

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations	xv
Remerciements.....	xvii
Avant-propos.....	xix
Introduction	1
CHAPITRE 1 :.....	5
Revue de littérature.....	5
1.1. Microbiote gastrointestinal.....	7
1.2 Microorganismes probiotiques.....	9
1.3 Stress oxydatif.....	18
1.4 Moyens potentiels de protection des bactéries probiotiques contre les effets de l'oxygène.....	25
CHAPITRE 2 :.....	45
Problématique, hypothèses et objectifs	45
Problématique	47
Hypothèses.....	47
Objectifs	48
CHAPITRE 3:.....	51
Effect of catechins on the growth of oxygen-sensitive probiotic bacteria.....	51
Transition contextuelle	53
3.1 Résumé	55
3.2 Abstract	57
3.3 Introduction.....	59
3.4 Materials and Methods	61
3.4.1 Chemicals	61
3.4.2 Microorganisms and culture conditions	61
3.4.3 Preparation of antioxidant solutions	62
3.4.4 Protocols:	62

3.5 Results	66
3.5.1 Effect of MRS supplementation on growth of probiotic bacteria.....	66
3.5.2 Effect of addition of GTE, EGCG, (+) CH and ascorbic acid on the medium oxido-reduction potential	69
3.5.3 FTIR analysis	69
3.6 Discussion	73
3.7 Conclusion.....	78
CHAPITRE 4:.....	81
Lipid modification in <i>Lactobacillus helveticus</i> cells in response to oxygen and green tea extract exposure.....	81
Transition contextuelle.....	83
4.1 Résumé.....	85
4.2 Abstract.....	87
4.3 Introduction.....	89
4.4 Materials and Methods	91
4.4.1 Microorganism and culture conditions.....	91
4.4.2 Preparation of green tea extract solutions	91
4.4.3 Effects of aeration conditions and GTE concentration in the culture medium on biomass production by <i>L. helveticus</i> R0052 cells and on cell lipids	92
4.4.4 Effect of a short time exposure of <i>L. helveticus</i> R0052 cells to GTE	92
4.4.5 Analyses	93
4.5 Results and Discussion	96
4.5.1 Effects of aeration conditions and GTE concentration in the culture medium on biomass production.	96
4.5.2 Effects of aeration conditions and GTE concentration in the culture medium on the conformational order and structure of bacterial lipids.....	99
4.5.3 Influence of aeration conditions and of GTE concentration in growth medium on fatty acid composition of <i>L. helveticus</i> R0052 cells.....	110
4.5.4 Effect of a short exposure of <i>L. helveticus</i> R0052 cells to GTE	114
4.6 Conclusion.....	118
CHAPITRE 5:.....	119
Microencapsulation of <i>Lactobacillus helveticus</i> cells and green tea extract in whey protein-coated pectin microparticles.....	119
Transition contextuelle.....	121
5.1 Résumé.....	123
5.2 Abstract.....	125

5.3 Introduction.....	127
5.4 Materials and Methods	130
5.4.1 Materials.....	130
5.4.2 Bacterial strain, culture conditions and preparation of cell concentrates.....	130
5.4.3 Preparation of green tea extract solutions.....	131
5.4.4 Preparation of pectin solutions	131
5.4.5 Microencapsulation and coating procedures	132
5.4.6 Analyses.....	133
5.5 Results and discussion.....	138
5.5.1 Effects of an incubation period of GTE in pectin solutions	138
5.5.2 Microencapsulation of <i>Lactobacillus helveticus</i> cells with GTE.....	143
5.6 Conclusion.....	155
CHAPITRE 6 :.....	157
Conclusion générale et perspectives	157
Bibliographie	163

Liste des tableaux

Tableau 1.1: Réactions impliquant l'oxygène ou les dérivés réactifs de l'oxygène qui sont catalysées par certaines enzymes de souches de <i>Lactobacillus</i>	25
Tableau 1.2: Principaux principes, avantages et inconvénients de différents procédés pouvant être utilisés pour la microencapsulation de bactéries.....	33
Tableau 1.3: Matériaux utilisés pour la microencapsulation.....	39
Table 3.1: Catechin composition of the commercial green tea extract used in this study...	61
Table 3.2: Influence of catechins supplementation on maximum optical densities (OD_{max} , 600 nm) and maximum growth rates (μ_{max}) obtained during growth, at 37°C and under anaerobic conditions, of <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15708 in MRS media.....	67
Table 3.3: Influence of catechins supplementation on maximum optical densities (OD_{max} , 600 nm) and maximum growth rates (μ_{max}) obtained during growth, at 37°C and under aerobic and anaerobic conditions, of <i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 in MRS media...	68
Table 4.1: Assignment of functional groups associated with major vibration bands in mid IR spectra of bacteria.....	101
Table 4.2: Mean wavenumbers of the FTIR bands of <i>L. helveticus</i> R0052 cells grown 10 h at 37°C in MRS containing different concentrations of GTE.....	106
Table 4.3: Fatty acid composition (% of total fatty acids) of <i>L. helveticus</i> R0052 grown, under aerobic and anaerobic conditions, in MRS containing 0 to 2000 µg/mL GTE.....	111
Table 4.4: Mean maximum wavenumbers measured for <i>L. helveticus</i> R0052 cells incubated 30 min. at 37°C in MRS containing 0 or 2000 µg/mL of green tea extract.....	116
Table 5.1: DPPH radical scavenging activity of pectin solutions containing 0 to 2000 µg/mL green tea extract (GTE) added at the beginning of the pectin hydration step (P_m) or in pectin solutions just before the analysis (P_s).....	138
Table 5.2: FTIR bands mean wavenumbers for pectin solutions with green tea extract (GTE) added at different concentrations at the beginning of the pectin hydration step (P_m) or just before the analysis (P_s).....	142
Table 5.3: Average diameter, encapsulation yields and viability of <i>L. helveticus</i> cells in microparticles produced with pectin solutions containing green tea extract (GTE) added	

at different concentrations at the beginning of the pectin hydration step (P_m) or in solutions prior the microencapsulation (P_s).....	145
Table 5.4: Survival of free and microencapsulated <i>L. helveticus</i> cells (log CFU/g) with and without green tea extract following sequential incubation (37°C) in simulated gastric juice (60 min, pH 2.0) and in simulated intestinal juice (120 min, pH 7.4).....	153

Liste des figures

Figure 1.1: Colonisation microbienne du tractus gastrointestinal humain	8
Figure 1.2: Représentation d'une membrane cytoplasmique complète a) et de la bicouche lipidique b).....	19
Figure 1.3: Structure représentative d'une bicouche lipidique à une température au-dessus et en-dessous de sa température de transition.....	21
Figure 1.4: Oxygène (O ₂) et dérivés réactifs de l'oxygène : l'anion superoxyde (O ₂ ^{•-}), le radical hydroxyle (•OH) et le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	22
Figure 1.5: Structures chimiques de différentes catéchines retrouvées dans le thé vert.....	28
Figure 1.6: Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques: Le composé phénolique transfère un proton au radical libre et le neutralise.....	28
Figure 1.7: Représentation schématique des types de particules pouvant être formées par différents procédés d'encapsulation : a) le type réservoir, b) le type matrice et c) le type matrice enrobée.....	34
Figure 1.8: Intervalles de taille et type de particules pouvant être obtenues avec différents procédés permettant la microencapsulation de microorganismes.....	35
Figure 1.9: Unités d'acide galacturonique reliées entre elles (a) comme dans la chaîne de pectine et les groupements fonctionnels carboxyle (b), ester (c) et amides (d).....	41
Figure 3.1: Effects of GTE, EGCG and (+)-CH on the oxido-reduction potential of MRS culture medium.....	70
Figure 3.2: Normalized FTIR spectra (3010-2800 cm ⁻¹) of <i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 cells grown in a) control MRS media in presence of oxygen, b) in MRS + 250 µg/mL GTE in presence of oxygen and c) in control MRS in absence of oxygen.....	71
Figure 4.1: Influence of the GTE concentration on maximal populations (in log cfu/mL) obtained for <i>L. helveticus</i> R0052 cells grown 10 h at 37°C in MRS medium under anaerobic and aerobic conditions.....	97
Figure 4.2: Representative FTIR spectrum of intact <i>L. helveticus</i> R0052 cells grown under anaerobic conditions in unsupplemented MRS culture medium.....	100
Figure 4.3: Normalized FTIR spectra of <i>L. helveticus</i> R0052 cells grown under anaerobic and aerobic conditions in unsupplemented MRS medium.....	103

Figure 4.4: Normalized FTIR spectra (3000-2800 cm^{-1}) of *L. helveticus* R0052 cells grown, under (a) anaerobic and (b) aerobic conditions, in MRS culture medium supplemented with GTE at concentrations from 0 to 2000 $\mu\text{g/mL}$105

Figure 4.5: Representative second-derivative FTIR spectra (1770-1730 cm^{-1}) of *L. helveticus* R0052 cells grown, under (a) anaerobic and (b) aerobic conditions, in MRS culture medium supplemented with GTE at concentrations from 0 to 2000 $\mu\text{g/mL}$108

Figure 4.6: Normalized FTIR spectra (3000-2800 cm^{-1}) of *L. helveticus* R0052 cells incubated 30 min at 37°C in unsupplemented MRS or in MRS + 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE...115

Figure 5.1: FTIR spectra (3000-900 cm^{-1}) of pectin solutions with green tea extract (GTE) added at different concentrations in solutions just before the analysis (P_s) or at the beginning of the pectin hydration step (P_m).....140

Figure 5.2: Pectin microparticles, produced from P_m solutions containing encapsulated *L. helveticus* cells (black arrows pointing to the bacterial cells), examined by optical microscope at magnification x 60.....144

Figure 5.3: DPPH scavenging activity of microparticles produced from pectin solutions containing 0 to 2000 $\mu\text{g/mL}$ green tea extract (GTE) added at the beginning of the pectin hydration step (P_m) or in pectin solutions just before the analysis (P_s).....148

Figure 5.4: Survival during exposure to simulated gastric juice (37°C, pH 2.0 in the presence of pepsin) of free and microencapsulated *L. helveticus* R0052 cells.....150

Figure 5.5: Representative micrograph of whey-protein coated microparticles containing *L. helveticus* cells following 120 min exposure to SGJ (pH 2.0 in the presence of pepsin).....151

Liste des abréviations

ANOVA	Analyse de la variance
<i>B. longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
Ca ²⁺	Ion calcium
CaCl ₂	Chlorure de calcium
UFC(CFU)	Unité formant colonie (colony forming unit)
(+)-CH	(+)-Catéchine hydrate
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
DRO	Dérivés réactifs de l'oxygène
EGCG	Épigallocatechine gallate
ETV/GTE	Extrait de thé vert /Green tea extract
GRAS	Généralement reconnus inoffensifs (Generally recognized as safe)
HCl	Acide chlorydrique
KH ₂ PO ₄	Phosphate de potassium monobasique
<i>L. helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
ND	Non détectable
SGJ	Liquide gastrique simulé (Simulated gastric juice)
SIJ	Liquide intestinal simulé (Simulated intestinal juice)
USP	US Pharmacopeial Convention
WPI	Isolat de protéines de lactosérum (Whey protein isolate)
w/v	Poids/volume

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Dre Muriel Subirade, pour m'avoir accueillie dans son équipe et pour avoir permis la réalisation de ce projet. Je tiens également à la remercier pour ses précieux conseils, sa gentillesse, sa générosité et sa grande disponibilité. Je souhaite aussi remercier mon co-directeur Dr. Gabriel E. Remondetto pour sa gentillesse et ses conseils judicieux. J'aimerais remercier tout spécialement Dr. Claude P. Champagne, qui a agit à titre de co-directeur mais de façon non-officielle, pour son aide si précieuse, son soutien constant tout au long du projet, sa grande bonté et pour l'ensemble des révisions effectuées sur les différents articles scientifiques.

Je remercie également Dr. Jean-Christophe Vuilleumard d'avoir eu l'aimabilité d'effectuer la prélecture de cette thèse ainsi que Dr. Denis Groleau pour avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Je remercie le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour m'avoir octroyé une bourse d'étude Alexander Graham Bell ainsi que Mme Muriel Subirade pour son soutien financier.

Un grand merci à Mme Diane Gagnon pour son aide si importante en laboratoire, pour sa bonne humeur contagieuse et sa grande générosité ainsi qu'à M. Ronan Corcuff, Mme Céline Paquin, M. Pascal Dubé et Mme Élodie Rozoy pour leur aide technique en laboratoire. Merci également à ma stagiaire, Dounhia, pour l'aide apportée.

Je tiens aussi à remercier mes collègues étudiants ainsi que mes amis pour leur gentillesse et leur soutien: Fatou, Idrissa, Benoît, Allisson, Sergey, Mathieu, Shyam, Valérie, Nassim, Hany, Abdel, Charles, Monica, Marie-Claude, Nathalie et tous les étudiants que j'ai côtoyés tout au long de mes études de doctorat. Vos sourires et votre entrain ont grandement égayé mes journées de laboratoire.

J'aimerais remercier grandement mes parents, Léandre et Gisèle, mes sœurs Sylvie et Lucie ainsi que mon frère, Marc-André, pour leur amour et leur soutien constant si important pour moi. Merci également à mes beaux-parents, beaux-frères et belles-sœurs pour leur accueil, leur gentillesse et leur générosité.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon conjoint, Laurent, pour son amour, son aide précieuse, son écoute, sa confiance, sa présence dans les moments difficiles et avec qui vivre est un bonheur constant. Un immense merci va également à mes enfants, Solène, Mathieu et Laurianne, pour leurs encouragements et pour l'immense joie de vivre qu'ils m'apportent chaque jour.

Avant-propos

La présente thèse est divisée en 6 chapitres. Le premier chapitre est une revue de littérature traitant des effets bénéfiques et des modes d'action des microorganismes probiotiques, des facteurs affectant leur viabilité et plus particulièrement du stress oxydatif, de même que des différents moyens pouvant être utilisés pour limiter les effets du stress oxydatif sur les bactéries probiotiques qui y sont sensibles. Le deuxième chapitre énonce la problématique découlant du sujet de recherche, les hypothèses formulées ainsi que les différents objectifs à atteindre afin de vérifier ces hypothèses. Les principaux résultats obtenus durant ce projet sont présentés, sous forme d'articles scientifiques, dans trois chapitres distincts.

L'influence de différentes catéchines sur la croissance en présence d'oxygène de souches bactériennes probiotiques qui y sont sensibles sera décrite dans le chapitre 3. L'article qui en découle a été publié dans «Food Research International» sous le titre «Effect of catechins on the growth of oxygen-sensitive probiotic bacteria.» Les auteurs sont Hélène Gaudreau, Claude P. Champagne, Gabriel E. Remondetto, Laurent Bazinet et Muriel Subirade.

L'impact sur les lipides bactériens d'un enrichissement du milieu de culture des bactéries avec un extrait de thé vert, qui est une source importante de catéchines, a ensuite été étudié dans le but de comprendre les mécanismes potentiels d'action des catéchines. Les résultats obtenus font l'objet d'un deuxième article qui s'intitule «Lipid modification in *Lactobacillus helveticus* cells in response to oxygen and green tea extract exposure.» et qui est présenté au chapitre 4. Les auteurs sont Hélène Gaudreau, Claude P. Champagne, Gabriel E. Remondetto, Pedro A. Alvarez, Ahmed Gomaa et Muriel Subirade.

