de leur structures tridimensionnelle natives, en rompant les liaisons hydrogènes et les ponts disulfures ce qui permet de réduire les interactions entre les différentes sous unités.

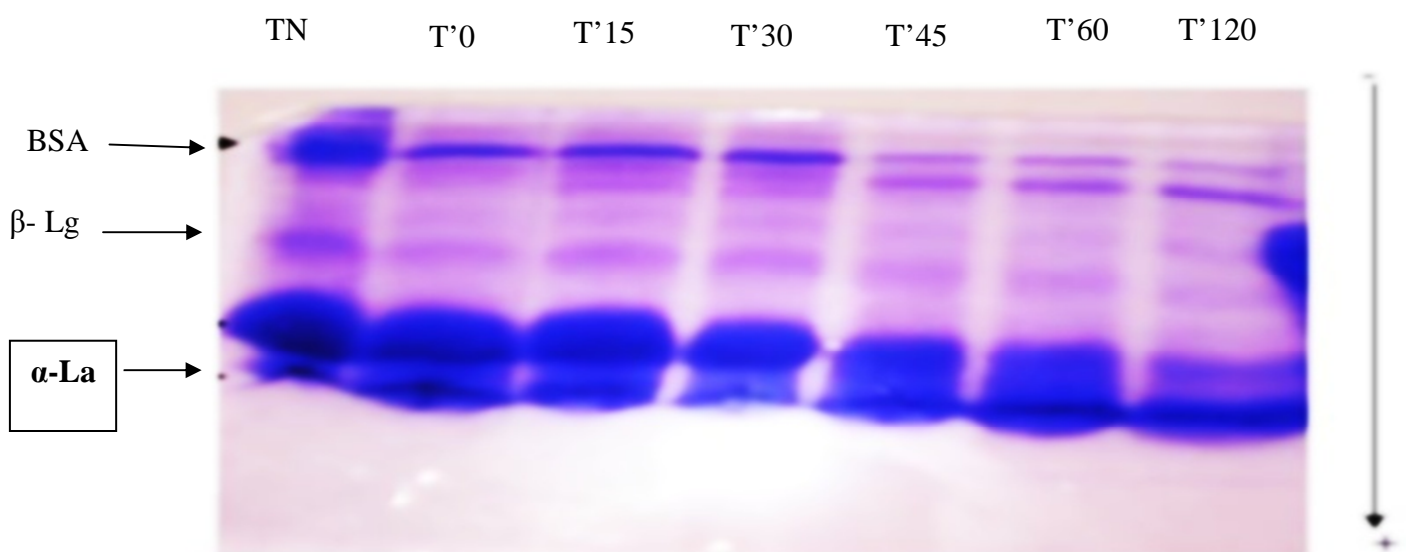
L'analyse du profil électrophorétique obtenu en PAGE-SDS pour les protéines sériques (figure 27) a révélé l'existence de bandes sombres et intenses au niveau de l'échantillon témoin (TN) et à T'0 correspondant à l' $\alpha$ -Lac, la  $\beta$ -Lg et la BSA.

## Partie expérimentale

On remarque que pour les échantillons à T 15' et 30' les trois protéines résistent à l'action de l'enzyme. A partir de T 45'd'incubation, la BSA est hydrolysée en deux polypeptides qui apparaissent en deux bandes bien séparées. La bande correspondante à la  $\beta$ -Lg devient plus fine ce qui traduit son hydrolyse.

La  $\alpha$ -La semble être résistante à l'action de la trypsine même après 120 minutes d'incubation, puisque la bande correspondante reste de la même intensité. Ceci pourrait être dû à la structure globulaire compacte de la protéine qui rend le site de coupure de la trypsine inaccessible. La  $\beta$ -Lg est plus sensible par rapport à  $\alpha$ -La, du fait de sa structure globulaire moins compacte. Le site de coupure par la trypsine est de ce fait plus accessible (LUNG *et al*, 1991).

La bande correspondante à l'Ig n'est pas apparue au niveau des différents puits du fait qu'on n'a pas donné le temps nécessaire pour que cette grosse protéine puisse migrer. L'analyse du profil électrophorétique obtenu en PAGE-SDS pour les caséines n'a pas été révélé, cela pourrait être dû soit au gel utilisé ; il y a eu des contaminations lors de son coulage, ou bien lors de sa polymérisation ou encore à la contamination des échantillons lors de leur dépôt.



**Figure 27:** Electrophorégramme des hydrolysats (protéines sériques lyophilisées du lait de vache) en PAGE-SDS ; gel de concentration (T= 4% et C= 2.7%), gel de séparation (T= 17% et C= 2.7%)

## Conclusion

L'évaluation des paramètres physicochimiques des produits alimentaires constitue une étape importante pour le contrôle de la qualité de ces derniers. Les méthodes d'analyse classiques permettent de définir la composition d'un produit alimentaire pour élaborer une stratégie d'analyse et de contrôle appropriée selon le produit en présence.

A côté des dosages physicochimiques qui figurent parmi les méthodes les plus répandues (dosage de la vitamine C, dosage des glucides, dosage des protéines et détermination de l'indice d'iode et d'acide), d'autres méthodes prennent l'ampleur. Ainsi les méthodes chromatographiques et électrophorétiques par exemples, constituent d'autres stratégies pour la mise en œuvre d'un protocole de contrôle.

## Références bibliographiques

---

### References bibliographies

**ANDREW B., NOWAKOWSKI, WILLIAM J., WOBIG et DAVID H. (2014).** Native SDS-PAGE: High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins with Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions. *Métallogiques*, 6(5), 1068-1078.

**BELHADIN. (2010).** Effet des facteurs d'élevage sur la production de la qualité du lait de vache en régions montagneuses, mémoire de Magister en agronomie ; Université Mouloud Mammeri Tizi- Ouzou ; Algérie.

**BOUDJENAH-HAROUN S. (2012).** Aptitudes à la transformation du lait de chamelle en produits dérivés : effet des enzymes coagulantes extraites de caillettes de dromadaires. Thèse de doctorat en sciences Biologiques ; Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou ; Algérie.

**BOUREOIS C. (2003).** Les vitamines dans les industries agro-alimentaires. Technique et document, Paris.

**BRADFORD M. M (1976).** Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of Proteins binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

**BRIGNON G., CHTOUROU A. ET REBADEAU-DUMAS B. (1985).** Does  $\beta$ lactoglobulin occur in human milk. *Journal of Dairy Science*, 55, 249-254.

**CHARLES A. et DEN G. (1997).** Abrégé de Biochimie alimentaire. 4<sup>ème</sup> Ed., Masson, Paris, 225-232.

**CODEX ALIMENTARIUS. (2013).** Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires, comités du codex sur les graisses et les huiles. Viale delle Terme di Caracalla, 00153. Rome, Italie.

## Références bibliographiques

---

**COLLIN J-C., KOEKELARE A., ROLLET-REPECAUD O. et DELACROIX-BUCHET A. (1991).** Dosage des caséines du lait de vache par électrophorèse et par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC R) : comparaison des résultats. *Le lait*, 71(3), 339-350.

**CRAPISTE G. H., BREVEDAN M. et CARELLI A. (1999).** Oxidation of sun flower oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76(12), 1437-1443.

**DEBRY G. (2001).** *Lait, nutrition et santé*, Tec et Doc, Paris: 21 p566.

**EGITO A-S., GIRARDET J-M., MICLO L and GAILLARD J-L (2001).** Highly sensitive periodic acide/Schiff detection of bovine milk glycoproteins electotransferred after nondenaturing electrophoresis urea electrophoresis and isoelectric focusing. *Lait*, 81, 775-785.

**GARFIN D. (2003).** Gel electrophoresis of proteins, *Essential cell biology*, (1), 197-268.

**GRAVRILOVIC M, MAGINOT M-J., SCHWARTZ-GAVRILOVIC C. et WALLACH J. (1996).** *Manipulation d'analyse biochimique*. Biosciences et techniques. Doin éditeurs-Paris.