Le dernier volet des résultats, présenté au chapitre 5, concerne l'étude de la microencapsulation d'une souche bactérienne probiotique avec de l'extrait de thé vert. Les résultats obtenus sont présentés dans l'article «Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* cells and a green tea extract in whey protein-coated pectin microparticles». Les auteurs sont Hélène Gaudreau, Claude P. Champagne, Gabriel E. Remondetto, Ahmed Gomaa et Muriel Subirade.

L'auteure de cette thèse a été en charge de la conception, de la planification, de l'exécution des travaux pratiques, de l'interprétation des résultats ainsi que de la rédaction des articles scientifiques dont elle est le premier auteur. Dr. Muriel Subirade, Dr. Claude P. Champagne et Dr. Gabriel E. Remondetto, directrice et co-directeurs du projet et co-auteurs des trois articles ont contribué à la planification des travaux de recherche, à la discussion des résultats et à la révision des articles. Le Dr. Laurent Bazinet a contribué à l'étude du potentiel d'oxydo-réduction des milieux de culture. Finalement, Dr. Pedro A. Alvarez et Dr. Ahmed Gomaa ont participé à la discussion des résultats d'analyse FTIR et à la révision des articles.

Suite à la présentation des résultats, la dernière partie de ce travail présentera, au chapitre 6, la conclusion générale de cette étude et les principales perspectives envisagées pour la poursuite des recherches dans ce domaine.

Introduction

Une multitude d'études réalisées sur des animaux et des humains ont démontré les effets bénéfiques de la consommation de bactéries probiotiques pour la prévention d'une grande variété de désordres gastrointestinaux (Borchers *et al.*, 2009; Collado *et al.*, 2009; Vasiljevic et Shah, 2008), le renforcement du système immunitaire (Chen et Chen, 2007) et pour l'amélioration du transit gastrointestinal (Picard *et al.*, 2005). Ces microorganismes pourraient également avoir un effet préventif sur le développement du cancer du côlon (Picard *et al.*, 2005). Une consommation journalière de 10^9 - 10^{10} unités formant des colonies de cellules probiotiques viables procurerait des effets positifs sur la santé de l'hôte (Hemaiswarya *et al.*, 2013), particulièrement par une modulation du microbiote intestinal (Ohashi et Ushida, 2009). Toutefois, les microorganismes probiotiques doivent demeurer viables dans les produits dans lesquels ils sont incorporés et durant leur passage dans la partie supérieure du tractus gastrointestinal pour avoir un effet maximal sur le microbiote intestinal et aussi sur la réponse immunitaire des hôtes (Adams, 2010). La survie de ces microorganismes peut être réduite par leur exposition à différents stress durant la fabrication et l'entreposage des produits dans lesquels ils sont incorporés. Les principaux stress seraient le pH et l'acidité titrable, la température d'entreposage, les procédés de transformation (congélation, chauffage, homogénéisation, fermentation, séchage; Champagne *et al.*, 2005; Mortazavian *et al.*, 2012), les ingrédients (arômes, édulcorants, sel, épices, enzymes; Vinderola *et al.*, 2002), le potentiel d'oxydo-réduction et l'oxygène moléculaire (Mortazavian *et al.*, 2012). Les microorganismes probiotiques sont aussi exposés durant leur transit dans le tractus gastrointestinal à des stress successifs tels que l'acidité de l'estomac, les enzymes et la présence de sels biliaires (Lee et Salminen, 2009). Parmi tous les facteurs de stress mentionnés, l'oxygène serait une des causes importantes de mortalité pour les souches bactériennes qui y sont sensibles. En effet, en présence d'oxygène, les lipides membranaires de ces microorganismes peuvent s'oxyder, ce qui résulte en un changement de leur teneur en lipides insaturés et en une modification de la perméabilité membranaire. Un changement de cette perméabilité passive des membranes peut résulter en l'inactivation des cellules bactériennes (In't Veld *et al.*, 1992) et même à la mort cellulaire.

L'utilisation de composés antioxydants, tel que l'acide ascorbique, est un des moyens les plus connus pour limiter les effets négatifs de l'oxygène sur les cultures probiotiques (Champagne *et al.*, 2005). Cependant, certains composés antioxydants tels que l'acide ascorbique et la cystéine ont eu des effets négatifs sur les produits dans lesquels ils ont été incorporés (Dave et Shah, 1997 b et c). La viabilité de cellules de *Lactobacillus rhamnosus* a aussi été réduite lors d'une co-encapsulation bactéries-acide ascorbique (Ying *et al.*, 2011). Les catéchines du thé vert possèdent des propriétés antioxydantes plus importantes que l'acide ascorbique (Hara, 2001). Des catéchines et des extraits de thé vert contenant des catéchines ont permis une augmentation de la survie de bactéries probiotiques durant leur entreposage dans des yogourts (Akahoshi et Takahashi, 1996) et des jus de fruits (Shah *et al.*, 2010) et ainsi que lors de leur exposition à des conditions gastrointestinales simulées (Vodnar et Socaciu, 2012, 2014). Les catéchines interagissent et piègent les radicaux formés en présence d'oxygène et peuvent potentiellement limiter leurs effets sur les bactéries.

La microencapsulation est une autre stratégie qui a été utilisée pour tenter de protéger les bactéries probiotiques de la présence d'oxygène dissous dans les produits alimentaires (Talwalkar et Kailasapathy, 2003b). Il s'agit d'un procédé physicochimique et mécanique qui consiste à enrober des composés sensibles par une couche d'un autre composé pour les protéger. Cette méthode permet la formation de particules contenant les bactéries et dans lesquelles des régions anoxiques se formeraient. L'exposition à l'oxygène des bactéries serait donc réduite dans ces régions (Talwalkar et Kailasapathy, 2003b et 2004b). Ainsi, la microencapsulation a permis d'augmenter la survie de six souches de bifidobactéries lors d'un entreposage en présence d'oxygène dans du yogourt (Talwalkar et Kailasapathy, 2003b). McMaster *et al.* (2005) ont aussi montré une augmentation de la tolérance à l'oxygène de bifidobactéries lorsqu'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 (Manojlović *et al.*, 2010). De plus, les systèmes de protection existants ne permettent, généralement, qu'une protection de courte durée des bactéries. Il peut donc y avoir une perte de viabilité importante des bactéries sensibles à l'oxygène durant les

périodes d'entreposage des produits dans lesquels elles ont été incorporées. Depuis quelques années, des gels de gélatine (Spizzirri *et al.*, 2009), d'inuline (Spizzirri *et al.*, 2010 et 2011), d'alginate (Spizzirri *et al.*, 2010) et de chitosane (Siripatrawan et Harte, 2010) et contenant des catéchines ou des extraits de thé vert ont été réalisés. L'ajout de ces composés a conféré à ces gels des propriétés antioxydantes, mais leurs bénéfices n'ont pas été testés sur des cultures probiotiques. La microencapsulation de bactéries dans une matrice contenant des catéchines ou de l'extrait de thé vert combinerait les effets antioxydants des catéchines et de barrière contre les effets de l'environnement prodigués par la formation de microparticules contenant les bactéries.

Dans ce contexte, le but de cette étude est d'étudier les effets de catéchines et d'un extrait de thé vert riche en catéchines sur la croissance de bactéries probiotiques sensibles à l'oxygène et d'une co-encapsulation bactéries-extrait de thé vert sur leur survie lors de leur exposition à des conditions gastrointestinales simulées.

Rapport-Grafiati.com

CHAPITRE 1 :

Revue de littérature

1.1. Microbiote gastrointestinal

1.1.1 Composition du microbiote gastrointestinal

Le microbiote gastrointestinal est un système complexe contenant plus de 1000 espèces bactériennes (Sankar *et al.*, 2015). Le type de bactéries et leur nombre total sont fonction d'une multitude de facteurs autant intrinsèques, qui dépendent des conditions retrouvées dans les différentes sections du tractus gastrointestinal (Holzapfel *et al.*, 1998), qu'extrinsèques. Ces dernières sont reliées, par exemple, à la diète, à la prise d'antibiotiques, aux xénobiotiques (Ley *et al.*, 2008), au vieillissement et aux maladies s'il y a lieu (Biagi *et al.*, 2012; O'Toole et Claesson, 2010).

La prolifération microbienne est fortement réduite dans l'estomac à cause du bas pH qui y est rencontré par les microorganismes (Figure 1.1). La population à cet endroit est dominée par des bactéries Gram-positives telles que les streptocoques et les lactobacilles et par des levures (Holzapfel *et al.*, 1998). Le duodénum est aussi un environnement hostile pour les microorganismes de par la présence de fluides intestinaux (bile, jus pancréatique, ...) et il contient une quantité relativement faible de microorganismes. La population microbienne augmente toutefois dans le jéjunum et l'iléon (jusqu'à 10^8 ufc/mL). On retrouve encore dans ces sections du tractus gastrointestinal des lactobacilles et des streptocoques mais aussi d'autres types de bactéries telles que des *Bacterioides*, des entérobactéries, des bifidobactéries et des fusobactéries. Dans le côlon, le microbiote est composé principalement de bactéries anaérobies car les concentrations en oxygène y sont très faibles (Quigley, 2010). On peut aussi y retrouver des microorganismes aérobies facultatifs (*Lactobacillus*, entérobactéries et streptocoques; Holzapfel *et al.*, 1998). De plus, des groupes mineurs d'organismes pathogènes sont toujours présents en faible quantité dans les intestins (Gedek, 1993). Chez une personne en santé, la quantité de métabolites toxiques produits par ces microorganismes pathogènes semble insuffisante pour avoir un effet indésirable sur l'hôte (Holzapfel *et al.*, 1998). Toutefois, une prolifération de ces microorganismes peut avoir des effets néfastes pour la santé de l'hôte.

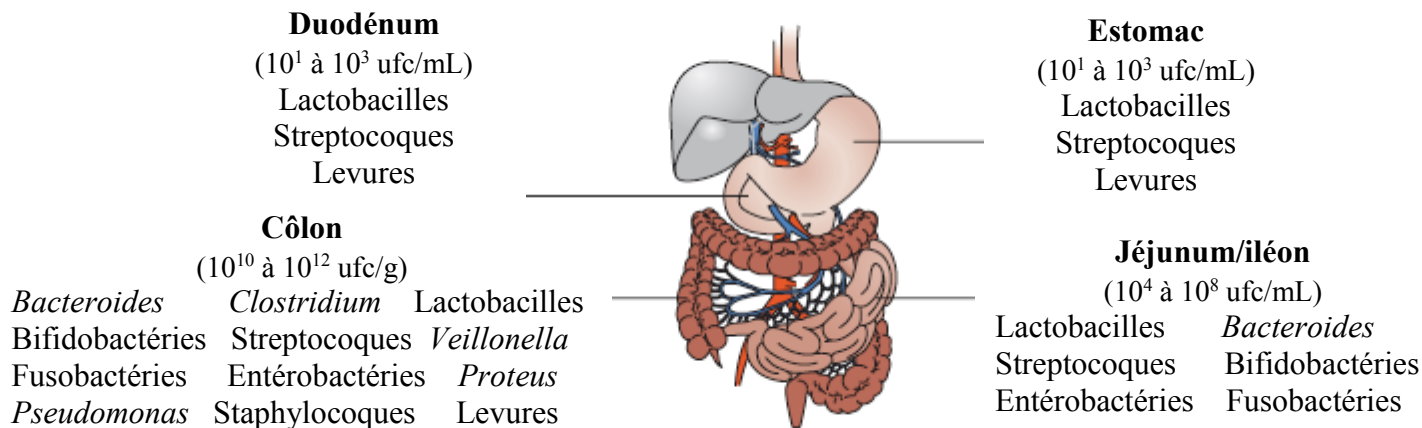


Figure 1.1: Colonisation microbienne du tractus gastrointestinal humain (adaptée de O'hara et Shanahan, 2006 et Holzapfel *et al.*, 1998).

1.1.2 Fonctions du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal agit comme une barrière contre les microorganismes pathogènes. De plus, de par ses différentes fonctions physiologiques, il a des effets importants sur la santé générale de l'hôte ((Holzapfel *et al.*, 1998). En effet, de nombreuses bactéries intestinales contribuent à la décomposition de substances non digérées comme les fibres, les amidons et les sucres (Gibson et Roberfroid, 1995). Le microbiote intestinal participe aussi à la récupération de l'énergie, à l'approvisionnement en (micro)nutriments et à la transformation des xénobiotiques (Laparra et Sanz, 2010). Il contribue également à la production de certaines vitamines B, à la stimulation du système immunitaire et à la production d'enzymes digestives (Holzapfel *et al.*, 1998). Un déséquilibre de ce microbiote serait associé à des désordres immunitaires ou métaboliques (Nadal *et al.*, 2007; Santacruz *et al.*, 2009) chez les humains. Les maladies inflammatoires chroniques intestinales, le cancer du côlon et le syndrome du côlon irritable pourraient, par exemple, être liés à la communauté microbienne dans le côlon et à ses activités (Rastall *et al.*, 2005). Donc, les microorganismes intestinaux participent non seulement aux fonctions

physiologiques normales mais pourraient aussi contribuer significativement au développement de plusieurs maladies (Ahn *et al.*, 1990).

En raison de ces effets importants sur la santé de l'humain, les possibilités de moduler la composition du microbiote intestinal par différents composés suscitent beaucoup d'intérêt. Le but de cette modulation est d'augmenter le nombre et l'activité des microorganismes conférant potentiellement des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte tels que certaines espèces de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus* (Holzapfel *et al.*, 1998). Plusieurs études réalisées avec des animaux et des humains ont démontré qu'une certaine modulation de leur microbiote intestinal est possible par consommation de bactéries probiotiques (Borchers *et al.*, 2009, Collado *et al.*, 2009, Vasiljevic et Shah, 2008).

1.2 Microorganismes probiotiques

1.2.1 Définition

Les probiotiques sont définis comme des organismes vivants qui, lorsqu'ingérés en quantité suffisante, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte (FAO/WHO, 2006). Les organismes probiotiques sont principalement des souches sélectionnées de *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (Mortazavian *et al.*, 2012). Des souches de *Lactococcus*, d'*Enterococcus*, de *Saccharomyces*, de *Propionibacterium* (Blandino *et al.*, 2003; Rivera-Espinoza et Gallardo-Navarro, 2010; Sanders et Huis in't Veld, 1999; Vinderola et Reinheimer, 2003), d'*Escherichia coli* (Wehkamp *et al.*, 2004), de *Leuconostoc* et de *Pediococcus* (Di Giancamillo *et al.*, 2008) ont aussi été proposées comme étant probiotiques.

1.2.2 Effets bénéfiques potentiels des microorganismes probiotiques et leurs mécanismes d'action

Une consommation journalière de 10^9 - 10^{10} unités formant des colonies (ufc) de cellules vivantes de microorganismes probiotiques aurait des effets positifs sur la santé de l'hôte

(Hemaiswarya *et al.*, 2013). En effet, l'administration orale de souches probiotiques à des adultes en bonne santé a résulté en une amélioration de leur santé gastrointestinale (Olivares *et al.*, 2006). Les probiotiques ont, de plus, été proposés pour le traitement de dysfonctions de la barrière intestinale des humains comme l'intolérance au lactose, les gastroentérites aiguës, les allergies alimentaires, la dermatite atopique, la maladie de Crohn, l'arthrite rhumatoïde et le cancer du côlon (Kalliomäki *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Rinkinen *et al.*, 2003; Salminen *et al.*, 1998). Certaines bactéries probiotiques pourraient aussi permettre une réduction du cholestérol sanguin (Bukowska *et al.*, 1998). Plus récemment, des liens entre le microbiote et la santé mentale (Carabotti *et al.*, 2015; Dinan *et al.*, 2013) ainsi que sur l'obésité (Aguirre et Venema, 2015) ont été suggérés.

Les effets bénéfiques des microorganismes probiotiques sur la santé ont été attribués à la production d'acide lactique et autres acides organiques qui diminueraient le pH intestinal et limiteraient la croissance des bactéries pathogènes (Alvarez-Olmos et Oberhelman, 2001; Doron et Gorbach, 2006), à l'inactivation de toxines produites par d'autres microorganismes (Oelschlaeger, 2010), à la stimulation du système immunitaire (Roller *et al.*, 2004), à la réduction d'enzymes fécales qui peuvent être impliquées dans la formation de composés cancérigènes (Spanhaak *et al.*, 1998) et à la production de bactériocines ou substances similaires et de peroxyde d'hydrogène qui sont toxiques pour les microorganismes pathogènes (Doron et Gorbach, 2006; Vanderhoof et Young, 2004; MacIntyre et Cymet, 2005). De plus, les microorganismes probiotiques peuvent diminuer la colonisation des intestins par certaines souches bactériennes pathogènes telles qu'*Escherichia coli* et *Salmonella enterica* serotype Typhimurium en bloquant de façon compétitive leur adhésion aux cellules épithéliales *in vitro* (Gill, 2003) ou en provoquant la formation d'une barrière protectrice par stimulation de la production de mucine (Gareau *et al.*, 2010). Certains microorganismes probiotiques renforcent aussi la barrière intestinale en stabilisant les jonctions serrées entre les cellules épithéliales et en diminuant la perméabilité intestinale (Doron et Gorbach, 2006). Les effets bénéfiques potentiels des microorganismes probiotiques tendent toutefois à être spécifiques à chaque souche utilisée. Donc, l'effet bénéfique attribué à une souche bactérienne ne serait pas nécessairement attribuable à une

autre souche bactérienne même si ces deux souches sont de la même espèce (Toedter Williams, 2010).

Les souches de bactéries probiotiques sélectionnées pour la réalisation de ce projet de recherche sont *Bifidobacterium longum* ATCC 15708, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 et *Lactobacillus helveticus* R0052. Leurs effets bénéfiques potentiels pour la santé sont présentés ci-dessous.

Bifidobacterium longum

Les effets bénéfiques pour la santé des bifidobactéries, qui sont des souches anaérobies strictes Gram-positives, ont été démontrés dans de nombreux travaux. Ces microorganismes produisent des quantités importantes d'acides acétique et lactique (Payne *et al.*, 2011) qui peuvent exercer une activité antimicrobienne dans le côlon ou être utilisés, par d'autres types de bactéries, pour la synthèse d'acides gras (Dias *et al.*, 2011; Baskett et Hentges, 1973; Huang *et al.*, 2011; Louis *et al.*, 2004). De plus, les souches de *B. longum* peuvent potentiellement conférer des effets bénéfiques par une diminution des symptômes reliés à l'intolérance au lactose, par une réduction du taux de cholestérol sérique ainsi que par leurs propriétés anticancérigènes (Gilliland, 1990). De façon plus spécifique, la souche *Bifidobacterium longum* ATCC 15708, qui a été isolée initialement de la flore intestinale d'un nourrisson, possède des propriétés antioxydantes et limiterait l'oxydation des lipides du plasma (Lin et Chang, 2000). De plus, la consommation de laits non fermentés contenant des cellules vivantes de cette souche a permis de diminuer les symptômes reliés à l'intolérance au lactose chez des humains (Jiang *et al.*, 1996). Par ailleurs, les souches de *B. longum* subsp. *infantis* sont considérées comme étant particulièrement bénéfiques pour la santé des humains grâce à leur capacité élevée d'inhibition des microorganismes pathogènes via une action antimicrobienne directe (Gibson et Wang, 1994) et pour leur habileté à diminuer les colites (McCarthy *et al.*, 2003). Ces espèces peuvent aussi stimuler la synthèse de molécules immunomodulatrices (He *et al.*, 2002; Hart *et al.*, 2004). Il a été démontré que des cellules microencapsulées de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697

pouvaient moduler le microbiote intestinal chez les rats et aussi réduire la quantité d'endotoxines dans leur côlon (Rodes *et al.*, 2014).

Lactobacillus helveticus R0052

La souche *Lactobacillus helveticus* R0052 a été étudiée dans plusieurs travaux de recherche. C'est une souche anaérobie facultative Gram-positive qui a été isolée en 1990 de ferments laitiers puis déposée dans la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur comme étant la souche I-1722. Elle a été identifiée initialement comme une souche de *Lactobacillus acidophilus* sur la base de ses caractéristiques phénotypiques mais des analyses plus poussées ont démontré que c'était en fait une souche de *Lactobacillus helveticus* (Naser *et al.*, 2006). Dû à sa reclassification, différents noms lui ont été attribués dont K1 (Podlešny *et al.*, 2011), K300 (Atassi *et al.*, 2006), Rosell 52 (Diop *et al.*, 2008) et *Lactobacillus acidophilus* YS or RO-52 (Easo *et al.*, 2002). Le génôme de cette souche a, de plus, été séquencé (Tompkins *et al.*, 2012). Cette souche bactérienne fait maintenant partie de plusieurs formulations bactériennes disponibles commercialement telles que Lacidofil®, Probacti®, Proteclore®, Probiostim®, Probiokid® et Probiostick®.

Plusieurs effets bénéfiques pour la santé ont été attribués à cette souche bactérienne. Premièrement, elle aurait une activité antibactérienne importante envers les souches *G. vaginalis*, *P. bivia*, *E. coli*, *S. typhimurium* (Atassi *et al.*, 2006), *S. aureus* (Sadowska *et al.*, 2010) et *C. difficile* (Grimoud *et al.*, 2010). De plus, cette souche montrerait un fort attachement aux cellules intestinales (Atassi *et al.*, 2006), ce qui résulterait en une diminution de l'adhésion de microorganismes pathogènes aux cellules épithéliales. Elle permettrait aussi le maintien de la barrière intestinale, ce qui réduirait les effets négatifs des microorganismes pathogènes (Jandu *et al.*, 2009; Johnson-Henry *et al.*, 2007; Sherman *et al.*, 2005). Cette souche a, de plus, démontré ses propriétés d'immunomodulation (Buckley *et al.*, 2011) et sa capacité à moduler à la baisse la production de cytokines inflammatoires (Cazzola *et al.*, 2010; Easo *et al.*, 2002; Wallace *et al.*, 2003). Différentes études ont aussi

montré des effets santé potentiels de cette souche lorsqu'utilisée en combinaison avec une ou plusieurs autres souches de bactéries probiotiques (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2014; Chernyshov, 2009; Foster *et al.*, 2011; Messaoudi *et al.*, 2011).

Parmi tous les effets bénéfiques potentiels des microorganismes probiotiques, certains effets anti-inflammatoires (Adams, 2010; Jijon *et al.*, 2004; Rachmilewitz *et al.*, 2004) pourraient être obtenus par consommation de microorganismes non vivants ou de protéines solubles isolées de cellules de bactéries probiotiques (Yan *et al.*, 2011). La consommation de microorganismes probiotiques non vivants pourraient permettre une diminution de l'intolérance au lactose (Martini *et al.*, 1987) ou une réduction du cholestérol sanguin (Ishimwe *et al.*, 2015). De plus, durant les fermentations réalisées pour la fabrication de nombreux aliments, l'action des bactéries sur la matrice alimentaire peut produire une grande variété de produits à partir des constituants des aliments. Dans certains cas, c'est la génération de ces composés bioactifs, appelés aussi probiactifs, qui vont donner au produit alimentaire ses effets bénéfiques pour la santé (Farnworth et Champagne, 2010). Par contre, lorsque consommées vivantes, les cellules probiotiques vont avoir des effets et sur le microbiote intestinal et sur la réponse immunitaire (Adams, 2010). Donc, pour que les microorganismes probiotiques puissent restaurer l'équilibre microbien ou moduler le microbiote intestinal, ils doivent demeurer viables durant la durée de vie du produit dans lequel ils sont incorporés (Senok *et al.*, 2005; Vanderhoof et Young, 2004 et 2008; Goldin, 1998) et être capables de survivre durant le passage dans la partie supérieure du tractus gastrointestinal. Plusieurs facteurs ont cependant une influence sur leur survie autant durant leur entreposage dans des produits alimentaires que durant leur passage dans le tractus gastrointestinal.

1.2.3 Facteurs affectant la viabilité des bactéries probiotiques

1.2.3.1 Facteurs affectant la viabilité, durant l'entreposage, des bactéries probiotiques incorporées dans les aliments

La prise d'aliments probiotiques est la façon la plus populaire et la plus fréquente de consommer des bactéries probiotiques (Mortazavian *et al.*, 2012). Le yogourt, le fromage, les laits fermentés, la crème glacée, la poudre de lait, les breuvages à base de lactosérum, la crème sûre (Mortazavian *et al.*, 2012), les jus, les smoothies, les céréales, les barres nutritionnelles et les formules pour bébés sont tous des produits alimentaires pouvant en contenir (Davis et Milner, 2009). Selon l'agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA, 2015), les aliments probiotiques doivent contenir, par portion, un minimum 1×10^9 ufc de bactéries probiotiques viables au moment de leur consommation pour pouvoir porter la mention «contenant des probiotiques» sur leur emballage. Toutefois, plusieurs facteurs ont une influence sur la viabilité des bactéries probiotiques durant l'entreposage des produits alimentaires en contenant. Les principaux seraient le pH et l'acidité titrable, la température d'entreposage, les ingrédients contenus dans les produits, les étapes de congélation et de décongélation si les produits sont congelés, le potentiel d'oxydo-réduction et l'oxygène moléculaire (Mortazavian *et al.*, 2012). Le séchage des aliments contenant des bactéries probiotiques peut aussi avoir un impact important sur la survie de ces microorganismes. Les effets de ces facteurs sur les bactéries sont décrits brièvement ci-après.

Le pH et la présence d'acides organiques

Le pH et l'acidité titrable des produits contenant des bactéries probiotiques affectent considérablement leur survie (Mortazavian *et al.*, 2010). Toutefois la sensibilité aux bas pH est variable selon les souches utilisées. Les lactobacilles peuvent croître et survivre dans des laits fermentés et des yogourts (pH entre 3.7 et 4.3; Boylston *et al.*, 2004) tandis que les bifidobactéries seraient moins résistantes aux pH acides. La plupart des espèces de bifidobactéries ont une faible survie dans les produits dont le pH est inférieur à 4.6 (Dunne *et al.*, 2001; Lee et Salminen, 2009).

Les effets des acides organiques dans les produits alimentaires sur les bactéries proviennent de leur nature lipophile. En effet, ces acides peuvent diffuser de façon passive au travers des membranes microbiennes et, après être entrés dans le cytoplasme, s'y dissocier

rapidement en protons et dérivés chargés pour lesquels les membranes sont imperméables. L'accumulation de protons peut diminuer le pH intracellulaire et avoir des effets importants sur les cellules (Presser *et al.*, 1997). De plus, les acides organiques peuvent se lier avec des composants intracellulaires. Ces deux actions des acides organiques vont alors perturber le métabolisme cellulaire des bactéries probiotiques (Korbekandi *et al.*, 2011).

La température d'entreposage

La viabilité des bactéries probiotiques durant l'entreposage est inversement liée à la température d'entreposage (Gardiner *et al.*, 2000). Les aliments contenant des cultures probiotiques doivent généralement être entreposés à des températures de 4-5°C (Mortazavian *et al.*, 2007). Toutefois, certaines souches de bifidobactéries ont une faible résistance aux basses températures de réfrigération (Korbekandi *et al.*, 2011). De plus, quand les cellules vivantes sont exposées à une diminution importante de température, elles subissent d'importants changements physiologiques tels qu'une diminution de leur fluidité membranaire et une stabilisation des structures secondaires de l'ARN et de l'ADN (van de Gutche *et al.*, 2002) qui nuiraient au bon fonctionnement des cellules. Toutefois, l'effet de la température d'entreposage est variable selon les souches utilisées.

Les étapes de congélation et de décongélation

Durant le processus de congélation d'un aliment contenant des cultures probiotiques comme des yogourts congelés ou de la crème glacée, des dommages aux parois ou aux membranes cellulaires peuvent survenir dû 1) aux stress mécaniques causés par des cristaux de glace formés dans le milieu externe et aussi à l'intérieur des cellules, 2) à un choc causé par la diminution de la température sur les cellules, 3) par une condensation (concentration) des solutés dans les milieux extra- ou intracellulaires, ce qui est toxique pour les cellules et aussi 4) par une déshydratation des cellules. Tous ces facteurs peuvent causer une réduction ou l'interruption des activités métaboliques qui sont nécessaires pour leur survie (Akin *et al.*, 2007; Davies et Obafemi, 1985; Gill, 2006; Jay *et al.*, 2005).

Durant la décongélation d'un produit contenant des bactéries probiotiques, les cellules subissent un stress osmotique (Jay *et al.*, 2005). Les concentrations importantes, dans le milieu entourant ces cellules, d'ions hydrogène, d'acides organiques, d'oxygène dissous et d'autres composés néfastes ont aussi une influence importante sur leur viabilité durant la décongélation (Mortazavian *et al.*, 2012).

Les ingrédients alimentaires

Les ingrédients alimentaires peuvent avoir un effet bénéfique, neutre ou néfaste sur la survie des microorganismes probiotiques (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002). Les additifs utilisés dans les industries alimentaires, comme par exemple, les agents aromatisants, le sel et le sucre peuvent avoir des effets drastiques sur la croissance et la viabilité de bactéries probiotiques dans les produits (Vinderola *et al.*, 2002). Par exemple, ces microorganismes peuvent être exposés à un stress osmotique important lorsque le produit dans lequel ils sont incorporés contient une quantité importante de sel ou de sucre. Certains additifs tels que les vitamines, de l'extrait de levure, certains minéraux ou des composés antioxydants auraient plutôt des effets positifs sur la survie des microorganismes probiotiques durant l'entreposage (Mohammadi *et al.*, 2011).

Le potentiel d'oxydo-réduction

Le potentiel d'oxydo-réduction d'un milieu représente la capacité de ce milieu à céder des électrons (milieu réducteur) ou à capter des électrons (milieu oxydant). Les états oxydés ou réduits se caractérisent, respectivement, par une valeur positive ou négative du potentiel d'oxydo-réduction (Béal *et al.*, 2008). Les milieux ayant un potentiel d'oxydo-réduction négatif sont plus favorables au développement de bactéries anaérobies strictes ou facultatives alors que ceux ayant un potentiel d'oxydo-réduction positif sont favorables au développement des bactéries aérobies (Brown et Emberger, 1980). De plus, Bolduc *et al.* (2006) ont montré une augmentation de la survie de bactéries probiotiques durant l'entreposage dans des laits dont le potentiel d'oxydo-réduction avait été réduit.