**GAUTHIER D. (2007).** Dialyse. *Introduction aux techniques utilisées in biochimie*, 1-3.

**GILLET S. (2010).** La chromatographie et l'électrophorèse. *Les techniques de purification des proteines*. 164-211.

**HILLIER R-M (1976).** The quantitative measurement of oil whey proteins using poly acrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Research*, 43, 259-265.

**ISSELANANE S. (2014).** Caractérisation chromatographique et électrophorèse de l'extrait coagulant issu de caillettes de dromadaires adultes ; Mémoire de Magister en Biochimie appliquée aux bio-industries ; Université Mouloud MMAMERI Tizi Ouzou ; Algérie.

## Références bibliographiques

---

**JEAN L. (2006).** Biochimie des protéines. PolyTech SITA, 1,1-48.

**KANDJI N. A. (2001).** Etude de la composition chimique et de la qualité d'huiles végétales consommées au Senegal, thèse Doctorat, Université Cheikh Anta Diop de DAKAR, Senegal.

**LUNG C., PAQUET D. (1991).** Traitement de dénaturation appliquée à la  $\beta$ -lactoglobuline avant hydrolyse trypsique. 71,385-394.

**MATI A., GIRARDET J-M., XENAKI S., LINDEN G. (1991).** Isolement et caractérisation des protéines peptones des laits bovins, ovin et caprin. Le lait, 1991, 71(3),1252-1273.

**REDJALI L et OUBELLIL S. (2014).** Evaluation physicochimique de quelques produits alimentaires commercialisés ; Mémoire de Magister en Biochimie Appliquée ; Université Mouloud MAMMERI Tizi-Ouzou ; Algérie.

**REMEUF F. et LENOIR J. (1985).** Caractéristique physicochimique du lait de chèvre. Recherche laitière française, 446, 32-40.

**RITCHIE C. (2013).** Purification de protéines par chromatographie sur colonne. Labome : the world of laboratoires, 98(10),1-20.

**SENNOUSSI C. (2011).** Les protéines sériques du lait camelin collectés dans trois régions du sud algérien : essais de séparation et caractérisation de la fraction protéase peptone ; Mémoire de Magister en Biochimie Appliquée ; Université Mouloud MAMMERI Tizi-Ouzou ; Algérie.

**SI AHMED S. (2009).** Isolement et purification de la sensibilité des protéines de lait des dromadaires ; Université Mouloud MAMMERI Tizi-Ouzou ; Algérie.

**THAPON J.L. (2005).** Agrocampus-Rennes. Science et technologie du lait. 14 (77), France.

## Références bibliographiques

---

**TREMOLIERS J., SERVILLE Y. et JACQUOT R. (1984).** Manuel de l'alimentation humaine. 2.

**AUGUSTIN M.A., SANGUANSRI L., MARGETTS C., YOUNG B., 2001.** Microencapsulation of food ingredients, food Australia, 53, 220-223.

**BARTHES-BIESEL D. et LECLERC E., 2009.** Conception et réalisation d'un système micro fluide pour la production de gouttes calibrées et leur encapsulation. Thèse de doctorat. Université de technologie de Compiègne école doctorale. Picardie. France.

**BENOIT P. et al, 2013.** Microencapsulation. Technique de l'ingénieur, J2210, Résumé de l'article.

**BRANNONPEPPAS L., 1993.** Controlled release in the food and cosmetic industries. ACSSympos.Ser., 520, 42-52.

**GUERY J., 2006.** Emulsions double cristallisable : Stabilité, encapsulation et relargage. Thèse de doctorat. Ecole doctorale de physique et chimie des matériaux. Paris. France.

**GBASSI G.K., 2010.** Aspects physicochimiques de l'encapsulation des probiotiques. Thèse de doctorat. Ecole doctorale des sciences chimiques. Strasbourg. France.

**HEINZEN C., 2002.** Microencapsulation solves time dependent problems for food markers, Eur, Food and drink Rev, 3, 27-30.