L'oxygène

Les bactéries probiotiques incorporées dans les aliments sont exposées à l'oxygène contenu naturellement dans ces aliments ainsi qu'à l'oxygène incorporé durant le processus de fabrication, tel que durant le brassage. Les lactobacilles sont soit anaérobies facultatifs ou soit anaérobies tandis que les bifidobactéries sont anaérobies strictes (Holzapfel *et al.*, 1998; De Vuyst, 2000). Plusieurs études ont montré une viabilité réduite, due à la présence d'oxygène, de certaines souches de bactéries probiotiques lorsqu'incorporées dans du yogourt (Hull *et al.*, 1984; Talwalkar et Kailasapathy, 2003b; Dave et Shah, 1997 b et c), dans du lait non fermenté (Klaver *et al.*, 1993; Bolduc *et al.*, 2006), dans du lait fermenté (Ebel *et al.*, 2011, Odakami *et al.*, 2011) et dans du fromage (Fortin *et al.*, 2011). Toutefois, le degré de sensibilité varie considérablement entre les différentes espèces et souches bactériennes (Talwalkar et Kailasapathy, 2004a).

L'oxygène affecte les cultures probiotiques qui y sont sensibles de trois façons: 1) l'oxygène est toxique de façon directe pour certaines cellules, 2) les radicaux produits lors de l'oxydation de composés comme les gras sont toxiques pour les cellules probiotiques et 3) en présence d'oxygène et tout spécialement dans les produits laitiers, certaines cultures telles que les lactobacilles produisent du peroxyde d'hydrogène, lequel est toxique pour les cultures probiotiques (Korbekandi *et al.*, 2011; Tamime *et al.*, 2005). Les bactéries subissent donc un stress oxydatif. Cet aspect sera développé plus en détails à la section 1.3.

1.2.3.2 Facteurs affectant la viabilité des bactéries probiotiques durant le passage dans le tractus gastrointestinal

Pour exercer leurs effets bénéfiques, au moins 10^6 à 10^7 ufc/mL bactéries viables doivent atteindre l'intestin (Gomes et Malcata, 1999; Shin *et al.*, 2000). Toutefois, après ingestion, les microorganismes probiotiques sont exposés à une multitude de facteurs de stress successifs qui influencent leur survie durant leur passage dans le tractus gastrointestinal (Marteau *et al.*, 1993). Dans l'estomac, les microorganismes sont exposés à l'acide

gastrique (Lee et Salminen, 1995) et à l'activité protéolytique de la pepsine (Olejnik *et al.*, 2005), ce qui peut résulter en une perte importante de leur viabilité. Ensuite, les bactéries probiotiques doivent survivre à l'exposition aux sels biliaires (Hofmann *et al.*, 1983; Lee et Salminen, 1995) et à la pancréatine. Les sels biliaires peuvent réduire la survie des bactéries par une destruction de leurs membranes cellulaires dont les composés majeurs sont des lipides et des acides gras. Les modifications résultantes peuvent avoir non seulement des effets sur la perméabilité cellulaire et la viabilité des bactéries mais aussi sur les interactions entre les membranes bactériennes et l'environnement (Gilliland, 1987; Gilliland *et al.*, 1984). Les sels biliaires peuvent de plus, affecter la stabilité des macromolécules dans les microorganismes tels que l'ADN et causer la dénaturation des protéines (Bernstein *et al.*, 1999, Kandell et Berntein, 1991). La présence d'immunoglobulines, de lysozyme (Marteau, 2006) et de composés antibactériens générés lors de la digestion des aliments, comme certains peptides et acides gras libres, peuvent aussi avoir un effet sur la viabilité des bactéries.

Parmi tous les facteurs affectant la viabilité des bactéries, l'exposition à l'oxygène pouvant causer un stress oxydatif aux bactéries qui y sont sensibles est d'une grande importance. La prochaine section sera donc consacrée au stress oxydatif.

1.3 Stress oxydatif

Afin de mieux comprendre les effets de l'exposition à l'oxygène sur les bactéries, la première partie de cette section présente la structure de la membrane cytoplasmique des bactéries ainsi que ses fonctions. Ensuite, la production de dérivés réactifs de l'oxygène, leurs effets sur les bactéries et la réponse physiologique des bactéries exposées à ces dérivés seront décrits.

1.3.1 Structure et fonctions de la membrane cytoplasmique chez les bactéries Gram-positives

Les membranes bactériennes sont composées d'une bicouche de phospholipides (~25%) dans laquelle sont insérées des protéines et des glycoprotéines (~75%, Figure 1.2a; Guidotti, 1972). La membrane cytoplasmique peut aussi contenir des sphingo- et glycérophospholipides et des lipides neutres (Ratledge et Wilkinson, 1988). Les phospholipides des membranes sont constitués d'un glycérol dont deux des trois groupements hydroxyls sont remplacés par des acides gras et le troisième par un groupement phosphate. Ces phospholipides sont amphiphiles, c'est-à-dire qu'ils sont constitués d'une tête polaire hydrophile et d'une partie hydrophobe (acides gras; Denich *et al.*, 2003).

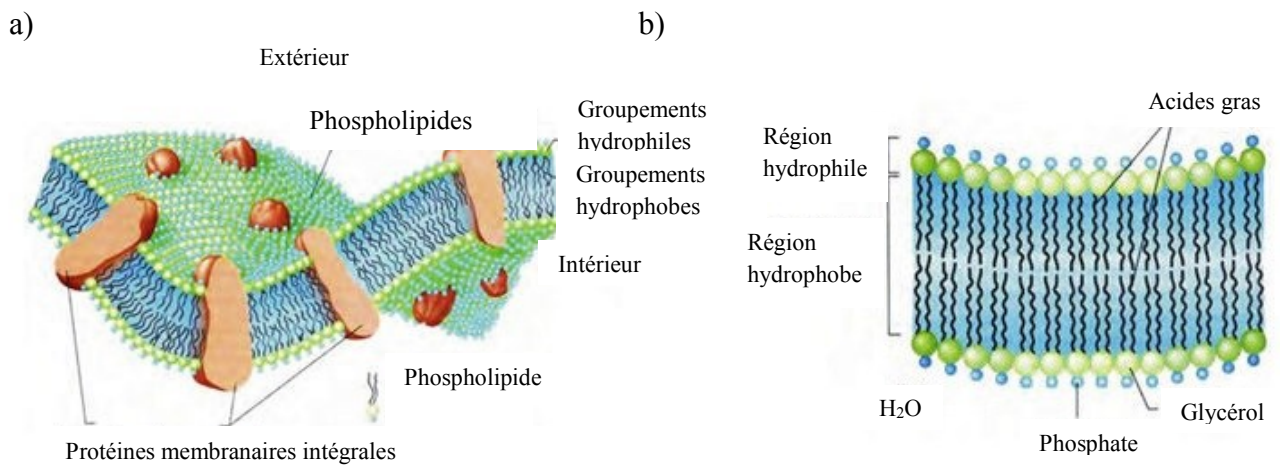


Figure 1.2: Représentation d'une membrane cytoplasmique complète a) et de la bicouche lipidique b). (tirée et traduite de real.simplescience.files.wordpress.com)

Dans la membrane, les acides gras sont face à face à l'intérieur de la bicouche (Figure 1.2b) tandis que les têtes hydrophiles des phospholipides demeurent exposées à l'environnement aqueux externe (Brock et Madigan, 1988).

Le modèle de la structure membranaire le mieux accepté est celui «en mosaïque fluide» décrit par Singer et Nicolson (1972). Ce modèle distingue deux types de protéines, les protéines périphériques ou extrinsèques et les protéines intrinsèques (Prescott *et al.*, 2003). Les protéines extrinsèques s'associent à la membrane en se liant à sa surface avec les groupements des têtes des lipides ou avec des protéines intrinsèques par interactions

électrostatiques et liaisons hydrogène (Voet et Voet, 2005). Les protéines intrinsèques sont, toutefois, fortement liées aux membranes par des forces hydrophobes. Elles sont amphiphiles comme les phospholipides de la bicouche (Voet et Voet, 2005). Selon le modèle de la mosaïque fluide, les protéines intrinsèques diffusent latéralement et librement dans la matrice lipidique, à moins que leurs déplacements ne soient gênés par des associations avec d'autres constituants cellulaires (Voet et Voet, 2005).

Les membranes plasmiques des cellules bactériennes doivent remplir plusieurs rôles. Elles servent de barrière sélective en contrôlant l'entrée et la sortie des nutriments, des déchets, des ions... (Voet et Voet, 2005). Des molécules neutres (O_2 , H_2O et CO_2) peuvent diffuser à travers la membrane (Denich *et al.*, 2003). La membrane plasmique bactérienne contient, de plus, des molécules réceptrices spéciales qui permettent à la bactérie de détecter et de répondre à des substances chimiques présentes dans son environnement (Prescott *et al.*, 2003). Toutefois, pour assurer ses fonctions de barrière sélective, la membrane bactérienne doit conserver sa fluidité (Russell, 1989), c'est-à-dire la capacité de mouvement des constituants de la membrane (lipides et protéines) dans la bicouche lipidique. Cette fluidité membranaire est donc essentielle pour assurer la survie et la croissance des bactéries (Russell, 1989). En effet, lorsqu'une membrane se solidifie, sa perméabilité change et les protéines enzymatiques dans cette membrane peuvent devenir inactives. Toutefois, une membrane trop fluide ne permet pas aux protéines d'exercer leurs fonctions adéquatement (Campbell et Reece, 2008).

Sous les conditions physiologiques normales, la majorité des phospholipides de la bicouche sont sous forme liquide-cristalline (Figure 1.3), ce qui est considéré comme étant l'état biologiquement actif de la membrane (Cullis *et al.*, 1985). Dans cet état, les molécules lipidiques dans leur ensemble, ainsi que leurs queues non polaires, sont très mobiles dans le plan de la bicouche. S'il y a diminution de la température du milieu dans lequel se trouvent les bactéries sous une température de transition spécifique à chaque type de membrane, la bicouche lipidique subit un changement de phase dans laquelle les molécules lipidiques sont beaucoup mieux ordonnées. La bicouche prend alors une consistance solide de type gel et perd alors son caractère fluide (Voet et Voet, 2005).

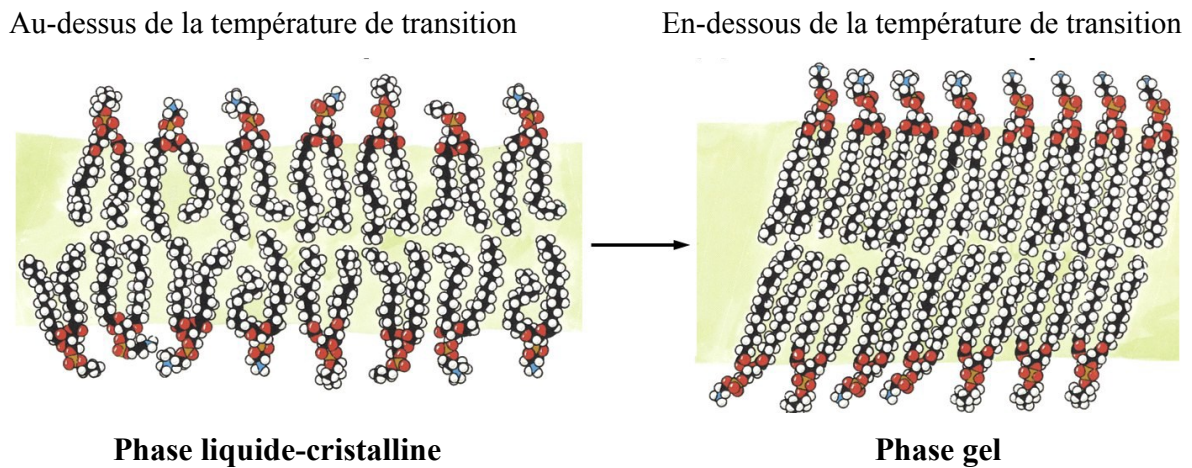


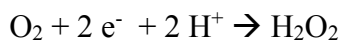
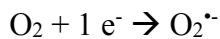
Figure 1.3: Structure représentative d'une bicouche lipidique à une température au-dessus et en-dessous de sa température de transition (Voet et Voet, 2005).

La température à laquelle la membrane passe de la phase gel à la phase liquide-cristalline dépend du type de lipides qui la constitue. Plus elle est riche en phospholipides avec des chaînes hydrocarbonées insaturées, plus sa température de transition est basse (Campbell et Reece, 2008). L'augmentation du ratio d'acides gras à configuration cis par rapport à ceux de configuration trans ou d'acides gras branchés de configuration anteso par rapport à ceux iso dans les membranes sont tous des facteurs qui diminuent aussi la température de transition (Russell, 1989). La température de transition d'une bicouche lipidique augmente cependant avec la longueur de la chaîne des résidus d'acides gras qui la composent (Campbell et Reece, 2008). En plus de la température, l'exposition des bactéries à certains stress tels qu'un traitement de chaleur ou une exposition aux basses températures peut aussi avoir un effet sur leur fluidité membranaire (Serrazanetti *et al.*, 2009). Les bactéries peuvent modifier, par des réactions biochimiques, la composition et la structure des acides gras de leurs membranes pour maintenir leur fluidité membranaire à un niveau assurant leur bon fonctionnement (Denich *et al.*, 2003). Par contre, si les effets du stress imposé sont trop importants, il peut y avoir, entre autres, changement de la fluidité des membranes qui peut être néfaste pour ces cellules bactériennes.

Le stress oxydatif est aussi un facteur pouvant avoir des effets importants sur les membranes bactériennes.

1.3.2 Les dérivés réactifs de l'oxygène et leurs effets sur les membranes bactériennes

En général, les bactéries lactiques réagissent avec l'oxygène et les conséquences peuvent être bénéfiques ou néfastes. Ces bactéries enlèvent l'oxygène des solutions lorsque leur environnement contient un substrat qu'elles peuvent oxyder. Les réactions d'oxydation-réduction qui s'en suivent impliquent un transfert de 1, 2 ou 4 électrons à la molécule d'oxygène selon les réactions suivantes (Condon, 1987):



Au contraire des bactéries aérobies qui réduisent complètement l'oxygène en eau, les bactéries anaérobies facultatives ou anaérobies ont un système permettant la réduction de l'oxygène qui est soit réduit ou complètement absent (Talwalkar et Kailasapathy, 2004b). Une réduction incomplète de l'oxygène génère des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) tels que l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot -}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 ; Figure 1.4). Ces composés peuvent avoir des effets négatifs sur l'ADN, l'ARN, les lipides membranaires et les protéines (Cabiscol *et al.*, 2000) des microorganismes. Le stress oxydatif chez les bactéries est initié par ces DRO.

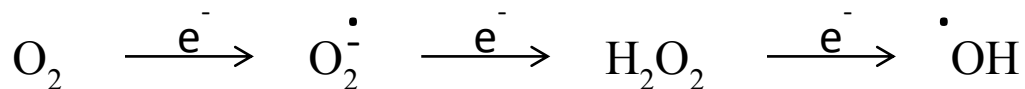


Figure 1.4: Oxygène (O_2) et dérivés réactifs de l'oxygène: l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot -}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 ; Yamamoto *et al.*, 2011).