**MANE J., 2006.** Technologie des arômes. 2-21.

**NAFTIY., 2008.** Contribution à l'étude de la cinétique de libération d'un principe actif : oxacilline sodique encapsulé en vue de déterminer les conditions de conservation. Mémoire d'ingénieur. Université Ziane Achour de Djelfa. Djelfa. Algérie

**NELSON G., 2002.** Application of microencapsulation dependent in textile. Int.J. Pharm, 242, 55-62.

**KOUADIO G., 2008.** Microencapsulation de composés nutraceutiques dans des complexes protéines-polysaccharides. Thèse de doctorat. Ecole doctorale des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Laval. Québec.

## Références bibliographiques

---

**BELOUADEH., 2012.** Contribution à l'élaboration des matériaux à changement de phase par microencapsulation. Mémoire de master académique. Université kasdimerbahOuargla. 52,3-15.

**THERON., 2009.** Conception et mise en œuvre d'un procédé intensifié continu de microencapsulation par polycondensation interfaciale. Thèses de doctorat institut polytechnique de Toulouse. 260,6-10.

**DELPHINE ACH., 2014.** Microencapsulation par coacervation complexe des protéines du lactosérum et de la gomme d'acacia. Thèses de doctorat. Ecole Doctorale de Chimie de Lyon.166.38-62.

**DURIEUX., 2013.** Application des technologies de microencapsulation pour la formulation de probiotiques et mise au point d'un coating entérique. Unité de biotechnologie. Institut Maurice-heldb. 34.

**CHAPAGNE., 2013.** Probiotiques dans les produits laitiers : approches récentes en encapsulation. Centre de recherche et de développement sur les aliments Saint-Hyacinthe, Québec.

**PAQUTTE., 2013.** Etude et évaluation d'une matrice protéiques pour la protection de bactéries probiotiques. Mémoire de maîtrise en science et technologie des aliments. Québec, canada .101.11-32.

## Annexes

### Annexe 01 : Dosage de la vitamine C dans un jus de fruit par la méthode au 2-6-DPIP

#### Préparation des solutions

➤ **Solution de 2,6 dichlorophénol (DCPIP) à 0.5g/l :**

Dissoudre 0.5 g du 2,6 dichlorophénol indophénol et 0.2g de bicarbonate de sodium (NACO<sub>3</sub>) dans 300 ml d'eau distillée chaude ;  
Refroidir et compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

➤ **Solution d'acide ascorbique :**

Dissoudre 0.4g d'acide ascorbique pur dans 200 ml d'eau distillée. Ajuster le volume à un 1 litre.

#### Etalonnage de la solution d'acide ascorbique

Prendre 5ml de cette solution dans un bécher, ajouter 1 ml d'acide acétique glacial et doser par le DCPIP jusqu'apparition d'une couleur rose pâle persistante ;  
Lire le volume sur la burette, soit V1 (ml).

#### Mode opératoire

Dans un bécher, introduire :

-2 ml de solution à doser ;

-ajouter 1 ml d'acide acétique glacial, mélanger ;

-titrer avec la solution du 2-6-DPIP jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle persistante.

-lire le volume sur la burette (chute de la burette), soit V2 (ml).

#### Expression des résultats

La teneur en vitamine C en g/l, est donnée par la relation suivante :

$$C1V1=C2V2$$

Où : C1 : concentration en acide ascorbique de la solution étalon.

C2 : concentration en vitamine C dans les différents jus

V1 : chute de burette mesurée dans le cas de la solution étalon

V2 : chute de burette dans le cas du jus.

## Annexe 02 : Détermination d'indice d'acidité d'une matière grasse

Peser 2.5g de matière grasse (huile d'olive et huile de tournesol) dans un erlenmeyer puis les dissoudre dans 5ml d'éthanol ;

Titre immédiatement avec de la potasse alcoolique (0.1N) en présence de quelque goutte de phénolphthaléine jusqu'à l'apparition d'une coloration rose-pâle persistante.

$$I_a = V \cdot N \cdot 56.1 / m$$

### Expression des résultats

Soit V = Volume de Potasse en ml

Soit N = Normalité de la solution de Potasse

Soit m = masse de la prise d'essai de la matière grasse en (g)

56.1 : masse molaire de KOH

## Annexe 03 : Détermination d'indice d'iode d'une matière grasse

Pour déterminer la quantité d'iode fixée, on procède à la préparation de deux tubes, un tube témoin qui contient du lugol seul et un autre contenant un échantillon d'huile et du lugol.

La titration se fait par une solution de thiosulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 0.1N), et déterminer les volumes de thiosulfate nécessaire pour le titrage des deux tubes.

**-préparation du tube témoin :** introduire dans un tube à essai 5 ml de lugol et quelques gouttes d'amidon (le mélange est bleu). Déterminer le volume V1 de thiosulfate de sodium nécessaire pour neutraliser l'iode contenu dans le tube témoin.

**-préparation du tube échantillon :** introduire dans un tube à essai 0,5 ml d'huile avec 4 ml d'hexane ou cyclohexane, mettre sous agitation pendant 3min, puis ajouter 5 ml du lugol puis chauffer pendant 5min (bien homogénéiser le long du chauffage). Après refroidissement, ajouter quelques gouttes d'empois d'amidon (mélange bleu) puis verser le thiosulfate goutte à goutte en agitant, jusqu'à décoloration. Déterminer le volume V2 nécessaire pour neutraliser l'iode contenu dans l'échantillon.

### Expression des résultats

Il est calculé par l'équation suivante (ANONYME, 1984) ;

$$I_i (\text{g}/100\text{g}) = (V_0 - V) \cdot 0,01269 \cdot 100 / P$$

$V_0$  : volume (ml) pour doser le témoin

V : volume du thiosulfate (ml) pour dose l'échantillon

P : poids de la matière grasse.

Puis, on détermine le nombre d'insaturation dans les matières grasses, donnée par l'équation suivante :

$$nI = \frac{I_i \cdot m}{MI_2} \cdot 100$$

nI : nombre d'insaturation      m : masse du corps gras       $MI_2$  : masse molaire de l'iode

## Annexe 04 : Dosage des glucides, méthode utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS)

Réaliser une courbe d'étalonnage avec une solution mère du glucose à 1g/l

Préparer les dilutions nécessaires pour les échantillons ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , et  $10^{-4}$ )

**Tableau : Gamme étalon**

N° de tube	01	02	03	04	05	06
Solution de glucose (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Réactif DNS (ml)	2	2	2	2	2	2

### Protocole expérimental

- Préparation des différentes dilutions de l'échantillon ;
- Mettre 1 ml de la solution à doser (ou des différentes dilutions) dans un tube à essai ;
- Ajouter 2 ml de réactif (3,5DNS) ;
- Chauffer au bain-marie bouillante pendant 5 mn ;
- Refroidir par écoulement d'eau sous le robinet ;
- Ajouter 7 ml d'eau distillée et homogénéiser ;
- Laisser reposer 15 mn à température ambiante ;
- Faire la lecture à 530 nm contre le blanc.

## Expression des résultats

Une courbe est tracée  $DO=f$  (concentration en glucose). Puis la quantité de sucres réducteurs présente dans les jus est déterminée.

**Tableau :** les densités optiques obtenues lors du dosage des sucres par la méthode utilisant le DNS

Les concentrations en glucose (g/l)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Les densités optiques (nm)	0	0.088	0,284	0,508	0,675	0,881

## Annexe 05 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de BRADFORD *et al* (1976)

### 1. Préparation des solutions

-solution NaCl 0.15 M ;

-solution de BSA 0.1mg/ml.

### 2. Préparation de la gamme d'étalonnage d'albumine

A partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (0.1 mg/ml), préparer les solutions filles suivantes :

**Tableau :** ensemble des solutions préparées

<b>Solution mère (BSA) (ml)</b>	0	0,1	0,5	1	1,5	2
<b>NaCl (0.15 M) (ml)</b>	2	1,9	1,5	1	0,5	0
<b>Réactif de BRADFORD (ml)</b>	1 dans tous les tubes					

-laisser 5 minutes à température ambiante ;

-lire l'absorbance à 595 nm.