La première réduction de l'oxygène par le gain d'un électron génère l'anion superoxyde (Figure 1.4). Ce radical a une faible réactivité avec la majorité des biomolécules et est un faible oxydant à pH neutre. Il ne passe pas au travers des membranes et ne cause pas la peroxydation des lipides des constituants lipophiles des cellules. La dismutation de l'anion superoxyde génère du peroxyde d'hydrogène. À pH neutre ou acide, cette molécule ne possède aucune charge et peut donc pénétrer dans les membranes et diffuser à travers la cellule (Sigler *et al.*, 1999). Même si le H₂O₂ est la molécule la plus stable parmi les DRO, sa dissociation et son interaction avec les composés cellulaires peuvent former des peroxydes organiques lesquels peuvent initier une chaîne de réaction d'oxydation (Halliwell et Gutteridge, 1984). Le troisième DRO pouvant être produit, le radical hydroxyle, est le DRO le plus dommageable pour les bactéries. Il endommage les bases de l'ADN, conduit à la carbonylation des protéines et à la peroxydation lipidique (Cabiscol *et al.*, 2000; Mostertz et Hecker, 2003). Les réactions d'oxydation des lipides par les DRO entraînent couramment la formation de nouveaux DRO provoquant une spirale oxydative qui est souvent mortelle pour les cellules (Campbell et Mathieu, 1995).

Comme mentionné précédemment, les DRO peuvent endommager les phospholipides et les protéines membranaires mais l'oxydation des lipides est considérée comme étant la plus dommageable pour les cellules (Sigler *et al.*, 1999). Cette oxydation cause non seulement des dommages aux membranes mais multiplie l'effet toxique des DRO en générant une quantité importante de radicaux secondaires tels que les radicaux peroxydes et le radical alkoxyde. Les DRO et les radicaux secondaires peuvent dégrader les molécules d'acides gras de la bicouche lipidique en coupant des liens C-C produisant ainsi des molécules plus courtes. Durant cette peroxydation lipidique, il y a génération d'alcanes, de cétones, d'oxiranes et d'aldéhydes qui augmentent le nombre de groupes polaires des chaînes d'acides gras. La fluidité membranaire change alors et la cellule n'est désormais plus capable de contrôler complètement sa perméabilité. La membrane perd son intégrité structurale et le gradient de protons électrochimique transmembranaire est partiellement ou complètement dissipé. Cela peut conduire ultimement à la mort cellulaire (Sigler *et al.*, 1999).

Les cellules vivantes des procaryotes ont développé des systèmes plus ou moins efficaces pour faire face aux effets de l'oxygène qui vont soit prévenir la formation des DRO, soit les éliminer (par des dégradations enzymatiques ou par piégeage) ou soit réparer les dommages causés (van de Gutche *et al.*, 2002). Ces systèmes sont décrits dans la section suivante.

1.3.3 Systèmes de défense des bactéries

Lors d'une croissance en présence d'oxygène, les cellules bactériennes sont continuellement attaquées par des DRO. Plusieurs organismes ont développé différents systèmes de défense pour surmonter les effets de l'oxygène et des DRO. Des enzymes permettant un piégeage des DRO comme la superoxyde dismutase, la catalase et des peroxydases ainsi que des enzymes permettant de réparer les dommages causés par l'oxydation sont omniprésentes chez les organismes aérobies (Demple 1987; Storz *et al.* 1990; Yamamoto *et al.*, 2011). Au contraire, les bactéries anaérobies possèdent une quantité beaucoup moindre de ces enzymes et peuvent ne pas survivre à la formation endogène d'hydroperoxydes dont la formation est déclenchée par du Fe^{2+} via la réaction de Fenton (Dunning *et al.*, 1998). La majorité des bactéries lactiques ne produisent pas de catalase (Yamamoto *et al.*, 2011), une enzyme nécessaire à la décomposition du peroxyde d'hydrogène (da Cruz *et al.*, 2007) et certaines ne produisent pas non plus l'enzyme superoxyde dismutase (Yamamoto *et al.*, 2011), qui est utilisée pour limiter les effets négatifs des radicaux superoxydes (Oberg *et al.*, 2011). Toutefois, une réduction non enzymatique des radicaux superoxydes par des ions manganèse a été rapportée pour certaines bactéries lactiques et a été bien caractérisée pour la souche *Lactobacillus plantarum* (Bruno-Bárcena *et al.*, 2004). De plus, les enzymes NADH oxydase et NADH peroxydase sont présentes chez plusieurs souches de bactéries lactiques dont les lactobacilles (Sakamoto et Komagata, 1996). En présence d'oxygène, ces enzymes catalysent la réduction des molécules d'oxygène en peroxyde d'hydrogène et décomposent ce dernier en H_2O (Condon, 1987). La concentration en H_2O_2 formé en conditions aérobies est cependant variable et dépend de l'activité des enzymes NADH oxydase et NADH peroxydase (Anders *et al.*, 1970). Il y a stress oxydatif pour les bactéries lorsque le taux de génération des radicaux libres est supérieur à leur taux de détoxification (Lushchak, 2001).

Le Tableau 1 présente des exemples de réactions impliquant l'oxygène ou les DRO et qui sont catalysées par certaines enzymes bactériennes décrites ci dessus (De Angelis et Gobetti, 2004).

Tableau 1.1: Réactions impliquant l'oxygène ou les dérivés réactifs de l'oxygène qui sont catalysées par certaines enzymes de souches de *Lactobacillus*.

Enzymes	Réactions
NADH: H ₂ O ₂ oxydase	$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$
NADH: H ₂ O oxydase	$2 \text{NADH} + 2\text{H}^+ + \text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$
NADH: peroxydase	$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{NAD}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$
Superoxyde dismutase	$\text{O}_2^{\bullet -} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
Catalase	$2 \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Malgré les systèmes de défense existants, l'exposition à l'oxygène cause une inhibition de la croissance partielle ou complète pour certaines souches de bactéries probiotiques ou une diminution marquée de leur viabilité. Des moyens de protection doivent donc être employés pour limiter les effets de l'oxygène sur ces bactéries.

1.4 Moyens potentiels de protection des bactéries probiotiques contre les effets de l'oxygène

Plusieurs moyens ont été proposés pour diminuer les effets de l'exposition à l'oxygène sur les bactéries sensibles à ce composé. Parmi ceux-ci, on retrouve des méthodes basées sur une limitation de la quantité d'oxygène dans les produits alimentaires ou permettant une diminution du potentiel d'oxydo-réduction de ces produits, l'ajout de composés ayant des capacités antioxydantes et finalement la microencapsulation.

1.4.1 Limitation de la quantité d'oxygène dans les produits alimentaires

La fermentation sous vide (pour les produits fermentés), l'emballage sous vide ou l'utilisation de matériaux d'emballage ayant une faible perméabilité à l'oxygène, le contrôle du procédé de fabrication pour minimiser l'entrée d'oxygène dissous dans le produit (Dave et Shah, 1997a; Korbekandi *et al.*, 2011; Shah, 2000; Talwalkar *et al.*, 2004) et la désaération (Klaver *et al.*, 1993) sont des méthodes pouvant limiter la quantité d'oxygène dans les produits alimentaires. Le principe de ces méthodes est de diminuer la quantité d'oxygène qui va se trouver en contact avec les bactéries probiotiques. Elles impliquent toutefois le changement des procédés de fabrication ou d'emballage des produits alimentaires dans lesquels les cultures probiotiques vont être incorporées, ce qui résulte en des coûts supplémentaires. La co-cultivation de bifidobactéries avec une souche de *Lactococcus lactis* dans du lait fermenté (Odakami *et al.*, 2011) ou l'addition d'une enzyme, la glucose oxidase, dans des yogourts contenant des bifidobactéries (Cruz *et al.*, 2010) ont aussi permis de diminuer la présence d'oxygène dissous dans les produits et ainsi d'augmenter la survie des cultures au cours de l'entreposage. De plus, plusieurs cultures lactiques présentent des activités antioxydantes (Lin et Yen, 1999) qui pourraient bénéficier à des co-cultures de bactéries sensibles à l'oxygène.

1.4.2 Diminution du potentiel d'oxydo-réduction par des approches technologiques

Une diminution du potentiel d'oxydo-réduction d'un aliment peut être accomplie par un procédé d'électro-réduction (Bolduc *et al.*, 2006), par un traitement de chaleur spécifique (Mortazavian *et al.*, 2006) ou par l'utilisation de gaz (Ebel *et al.*, 2011). L'ajout d'une étape dans le procédé de fabrication des produits alimentaires pour la diminution du potentiel d'oxydo-réduction des produits entraînerait toutefois des coûts supplémentaires. Des molécules réductrices comme l'acide ascorbique et la cystéine (Dave et Shah, 1997 a et b) peuvent aussi être ajoutées aux produits alimentaires. Ces molécules très réductrices réagissent avec l'oxygène avant que celui-ci ait pu affecter les probiotiques (Mills *et al.*, 2011). Ces dernières molécules ont cependant eu des effets négatifs sur les yogourts dans lesquels elles ont été incorporées (Dave et Shah, 1997 b et c).

1.4.3 Ajout de composés antioxydants

Une des façons les plus connues pour diminuer les effets négatifs de l'oxygène sur la croissance et la viabilité des cultures probiotiques est l'ajout de composés antioxydants (Champagne *et al.*, 2005).

1.4.3.1 Définition et mécanismes d'action

Les antioxydants sont des substances qui vont retarder ou diminuer le taux d'oxydation d'autres molécules (Nawar, 1985). Ces substances peuvent agir comme agents antioxydants de trois façons:

- 1) en terminant la chaîne de réaction induite par les réactions d'oxydation produisant des radicaux libres. Les composés antioxydants peuvent terminer cette chaîne en échangeant un ou plusieurs protons avec un radical libre ou un radical peroxyde libre.
- 2) en diminuant ou bloquant la formation de radicaux libres par chélation de métaux.
- 3) en diminuant, par piégeage, la concentration d'oxygène réactive ou de DRO (Bazinet et Doyen, 2015).

Les composés antioxydants les plus connus sont la β -carotène (Provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) et les composés phénoliques (Popovici *et al.*, 2009). Les catéchines du thé vert, qui sont des composés phénoliques, ont des propriétés antioxydantes plus importantes que les vitamines et provitamine nommées précédemment (Graham, 1992; Hara, 2001). Leurs propriétés et mécanismes d'action sont décrits plus en détails dans la section suivante.

1.4.3.2 Catéchines du thé vert

Les catéchines majeures retrouvées dans le thé vert sont l'(-)-épigallocatechine gallate, l'(-)-épigallocatechine, l'(-)-épicatéchine et l'(-)-épicatéchine gallate. Leurs structures chimiques ainsi que celles des autres catéchines du thé vert sont présentées à la Figure 1.5.

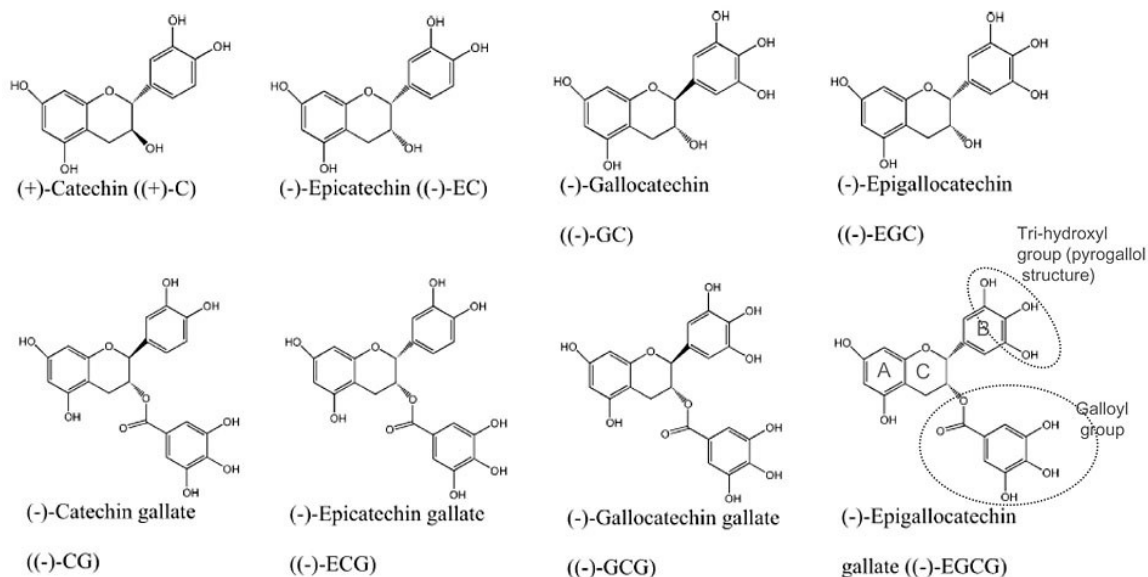


Figure 1.5: Structures chimiques de différentes catéchines retrouvées dans le thé vert (tirée de Mandel *et al.*, 2012).

Les catéchines du thé vert ont des propriétés antioxydantes importantes dues à leur habilité à neutraliser les radicaux libres en donnant des atomes d'hydrogène (Figure 1.6) provenant de leur groupement phénolique (Mendoza-Wilson et Glossman-Mitnik, 2006).

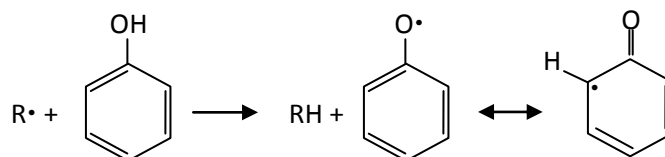


Figure 1.6: Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques: Le composé phénolique transfère un proton au radical libre et le neutralise (Tirée de Bazinet et Doyen, 2015).

Les catéchines vont interagir avec les DRO tels que le radical superoxyde, le radical hydroxyle et des espèces réactives de l'azote (Farooqui, 2012). De plus, les catéchines

peuvent piéger les radicaux peroxydes, supprimant ainsi les réactions en chaîne des radicaux libres et terminant la peroxydation lipidique (Terao *et al.*, 1994). Elles agissent aussi *in vitro* en séquestrant les ions métalliques tels les ions ferreux (Wiseman *et al.*, 1997), qui sont des catalyseurs de plusieurs processus menant à l'apparition de radicaux (Saija *et al.*, 1995).