**Tableau :** les densités optiques obtenues lors du dosage des protéines par la méthode de BRADFORD *et al* (1976).

<b>Solution mère [BSA] (mg/ml)</b>	0	0,01	0,05	0,1	0,15	0,2
<b>Les densités optiques (nm)</b>	0	0,099	0,195	0,296	0,472	0,63

## Annexe 06 : Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200

**-préparation du tampon Tris-HCl 0,02 M avec pH 8,4 :** dont la masse molaire du Tris MM=121,14 moles, pour 0,02 M peser 2,42g

-ajuster le volume à 1 litre dans une fiole jaugée.

### **-préparation de la colonne :**

-La colonne a été préparée avec un grand soin pour assurer un compactage homogène du gel. Le gel de Séphacryl S200 (environ 5g) est mis en contact du tampon de départ (Tris-HCl 0,02 M, pH 8,4) avec l'azide de sodium pour éviter toute contamination. Il est ensuite dégazé sous vide, puis coulé dans la colonne (30x 1cm) en une seule fois d'une façon régulière, après stabilisation de cette dernière et stabilisation du débit à 28ml/h ;

-Le volume mort  $V_0 = 7$  ml est estimé avec le bleu de dextran à la concentration de 1mg/ml qui possède une masse moléculaire de  $10^6$  Da et de ce fait n'est pas retenu dans le gel donc sortira au premier ;

-Le volume nécessaire pour l'élution du bleu de dextran correspond au volume du liquide qui se trouve entre les interstices ;

-Les protéines sériques bovines lyophilisées (100 mg) sont solubilisées dans 5 ml de tampon Tris-HCl (0,02 M ; pH 8,4), déposées en haut de la colonne et éluées dans ces conditions à un débit constant ;

-Des fractions de 1 ml sont recueillies après mesure de l'absorbance à une longueur d'onde  $\lambda=280$  nm.

-Les fractions sont collectées et les DO correspondantes ont été enregistrées pour effectuer un contrôle électrophorétique.

**Tableau : les densités optiques des fractions éluées par chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200 (protéines sériques).**

53 → 56	0
52	0.10
51	0.15
50	0.17
49	0.16
48	0.15
47	0.15
23 → 46	0
22	0.2
21	0.3
20	0.3
19	0.2
18	0.2
17	0.2
16	0.07
15	0.1
14	0.1
13	0.2
12	0.2
11	0.1
0 → 10	0
<b>Fraction</b>	<b>DO en nm</b>

## **Annexe 07 : Hydrolyse enzymatique des protéines du lait de vache (caséines et protéines lyophilisées) par la trypsine**

### **Préparation des solutions**

-tampon Tris-HCl 0,8 M ; pH 8,0

-pour 0,8g/100ml, pour 5ml peser 0.04g dissoudre dans 5ml de l'eau distillée, contrôlé le pH jusqu'à 8,0 par la solution de HCl  $10^{-3}$  N ;

-pour l'enzyme : prendre 0,4 ml d'enzyme (la trypsine) pour 0,04 g de protéines lyophilisées.

-tampon d'échantillon :

Solution(C).....500  $\mu$ l

Eau distillée.....250 $\mu$ l

SDS (10%.....250 $\mu$ l

2-mercaptoéthanol.....50 $\mu$ l

## **Annexe 08 : Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE native)**

### ➤ **Préparation des solutions**

#### • **Solution d'Acrylamide (A)**

Acrylamide.....36g

Bisacrylamide.....1g

Eau distillée.....100ml

- **Tampon de gel (B)**

Tris.....9,14g  
Eau distillée .....100ml  
Ajuster à pH 8,9 avec de HCl 4N

- **Tampon d'électrode**

Tris .....3g  
Glycine.....14,4g  
Eau distillée.....200ml

- **Tampon d'échantillon (les fractions récupérées par la chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S200 des protéines sériques du lait de vache)**

Tampon de gel (B).....100µl  
Eau distillée.....700µl  
Glycérol 50%.....200µl  
Bleu de bromophénol.....une tête d'aiguille  
Dissoudre 1mg de protéines lyophilisées dans 1ml de ce tampon

**Préparation du gel : T=12% et C= 2,7% (pour une plaque)**

Solution (A).....3,25ml  
Solution (B).....5ml  
Eau distillée.....1,68ml  
Dégazer le mélange (maximum 2min)  
TEMED.....20µl  
Solution de persulfate d'ammonium10%.....75µl  
Couler et mettre le peigne immédiatement  
Dépôt d'échantillon : 10 à 20µl  
Mise sous tension : 20mA, 25V

**Annexe 09 : Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes, en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)**

- **Solution d'Acrylamide (A) :**

Comme celle déjà préparer pour la PAGE native

- ✓ Tampon de gel de séparation

Tris.....9,25g  
Eau distillée .....50ml  
Ajuster à pH 8,8 avec de HCl 4N

- ✓ Tampon de gel de concentration (Solution C)

Tris.....3g  
Eau distillée.....50ml  
Ajuster à pH 6, 8 avec de HCl 4N

- **Tampon d'électrode**

Tris .....3g  
Glycine.....14,4g  
SDS 10%.....0,5g  
Eau distillée.....500ml

- **Tampon d'échantillon (les hydrolysats récupérer par l'hydrolyse enzymatique des protéines sériques et caséines du lait de vache)**

Solution (C).....500µl  
Eau distillée.....250µl  
SDS 10%.....250µl  
2-mercaptoéthanol.....50µl  
-Dissoudre 1mg de protéines lyophilisées dans 800µl de ce tampon  
-chauffage à 100° C pendant 4 à 5 min puis refroidir dans un bain d'eau froide.  
-ajouter 200µl d'une solution de glycérol 50% (v/v) et quelque grain du bleu de bromophenol.  
    ✓ Solution de persulfate d'ammonium  
Persulfate d'ammonium.....0,1g  
Eau distillée (qsp).....1ml  
    ✓ Conduite de l'électrophorèse

## 1. Préparation du gel de séparation : T=17% et C=2,7%(pour une plaque)

Solution (A).....1,3ml  
Solution (S).....2,5ml  
Eau distillée .....2,73ml  
Dégazer pendant 2 min maximum  
SDS 10% .....100µl  
TEMED.....50µl  
Persulfate d'ammonium 10%.....100µl  
    Couler à environ 1,5 cm du sommet de la plaque de moindre hauteur.

## 2. préparation du gel de concentration : T= 4,8% et C= 2,7%( pour une plaque)

Solution (A).....1,3ml  
Solution (C).....2,5ml  
Eau distillée.....5,8ml  
Dégazer quelques secondes  
Solution de SDS 10%.....100µl  
TEMED.....50µl  
Persulfate d'ammonium à 10%.....100µl  
-Couler immédiatement sur le gel de séparation et mettre le peigne

-Un échantillon protéique est chauffé à 100°C pendant 5min en présence d'un détergent anionique SDS (10% ) et un agent réducteur chargé de rompre les ponts disulfures, le 2-mercaptoéthanol . La plupart des polypeptides sont dans ce cas dissociés, ce qui permet la fixation du SDS sur les zones hydrophobes des chaînes peptidiques, les polypeptides seront chargés négativement donc ils seront séparés selon leurs tailles.

Dépôt d'échantillon : 10 à 20µl

Mise sous tension : 20mA, 25V

## **Annexe 10 : Révélation des bandes de migration électrophorétiques (native et SDS)**

### **Solution de fixation**

TCA.....12g  
Eau distillée.....100ml

### **Solution de coloration**

Bleu de Coomassie R250.....0,5g  
TCA.....4g  
Méthanol.....100ml  
Eau distillée.....100ml

### **Solution de décoloration**

Acide acétique.....37,5ml  
Eau distillée.....312,5ml  
Méthanol.....150ml