L'ajout de catéchines pour la protection de bactéries probiotiques sensibles à l'oxygène comporterait de nombreux avantages. En plus de leurs importantes capacités antioxydantes, les catéchines peuvent diminuer le potentiel d'oxydo-réduction de milieux comme cela a été démontré avec une solution tampon (Rozoy *et al.*, 2013a) ou du lactosérum lors de la fabrication de fromage contenant des extraits de thé vert (Giroux *et al.*, 2013). Les effets santé potentiels des catéchines ainsi que leurs actions de stimulation de bactéries bénéfiques et d'inhibition de microorganismes pathogènes font aussi parties des avantages reliés à l'utilisation des catéchines pour diminuer les effets de l'oxygène sur des souches bactériennes probiotiques. En effet, les catéchines du thé vert auraient, entre autres, des propriétés anti-inflammatoires, vasodilatatrices, de neuroprotection et de prévention contre le cancer (Kuzuhara *et al.*, 2008; Zaveri, 2006). Généralement les effets bénéfiques sont observés avec des concentrations en catéchines entre 10 et 100 μM (Liao *et al.*, 2001). Lors d'études *in vivo* réalisées avec des humains, la croissance de cellules de *Bifidobacterium* dans le microbiote intestinal a été stimulé par une ingestion de thé vert (Jin *et al.*, 2012) ou de polyphénols du thé vert (Okubo *et al.*, 1992). De plus, la croissance d'une souche de *Lactobacillus acidophilus* (Kottol *et al.*, 2014) et la production de biomasse d'une souche de *Lactobacillus casei* (Vodnar et Socaciu, 2012) ont été stimulées, lors d'essais *in vitro*, par ajout de catéchines ou d'un extrait de thé vert dans un milieu de culture. Toutefois, la concentration utilisée peut avoir un impact important sur la croissance des bactéries. Par exemple, Kottol *et al.* (2014) ont obtenu des populations plus importantes de *Lactobacillus acidophilus* lors d'une croissance dans un milieu de culture contenant 1% de catéchines que dans le même milieu mais contenant 5% de catéchines. Au contraire, une augmentation de la concentration en catéchines de 10 μM à 400 μM a permis la production d'une plus grande biomasse de *Lactobacillus casei* (Duda-Chodak *et al.*, 2008). Les catéchines ont aussi eu un effet inhibiteur pour la croissance de microorganismes pathogènes dont

Staphylococcus aureus, *Streptococcus pyogenes* (Su *et al.*, 2008), *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* (Lee *et al.*, 2006), *E. coli* (Gahlaut et Dabur, 2014; Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2007), *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* (Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2007), *H. pylori*, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* (Si *et al.*, 2006), *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* et *Candida albicans* (Almajano *et al.*, 2008). Les catéchines pourraient donc servir d'inhibiteur de croissance de microorganismes pathogènes en plus de diminuer les effets néfastes de l'oxygène sur les bactéries bénéfiques.

Les catéchines du thé vert pourraient aussi avoir un effet bénéfique sur la survie des bactéries probiotiques au cours de l'entreposage dans les aliments en contenant. En effet, la survie des souches probiotiques *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium lactis* et *Lactobacillus paracasei* incorporées à des jus de fruits a été améliorée par ajout, dans les jus, d'un extrait de thé vert riche en catéchines à une concentration de 0,001% (Shah *et al.*, 2010). Une augmentation de la survie de bifidobactéries a aussi été obtenue par ajout ou de d'une infusion de thé vert (concentrations de 5 à 15%; Najgebauer-Lejko, 2014) dans du yogourt. Toutefois, les composés phénoliques, tels que les catéchines du thé vert, ont une grande affinité pour les protéines et l'ajout de ces composés dans des aliments contenant des protéines peut causer une modification de leur structure (Najgebauer-Lejko *et al.*, 2014). Un changement de la couleur de yogourts (Najgebauer-Lejko *et al.*, 2014) et de laits de soya fermentés (Zhao et Shah, 2014a) a aussi été observé suite à un enrichissement avec de l'extrait de thé vert.

Une autre stratégie susceptible de limiter les effets de l'oxygène sur les bactéries probiotiques qui y sont sensibles est la microencapsulation.

1.4.4 La microencapsulation

Dans les prochaines sections, la microencapsulation sera définie et les différents procédés de microencapsulation existants ainsi que les matériaux d'enrobage disponibles pour la protection des bactéries probiotiques seront présentés.

1.4.4.1 Définition et buts de la microencapsulation

La microencapsulation est un procédé physicochimique et mécanique qui consiste à enrober des composés sensibles, comme des bactéries lactiques, par une couche de matériel d'enrobage. 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 (Shahidi et Han, 1993) 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 (Talwalkar et Kailasapathy, 2003b et 2004b). 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 (Talwalkar et Kailasapathy, 2003b). Mc 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. L'avantage d'utiliser la microencapsulation pour la protection des bactéries sensibles à l'oxygène est que cette méthode pourrait limiter les effets néfastes de l'exposition à l'oxygène sur ces bactéries tout en permettant la diffusion des nutriments à l'intérieur et à l'extérieur de la matrice (Talwalkar et Kailasapathy, 2004b) rendant possible la conservation de leur viabilité. 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 (Manojlović *et al.*, 2010).

Comme la capacité des probiotiques à survivre et se multiplier chez l'hôte influence fortement leurs effets bénéfiques pour la santé, la microencapsulation peut, en plus de la protection contre les effets de l'oxygène durant leur production et entreposage, être réalisée pour permettre la libération dans les intestins de microorganismes viables et actifs métaboliquement (Picot et Lacroix, 2004). En effet, la couche enveloppant les bactéries peut être développée pour se dégrader dans des régions spécifiques du corps (Anal et Singh, 2007). Des bactéries probiotiques libérées de façon spécifique dans l'iléon favoriseraient les réactions immunitaires. La livraison de ces microorganismes dans le côlon pourrait aussi être très avantageuse pour la santé des humains. Certaines études ont démontré que les bactéries probiotiques, principalement les lactobacilles et les bifidobactéries, peuvent

prévenir ou minimiser l'adhésion des microorganismes pathogènes (Bernet *et al.*, 1994; Neeser *et al.*, 1989) dans le côlon. Les bactéries probiotiques et leurs produits pourraient aussi avoir une activité anti-inflammatoire directe sur les cellules épithéliales du côlon (Neish, 2009). De plus, les interactions de certains lactobacilles dans le côlon peuvent moduler les fonctions immunitaires qui sont différentes de celles survenant dans l'iléon (Zareie *et al.*, 2006).

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 gastrointestinal (Chávarri *et al.*, 2012; Riaz et Masud, 2013). 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. Les principaux procédés de microencapsulation de bactéries probiotiques ainsi que les matrices d'enrobage les plus utilisées seront présentés dans les sections suivantes.

1.4.4.2 Les procédés de microencapsulation

1.4.4.2.1 Procédés pouvant être utilisés pour la microencapsulation des bactéries

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; Gibbs *et al.*, 1999), l'émulsion (Krasaekoopt *et al.*, 2004) et de l'émulsion avec gélification interne (Larisch *et al.*, 1994; Zou *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012, González *et al.*, 2013). Les principaux principes de ces procédés ainsi que leurs avantages et leurs inconvénients sont décrits au Tableau 1.2.

Tableau 1.2: Principaux principes, avantages et inconvénients de différents procédés pouvant être utilisés pour la microencapsulation de bactéries (adapté de Burgain *et al.*, 2011; Champagne et Fustier, 2007; Chan *et al.*, 2006; Poncelet *et al.*, 1995; Riaz et Masud, 2013).

Procédés de microencapsulation	Principe	Avantages	Inconvénients
Extrusion	Le matériel d'encapsulation contenant les bactéries est déposé goutte à goutte dans une solution de chlorure de calcium qui va permettre la gélification des gouttelettes.	<ul style="list-style-type: none"> - Simplicité - Faibles coûts - Hauts taux de viabilité des bactéries 	<ul style="list-style-type: none"> - Production de particules de tailles importantes - Formation lente des particules
Séchage par atomisation	Une suspension liquide de composés à encapsuler est pulvérisée en fines gouttelettes dans une enceinte verticale. Les gouttelettes vont être séchées par un flux d'air chaud.	<ul style="list-style-type: none"> - Rapidité - Faibles coûts - Très reproductible 	<ul style="list-style-type: none"> - Hautes températures qui peuvent être néfastes pour les bactéries - Protection à court terme
Refroidissement par atomisation	Une matrice ayant un faible point de fusion et contenant les composés à encapsuler est vaporisée dans une enceinte. Un flux d'air froid va permettre la gélification des gouttelettes.	<ul style="list-style-type: none"> - Faibles coûts - Production possible de petites particules 	<ul style="list-style-type: none"> - Procédé difficile à maîtriser
Enrobage sur lit fluidisé	Le matériel à encapsuler, sous forme solide, est maintenu en mouvement par injection d'air. Le matériel d'encapsulation, vaporisé sur le matériel à encapsuler, se solidifie pour faire une couche à la surface.	<ul style="list-style-type: none"> - Protection élevée si courte (quelques jours) exposition à différents stress - Plusieurs couches de matériel d'enrobage peuvent être ajoutées 	<ul style="list-style-type: none"> - Libération lente des cellules à de faibles températures
Émulsion/gélification externe	Le matériel d'encapsulation contenant les cellules est ajouté à une phase huileuse. Il y a gélification des gouttelettes formées par ajout de chlorure de calcium ou d'acide.	<ul style="list-style-type: none"> - Mise à l'échelle facile - Haut taux de survie des bactéries 	<ul style="list-style-type: none"> - Production de particules de taille et de forme très variables - Coûts élevés
Émulsion/gélification interne	Le matériel d'encapsulation contenant les cellules et des cristaux de calcium est ajouté à une phase huileuse. Il y a gélification des gouttelettes formées par ajout d'acide.	<ul style="list-style-type: none"> - Production de billes de petites tailles - La mise à l'échelle est presque illimitée 	<ul style="list-style-type: none"> - Production de particules de tailles variables si conditions non contrôlées rigoureusement - Production de particules poreuses

Les différents types de particules qui peuvent être produits selon le procédé utilisé sont soit de type réservoir, de type matrice ou de type matrice enrobée (Figure 1.7; Burgain *et al.*, 2011).

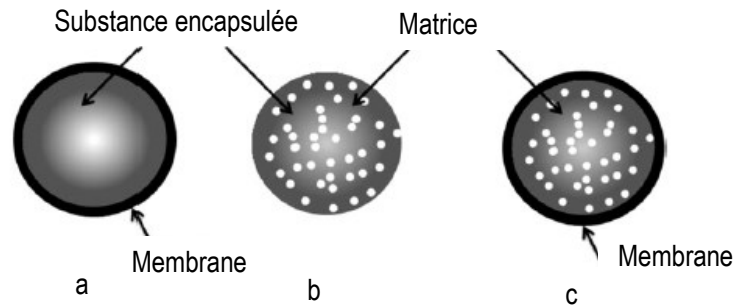


Figure 1.7: Représentation schématique des types de particules pouvant être formés par différents procédés d'encapsulation: a) le type réservoir, b) le type matrice et c) le type matrice enrobée (Tirée de Burgain *et al.*, 2011).

Les particules de type réservoir sont composées d'une enveloppe qui entoure le matériel à enrober tandis que dans les particules de type matrice, le composé à encapsuler est dispersé dans le matériel utilisé pour l'encapsulation et peut aussi être retrouvé à la surface des particules. La combinaison des deux types précédents donne lieu à un troisième type de particules soit le type matrice enrobée. Dans ce type de particules, la matrice dans laquelle se trouve le composé à encapsuler est recouverte par un enrobage (Zuidam et Shimoni, 2010). Les procédés de co-extrusion et d'enrobage sur lit fluidisé vont produire des particules de type réservoir (Figure 1.8) tandis que des particules de type matrice seront formées par les procédés de séchage par atomisation, d'extrusion et d'émulsion par gélification interne et externe (Burgain *et al.*, 2011). Des particules de type réservoir peuvent aussi, dans certaines conditions, être obtenues par émulsion (Zuidam et Shimoni, 2010).

Les procédés d'encapsulation vont aussi produire des particules de différentes tailles (Figure 1.8). La taille des particules obtenues peut être d'une grande importance si les bactéries probiotiques microencapsulées doivent être incorporées dans des aliments.

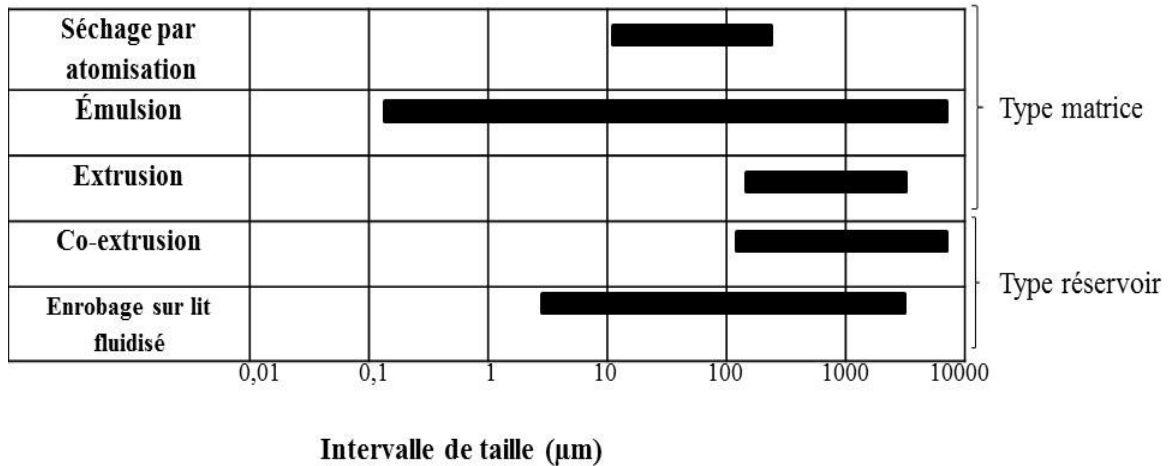


Figure 1.8: Intervalles de taille et type de particules pouvant être obtenus avec différents procédés permettant la microencapsulation de microorganismes (traduite de Burgain *et al.*, 2011).

Une taille optimale des billes entre 30 et 100 µm a été suggérée pour l'incorporation dans les produits alimentaires puisque qu'un diamètre plus petit résulte en une diminution de la protection des cellules et un diamètre plus élevé donne des défauts de texture et sensoriels aux produits (Sheu *et al.*, 1993). En effet, des particules aussi petites que 80 µm peuvent être détectées en bouche par les consommateurs (Capela *et al.*, 2007). De plus, la taille des particules incorporées a un effet sur l'apparence, la rhéologie et la stabilité d'un produit alimentaire contenant ces billes (Lesmes et McClements, 2009). La taille des particules obtenues par les différents procédés d'encapsulation peut aussi avoir un impact important sur la libération dans le tractus gastrointestinal des composés encapsulés. Des particules de petites tailles vont avoir un temps de résidence dans le tractus gastrointestinal plus important que des billes de grandes tailles (Chen *et al.*, 2006). L'utilisation d'un procédé de microencapsulation pouvant permettre la production de particules de petites tailles comporte donc plusieurs avantages. Parmi les différents procédés présentés, le séchage par atomisation, le refroidissement par atomisation,

l'enrobage sur lit fluidisé et l'émulsion peuvent permettre d'obtenir facilement des particules de petites tailles ($< 100 \mu\text{m}$). Cependant, au cours des processus de microencapsulation par séchage ou refroidissement par atomisation et par enrobage sur lit fluidisé, les bactéries sont exposées à des flux d'air importants ce qui peut être néfaste pour la survie des bactéries sensibles à l'oxygène. Au contraire, lors de la microencapsulation des bactéries par les procédés d'émulsion avec gélification externe ou interne, il y a émulsion des solutions à encapsuler dans de l'huile suivie d'une gélification. L'huile pourrait limiter les effets néfastes de l'oxygène pour les bactéries sensibles durant tout le procédé.

Lors des procédés de microencapsulation par émulsion avec gélification ionotropique, la gélification, qui se produit souvent par ajout d'une source de calcium, peut soit être interne ou externe. Il y a gélification externe par ajout de chlorure de calcium à l'étape finale du processus de microencapsulation provoquant ainsi la gélification du matériel d'encapsulation. Une difficulté rencontrée au cours de ce processus est que le chlorure de calcium est insoluble dans la phase huileuse (Poncelet *et al.*, 1995). L'ajout de chlorure de calcium peut aussi provoquer un bris partiel de l'émulsion résultant en une agrégation significative de plusieurs particules formées. De plus, une quantité relativement importante de sels de calcium est requise pour la production de particules suffisamment rigides (Chan *et al.*, 2002). Une alternative au procédé d'émulsion/gélification externe, l'émulsion avec gélification interne, a été développée par Lencki *et al.*, (1989) et permet une utilisation réduite des sels de calcium (Chan *et al.*, 2002). Ce procédé est décrit plus en détails dans la section suivante.

1.4.4.2.2 Microencapsulation par émulsion/gélification interne

Pour cette méthode d'encapsulation, des cristaux de calcium insolubles dispersés dans une solution aqueuse de polysaccharides (Liu *et al.*, 2002), de protéines (Chen et Subirade, 2009) ou d'un mélange polysaccharides-protéines (Chen et Subirade, 2006; 2007) servent de source interne de calcium pour la réaction de gélification. Ce mélange

est ensuite émulsionné dans une phase huileuse contenant un surfactant. L'emploi de surfactant est nécessaire pour diminuer la tension interfaciale entre les phases aqueuse et huileuse et pour stabiliser, contre la coalescence, les gouttelettes produites par émulsion (Liu *et al.*, 2004). Lorsque le pH est abaissé par ajout d'acide, le calcium est libéré provoquant la formation de gels (Liu *et al.*, 2002). Suite à une certaine période d'agitation permettant la gélification, du chlorure de calcium est ajouté pour briser l'émulsion et aider à la gélification. Les particules se retrouvent alors dans la phase aqueuse et peuvent être récupérées suite à l'enlèvement de l'huile qui se trouve à la surface de la phase aqueuse.

Cette méthode développée initialement par Lencki *et al.* (1989) a été utilisée avec succès pour encapsuler de l'ADN (Quong et Neufeld, 1998; Quong *et al.*, 1999), des cellules pancréatiques (Hoesli *et al.*, 2011), de l'hémoglobine (Liu *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2005), des levures (Song *et al.*, 2013), des médicaments (Ahmed *et al.*, 2013), des cellules bactériennes (Larisch *et al.*, 1994; Zou *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012, González *et al.*, 2013) et récemment pour l'encapsulation de cellules de *Streptomyces* (Cotârlet *et al.*, 2014) et de *Lactobacillus acidophilus* (Cai *et al.*, 2014). Cette méthode a aussi été employée pour l'encapsulation de catéchines du thé vert dans des billes de pectine (Lee *et al.*, 2009). L'encapsulation par émulsion/gélification interne serait avantageuse pour la microencapsulation dans des gels de petits composés hydrosolubles tels que la majorité des catéchines. En effet, lors de l'encapsulation de composés hydrosolubles par extrusion ou par émulsion avec gélification externe, la solution comprenant le matériel à encapsuler est extrudée goutte à goutte dans une solution de chlorure de calcium qui induit alors la gélification de ces gouttelettes (Liu *et al.*, 2007). Lors de l'étape de gélification, les composés hydrosolubles ont tendance à diffuser hors des particules formées résultant en de faibles rendements d'encapsulation de ces composés. Toutefois, lors d'une encapsulation par émulsion/gélification interne, la solution contenant le matériel à encapsuler est extrudée goutte à goutte dans de l'huile formant une émulsion eau dans huile (Lee *et al.*, 2006). Les composés hydrophiles restent dans la phase aqueuse et sont ensuite piégés dans la matrice suite à la gélification interne des gouttelettes. Lee *et al.* (2006) ont obtenu des rendements d'encapsulation de catéchines de 5-19% par émulsion avec gélification

externe et de 21-49% par émulsion/gélification interne. Les rendements d'encapsulation de petits composés hydrosolubles peuvent donc être augmentés par utilisation de cette méthode avec gélification interne. Cette méthode d'encapsulation comporte aussi plusieurs autres avantages. Puisqu'aucun réactif toxique n'est utilisé, cette méthode d'encapsulation peut être considérée pour des applications alimentaires et biologiques (Poncelet *et al.*, 1992). La taille des billes obtenues peut aussi être contrôlée facilement en contrôlant les conditions de production de l'émulsion eau dans l'huile (Poncelet, 2001). De plus, puisque la dispersion peut être produite dans des équipements de grands volumes, la mise à l'échelle de ce procédé est presque illimitée (Poncelet *et al.*, 1992).

Si le choix du procédé est crucial pour la microencapsulation de bactéries probiotiques, le choix du matériel d'enrobage l'est tout autant car ce matériel va avoir une grande influence sur la survie des bactéries autant durant l'entreposage des aliments dans lesquels elles sont incorporées ainsi que durant le passage dans le tractus gastrointestinal.

1.4.4.3 Matériaux d'enrobage

1.4.4.3.1 Matériaux pouvant être utilisés

Le Tableau 1.3 illustre différents matériaux pouvant être utilisés pour la microencapsulation de composés. Les polymères les plus utilisés pour la microencapsulation de bactéries probiotiques sont l'alginate, le carraghénane, l'amidon, la gomme arabique, la gélatine, les protéines du lactosérum et la pectine (Meiners, 2009). Puisque les composés utilisés pour la microencapsulation sont ingérés par les humains, ils doivent être non toxiques et être reconnus comme étant GRAS (generally recognised as safe; Kosaraju, 2005). Pour la microencapsulation de bactéries, le matériel d'enrobage doit aussi gélifier à une basse température et être résistant aux bas pH. En effet, la résistance du matériel d'encapsulation aux pH acides va influencer la survie des bactéries probiotiques au cours de leur passage dans le tractus gastrointestinal. Comme au moins 10^6 à 10^7 ufc/mL de bactéries viables doivent atteindre l'intestin pour que celles-ci

exercent leurs effets bénéfiques (Gomes et Malcata, 1999; Shin *et al.*, 2000), la résistance du matériel d'encapsulation aux bas pH de l'estomac est très importante.

Tableau 1.3: Matériaux utilisés pour la microencapsulation (basé sur Renard et Reddy, 2007).

Origine	Polysaccharides	Protéine	Lipide
Végétale	Amidon	Gluten (blé)	Huile de palme hydrogénée
	Cyclodextrine	Isolats (pois, soja, fève, lupin)	Huile de ricin hydrogénée
	Cellulose		Lécithine (soja)
	Pectine		Cires
	Gomme arabique		
	Gomme caroube		
Marine	Gomme guar		
	Carraghénane		
	Alginate		
Microbienne/animale	Agarose		
	Gomme xanthane	Caséines	Lécithine (œuf)
	Gomme gellane	Protéines de lactosérum	
	Dextrane	Gélatine	
	Chitosane	Collagène	
		Albumines	

La microencapsulation de bactéries probiotiques avec des protéines de lactosérum a permis l'augmentation de leur résistance aux pH acides (Picot et Lacroix, 2004). Toutefois, le coût des protéines laitières est relativement élevé. Idéalement, le matériel d'enrobage doit être de faible coût car un coût élevé va influencer directement la valeur du produit final (Serna-Cock et Vallejo-Castillo, 2013). Les matériaux de faibles coûts incluent les amidons, l'inuline, la pectine et la plupart des glucides (De Vos *et al.*, 2010). D'autres matériaux, tels que l'alginate et le tréhalose, sont souvent utilisés mais ils ont un coût plus élevé (Serna-Cock et Vallejo-Castillo, 2013).

Parmi tous les matériaux d'encapsulation cités au Tableau 1.3, la pectine a l'avantage de répondre à tous les critères mentionnés précédemment. En effet, la pectine est non toxique et est biodégradable (Shukla *et al.*, 2011). De plus, la pectine est grandement utilisée comme agent gélifiant et stabilisant dans les aliments (Bédié *et al.*, 2008) dont les produits laitiers (Arltoft *et al.*, 2008). Cependant, la pectine est hydrosoluble et ne peut être utilisée directement pour protéger des composés durant leur passage dans l'estomac et le petit intestin. Des formes moins solubles de la pectine doivent donc être employées à cet effet (Sinha et Kumria, 2001). La gélification de la pectine faiblement méthylée (LM) avec du calcium permet la production de gels de pectinate de calcium par gélification à froid et qui ont une solubilité réduite (Wellner *et al.*, 1998). Ces gels sont considérés comme d'excellents systèmes car ils ne sont pas toxiques, ils sont fortement biocompatibles, ils sont résistants à l'acide et la force des gels obtenus est importante (Sriamornsak, 1998; Atyabi *et al.*, 2005). Ces gels sont aussi stables en conditions alcalines (Kailasapathy, 2008). Dû à leur résistance aux bas pH, les gels de pectinate de calcium seraient de bons substrats pour la microencapsulation de bactéries probiotiques et pourraient ainsi améliorer leur survie lors d'un entreposage dans des produits alimentaires acides et lors de leur passage dans le tractus gastrointestinal. Une diminution de la perte de viabilité de cellules de *Lactobacillus casei* microencapsulées dans des gels de pectinate de calcium a été observée lors d'un entreposage dans du yogourt pendant 20 jours à 4°C (Sandoval et Castilla, 2010). L'enrobage de billes de pectinate de calcium avec des protéines de lactosérum a permis une survie de 100% de *Lactobacillus rhamnosus* lorsqu'exposées à des conditions gastriques simulées (Gerez *et al.*, 2012). Des hauts taux de survie de la souche *L. acidophilus* ont aussi été obtenus par microencapsulation dans des billes de pectinate de calcium exposées à des conditions gastrointestinales simulées. Toutefois, contrairement aux résultats obtenus par Gerez *et al.* (2012), l'enrobage des billes de pectine avec des protéines de lactosérum n'a pas permis d'augmenter la survie des bactéries exposées à des conditions gastrointestinales simulées (Gebara *et al.*, 2013). La microencapsulation de cellules de *Lactobacillus* dans des billes d'isolat de protéine de lactosérum, enrobées de pectine puis enrobées à nouveau de protéines de lactosérum a aussi permis une bonne survie bactérienne suite à une exposition à des fluides gastriques simulés (Doherty *et al.*, 2012). L'encapsulation des

bactéries dans des gels de pectinate de calcium permettrait donc de protéger les bactéries dans les conditions gastrointestinales. Un avantage supplémentaire à utiliser les gels de pectinate de calcium comme matériel d'encapsulation est que la pectine a des effets prébiotiques potentiels (Hasselwander, 2008). La pectine a permis de diminuer le taux de cholestérol sanguin chez de nombreux sujets (Sriamornsak, 2001) et aurait aussi des activités antitumorales (Maxwell *et al.*, 2012). Dans ce contexte, la pectine et les gels de pectinates de calcium sont décrits plus en détails à la section suivante.

1.4.4.3.2 La pectine et les gels de pectinate de calcium

La molécule de pectine peut être considérée comme une longue chaîne non ramifiée contenant 200 à 1000 unités d'acide galacturonique liées par un pont α -1,4-glucosidique (Figure 1.9). Des sucres neutres tels que le rhamnose, l'arabinose, le galactose et le xylose peuvent aussi être présents dans la molécule de pectine (Oakenfull, 1991).

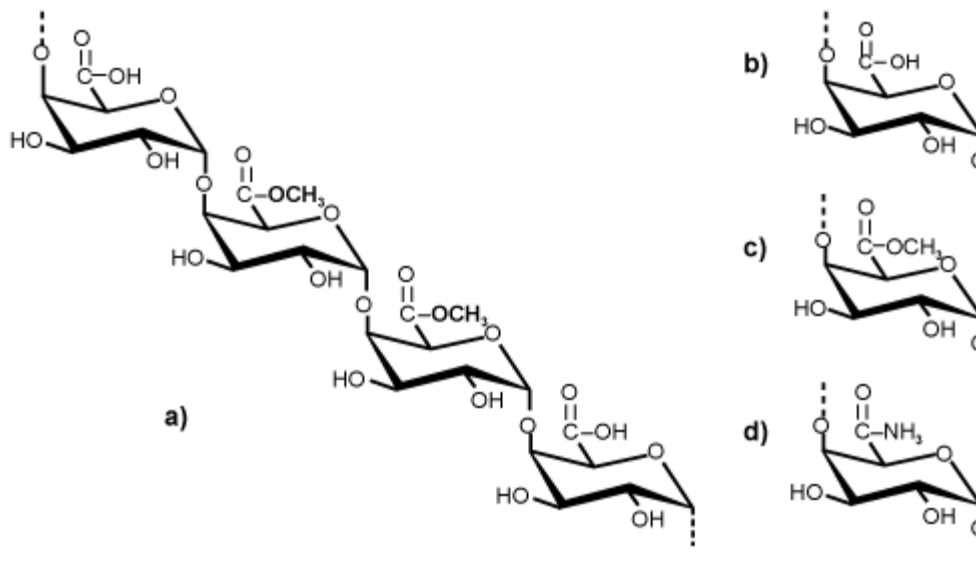


Figure 1.9: Unités d'acides galacturoniques reliées entre elles comme dans la chaîne de pectine (a) et les groupements fonctionnels carboxyle (b), ester (c) et amides (d) pouvant se retrouver dans différents type de pectine (Allwyn Sundar Raj *et al.*, 2012).

Certaines des unités d'acide galacturonique sont estérifiées. L'estérification des groupements carboxyliques par du méthanol permet d'obtenir différents types de pectine où la fonction carboxyle est remplacée par un groupement méthoxyle (O-CH₃). L'estérification augmente l'hydrophobicité de la molécule et lui confère un caractère chimique différent (Smith, 1976). La pectine est subdivisée en deux groupes en fonction du degré d'estérification (DE). Le DE est défini comme le ratio d'unités d'acide galacturonique estérifiées sur le total des unités d'acide galacturonique dans la molécule. Les pectines HM sont des pectines avec un DE supérieur à 50% tandis que les pectines LM ont un DE inférieur à 50% (Ogończyk *et al.*, 2011).

La pectine se retrouve dans la plupart des plantes mais elle est présente en plus grande concentration dans les agrumes (orange, citron, pamplemousse) et les pommes (Sharma *et al.*, 2006). C'est un ingrédient important dans plusieurs produits alimentaires et elle est considérée comme étant un des additifs alimentaires les plus sécuritaires pour la santé (Sriamornsak, 2011). De plus, les pectines sont utilisées comme fibres alimentaires et exercent des effets physiologiques sur le tractus gastrointestinal en réduisant le temps de transit (Spiller *et al.*, 1980) et l'absorption du glucose (Jenkins *et al.*, 1977). Ces effets sont principalement causés par leurs capacités de formation de gels et de rétention d'eau (Roberfroid 1993). De plus, lors de la digestion, la pectine est résistante aux enzymes présentes dans l'estomac et les intestins mais elle est presque totalement dégradée par les enzymes pectinolytiques produites par le microbiote du côlon (Thakur *et al.* 1997). Toutefois, les pectines, tel que mentionné précédemment, sont solubles dans les fluides basiques ou neutres (tels que les fluides intestinaux), ce qui peut causer problème pour la protection des bactéries durant le passage dans le tractus gastrointestinal. Une diminution de la solubilité de la pectine peut être obtenue par formation de gels de pectinate de calcium formés à partir de pectine LM.

Les pectines LM vont gélifier en présence d'ions calcium et d'autres ions divalents (Christensen, 1986). Le mécanisme de formation des gels de pectine LM implique la formation de zones de jonction créées par l'association des chaînes de polygalacturonate

côte-à-côte par laquelle des séquences spécifiques de monomères d'acides galacturoniques, en chaînes parallèles ou adjacentes, sont liées intermoléculairement par des ponts électrostatiques et ioniques entre les groupes carboxyles (Sriamornsak, 2003). La force des gels de pectines LM varie avec la concentration en pectine, le pH et la quantité de calcium. Un gel avec une force optimale est normalement obtenu à un pH entre 3.0 et 3.5 mais des gels de grandes qualités peuvent aussi être obtenus à des valeurs supérieures de pH en augmentant la concentration en pectine ou la quantité de calcium. Les associations moléculaires des chaînes d'hydrate de carbone induites par le calcium sont stables dans les solutions à bas pH et sont capables de résister à une hydratation importante lors du passage dans le tractus gastrointestinal (Liu *et al.*, 2003). En effet, plusieurs études réalisées avec des médicaments ont montré la résistance de gels de pectinate de calcium dans la partie supérieure du tractus gastrointestinal et leur dégradation dans la partie inférieure du tractus (Liu *et al.*, 2003; Kosaraju *et al.*, 2005).

1.4.4.4 Microencapsulation de bactéries probiotiques avec des composés antioxydants

La microencapsulation de bactéries probiotiques sensibles à l'oxygène dans un matériel résistant aux bas pH aurait comme avantage de diminuer potentiellement les effets de l'oxygène sur ces bactéries en plus de les protéger des autres conditions néfastes rencontrées durant l'entreposage dans des produits alimentaires et dans le tractus gastrointestinal. Talwalkar et Kailsapathy (2003b) ont obtenu, par microencapsulation, une augmentation de la survie en présence d'oxygène de bactéries probiotiques incorporées dans du yogourt pour six des douze souches testées. La microencapsulation peut donc améliorer la survie de certaines souches probiotiques lors d'un entreposage en présence d'oxygène mais l'efficacité de cette méthode semble variable selon les souches utilisées. De plus, les systèmes de protection existants ne permettent, généralement, qu'une protection de courte durée des bactéries. Il peut donc y avoir une perte de viabilité importante des bactéries sensibles à l'oxygène durant les périodes d'entreposage des produits dans lesquels elles ont été incorporées. La co-encapsulation de bactéries avec des composés antioxydants pourrait aider à protéger les bactéries probiotiques qui sont

sensibles à l'exposition à l'oxygène durant l'entreposage et dans l'estomac (Champagne et Fustier, 2007). Toutefois, le choix des composés antioxydants utilisés peut avoir un effet important sur la survie des bactéries utilisées. En effet, la viabilité de cellules de *Lactobacillus rhamnosus* a été réduite lors d'une co-encapsulation bactéries-acide ascorbique (Ying *et al.*, 2011). De plus, des cellules de *Lactobacillus gasseri* et *Bifidobacterium bifidum* co-encapsulées avec de la quercétine n'ont pas survécu lors d'un entreposage à 4°C (Chávarri *et al.*, 2010). Par contre, Shinde *et al.* (2014) ont montré que la co-encapsulation de bactéries probiotiques avec de l'extrait de pelures de pommes a permis une meilleure survie de ces bactéries lorsqu'incorporées dans du lait pour une période prolongée. Cet effet protecteur a potentiellement été attribué à l'activité antioxydante des polyphénols se trouvant dans l'extrait de pelures des pommes (Sun-Waterhouse, 2011). Comme les catéchines du thé vert possèdent des propriétés antioxydantes importantes, une co-encapsulation de bactéries avec ces composés pourrait améliorer la survie en présence d'oxygène des bactéries qui y sont sensibles.

Des gels possédant des propriétés antioxydantes ont été formés par greffage de catéchines sur de la gélatine (Spizzirri *et al.*, 2009), de l'inuline (Spizzirri *et al.*, 2011) et de l'alginate (Spizzirri *et al.*, 2010). Des films de chitosane possédant des propriétés antioxydantes (Siripatrawan et Harte, 2010) ont aussi été formés, lors d'une incorporation d'un extrait de thé vert dans une solution de chitosane, par interactions entre le chitosane et les catéchines mais leurs bénéfices n'ont pas été testés sur des cultures probiotiques. L'utilisation de catéchines ou d'extraits de thé vert riches en catéchines pourrait donc permettre la création d'une matrice d'encapsulation possédant des propriétés antioxydantes et qui pourrait être utilisée pour la microencapsulation de bactéries probiotiques sensibles à l'oxygène.

CHAPITRE 2 :

Problématique, hypothèses et objectifs

Problématique

Les aliments doivent contenir au moins 10^9 ufc de bactéries viables par portion au moment de leur consommation pour porter la mention «contenant des bactéries probiotiques» sur leur emballage (CFIA, 2014). De plus, pour exercer leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, au moins 10^6 à 10^7 ufc/mL de bactéries viables doivent atteindre l'intestin (Gomes et Malcata, 1999; Shin *et al.*, 2000). Toutefois, les bactéries probiotiques sont sujettes à de multiples facteurs qui peuvent diminuer leur viabilité lors de la production et l'entreposage des produits dans lesquels elles sont incorporées et durant leur passage dans le tractus gastrointestinal. Un surdosage en bactéries probiotiques est parfois nécessaire pour s'assurer d'avoir le bon nombre de ces bactéries dans les produits alimentaires ou suppléments au moment de la consommation et suite au passage dans la partie supérieure du tractus gastrointestinal après ingestion. Ce surdosage peut avoir des conséquences économiques importantes pour les producteurs et le développement de moyens ou méthodes permettant de limiter la perte de viabilité de ces bactéries est donc essentiel. L'exposition à l'oxygène dissous ou au stress oxydatif est un facteur important affectant la viabilité des souches sensibles à l'oxygène. Au terme de la revue de littérature, il apparaît que les catéchines et la microencapsulation pourraient permettre de réduire les effets de l'oxygène sur les bactéries qui y sont sensibles et les protéger des conditions rencontrées dans le tractus gastrointestinal par un effet direct sur le potentiel d'oxydo-réduction du milieu dans lequel se trouvent les bactéries et par une barrière physique autour des bactéries.

Hypothèses

Les catéchines, grâce à leur capacité antioxydante importante et leur potentiel à diminuer le potentiel d'oxydo-réduction de milieux, vont limiter les effets de l'oxygène et du stress oxydatif sur les bactéries probiotiques sensibles à l'oxygène. De plus, la microencapsulation de ce type de bactéries probiotiques avec des catéchines va permettre d'améliorer leur survie au cours de leur passage dans le tractus gastrointestinal.

Objectifs

Afin de valider nos hypothèses de recherche énoncées ci-dessus, trois objectifs majeurs seront réalisés dans cette étude:

L'objectif premier, intitulé «Détermination des effets de catéchines sur la croissance en présence d'oxygène de souches probiotiques sensibles à l'oxygène», permettra:

- a) d'étudier l'influence de l'ajout de différentes catéchines et d'un extrait de thé vert riche en catéchine dans le milieu de culture sur la croissance, en présence d'oxygène, de souches sélectionnées pour leur différentes sensibilités à l'oxygène,
- b) de déterminer l'effet de la concentration en catéchines ou en extrait de thé vert sur le potentiel d'oxydo-réduction du milieu de culture.

Avec le second objectif, intitulé «Croissance de *Lactobacillus helveticus* R0052 en présence d'oxygène et d'un extrait de thé vert: Impacts sur les lipides bactériens», nous nous intéresserons à :

- a) évaluer les effets de la croissance de la souche bactérienne en présence d'oxygène et de différentes concentrations d'extrait de thé vert sur la structure et la composition de ses lipides,
- b) la compréhension du mécanisme ou des mécanismes permettant l'amélioration de la croissance en présence d'oxygène de la souche étudiée par ajout d'un extrait de thé vert.

Finalement, le troisième objectif, intitulé «Microencapsulation de bactéries probiotiques avec un extrait de thé vert et ses effets sur la survie des bactéries dans des conditions gastrointestinales simulées», permettra d'évaluer :

a) l'effet de l'ajout d'un extrait de thé vert dans les solutions de pectine avant microencapsulation sur leurs propriétés antioxydantes et sur les groupements fonctionnels de la pectine,

b) l'impact de la concentration en extrait de thé vert utilisée pour la microencapsulation de bactéries avec de l'extrait de thé vert sur les caractéristiques des microparticules obtenues et sur les rendements d'encapsulation des bactéries et des polyphénols,

c) l'effet de l'enrobage, avec des protéines de lactosérum, des microparticules de pectine produites et de la présence d'extrait de thé vert dans les microparticules sur la survie des bactéries lors de leur exposition à des conditions gastrointestinales simulées en comparaison avec celle de cellules libres exposées aux mêmes conditions.

CHAPITRE 3:
Effect of catechins on the growth of oxygen-sensitive probiotic bacteria

Transition contextuelle

Il ressort de la revue de littérature que l'exposition à l'oxygène peut avoir des effets néfastes sur les bactéries probiotiques qui y sont sensibles et ne possédant que peu de mécanismes de défense contre les dérivés réactifs de l'oxygène. Les catéchines ou les composés riches en catéchines tel que l'extrait de thé vert pourraient limiter les effets de l'oxygène sur ces bactéries sensibles par leurs propriétés antioxydantes importantes et leur capacité potentielle à diminuer le potentiel d'oxydo-réduction du milieu de culture. Cette étude a donc pour objectif d'étudier la croissance en aérobie et anaérobie de souches probiotiques sensibles à l'oxygène dans un milieu de culture enrichi de catéchines et d'extrait de thé vert et de déterminer l'effet de ces composés sur le potentiel d'oxydo-réduction du milieu de culture.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article intitulé:

«Effect of catechins on the growth of oxygen-sensitive probiotic bacteria» publié dans Food Research International (2013), Vol. 53, pages 751-757.

Les auteurs sont: Hélène Gaudreau (candidate au doctorat: conception, planification, exécution des travaux pratiques, interprétation des résultats et rédaction de l'article scientifique), Dr. Claude P. Champagne et Dr. Gabriel E. Remondetto (co-directeurs: contribution à la planification des travaux de recherche, à la discussion des résultats et à la révision de l'article), Dr. Laurent Bazinet (contribution à l'étude du potentiel d'oxydo-réduction des milieux de culture) et Dr. Muriel Subirade (directrice: contribution à la planification des travaux de recherche, à la discussion des résultats et à la révision de l'article).

3.1 Résumé

L'oxygène joue un rôle majeur dans la perte de viabilité de souches bactériennes qui y sont sensibles. Les composés antioxydants, comme les catéchines, peuvent être utilisés pour limiter les effets négatifs de l'exposition à l'oxygène des bactéries durant leur croissance et leur entreposage dans des produits alimentaires. L'objectif de la présente étude était de mesurer l'effet la concentration en (+)-catéchine hydrate, en épigallocatechine gallate et en extrait de thé vert (ETV) sur la croissance des souches bactériennes probiotiques *Bifidobacterium longum* ATCC 15708, *Bifidobacterium longum* subsp *infantis* ATCC 15697 et *Lactobacillus helveticus* R0052. Le potentiel d'oxydo-réduction du milieu de culture suite à l'addition de ces composés antioxydants a été mesuré. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a aussi été utilisée pour évaluer l'impact de la présence d'ETV dans le milieu de culture sur les cellules bactériennes. Les résultats obtenus ont montré que l'addition des différentes catéchines et de l'ETV au milieu de culture n'a pas stimulé la croissance des bifidobactéries. Toutefois, celle de la souche *L. helveticus* a été stimulée de façon importante en présence d'oxygène lorsque le milieu de culture a été enrichi avec de l'ETV. Cette stimulation peut être due, en partie, à la réduction du potentiel d'oxydo-réduction du milieu de culture par addition d'ETV. Lors des analyses FTIR, des différences ont été observées dans la région spectrale correspondant aux acides gras des bactéries et suggèrent un effet de l'ETV aussi sur les lipides bactériens. L'enrichissement du milieu de culture avec de l'ETV pourrait donc être utilisé pour limiter les effets de l'oxygène sur des souches de bactéries probiotiques sensibles à l'oxygène mais l'effet de stimulation semble être variable selon les souches employées.

3.2 Abstract

Oxygen plays a major role in the loss of viability of oxygen-sensitive bacteria. Antioxidant compounds, such as catechins, could be used to limit negative effects of oxygen exposure on bacteria during their growth and storage in food products. The objective of the present study was to measure the effects of different concentrations of (+) catechin hydrate, green tea epigallocatechin gallate and green tea extract (GTE) on the growth of probiotic strains with different oxygen sensitivities: *Bifidobacterium longum* ATCC 15708, *B. longum* subsp *infantis* ATCC 15697 and *Lactobacillus helveticus* R0052. Oxido-reduction potential (ORP) measurements of the culture medium as well as Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy analyses on bacterial cells were carried out to evaluate the effects of GTE supplementation. Results obtained showed that medium enrichment with catechins did not stimulate the growth of the two bifidobacteria. However, the growth of *L. helveticus* was greatly enhanced, under aerobic conditions, by supplementation of the medium with GTE. This growth-promoting effect could be due, in part, to the reduction of the initial ORP value of the medium following addition of GTE. Moreover, the differences in the FTIR spectral region corresponding to fatty acids observed suggest an effect of GTE also on the lipids of the bacterial cell membrane. Thus, GTE supplementation could be used to limit oxygen toxicity on specific probiotic strains but the growth-promoting effect seems to be strain- dependent.

3.3 Introduction

The potential health effects attributed to the consumption of probiotic bacteria (Chen and Chen, 2007; Collado *et al.*, 2009; Vasiljevic and Shah, 2008) have promoted their incorporation in many dairy products. Fruit juices, smoothies, cereals or nutritional bars could also contain probiotic bacteria (Davis and Milner, 2009). To exert their health benefits on the host organisms, high numbers of viable probiotic bacteria (at least 10^7 CFU/g or mL) should be maintained in food products throughout storage (Kim *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009). However, these microorganisms are exposed, during the manufacture and storage of food or nutraceutical products, to the presence of oxygen (Siuta-Cruce and Goulet, 2001) and this exposition could be deleterious to them. Effectively, many probiotic bacteria are oxygen-sensitive (Talwalkar and Kailasapathy, 2004b) since their peroxide-scavenging system is either reduced or completely absent. When oxygen-sensitive bacteria are grown in presence of oxygen or exposed to oxidative stress, reactive oxygen species such as the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radicals (OH^{\cdot}) and hydrogen peroxide (H_2O_2 ; Mills *et al.*, 2011) accumulate in the cells which results eventually in cellular death (Vasiljevic and Shah, 2008). Oxygen radicals can damage both cell membrane phospholipids and proteins but oxidation of membrane fatty acids is thought to be more toxic for the cell (Sigler *et al.*, 1999) Thus, prevention of oxygen toxicity is crucial during manufacturing and processing of cell biomass of oxygen-sensitive probiotic bacteria and also to ensure cell viability during storage. Many technological alternatives have been suggested to minimize oxidative stress in food products such as the use of new packaging materials (Jasson *et al.*, 2001), the addition of another bacterial strain (*Lactococcus lactis*) to milk (Odakami *et al.*, 2011) or of gases to fermented milks (Ebel *et al.*, 2011) to modify their oxido-reduction (redox) potential (ORP). The addition of glucose oxidase was also shown to decrease oxidative stress during probiotic yogurts processing (Cruz *et al.* 2010; 2012 a and b).

Antioxidants are substances that significantly decrease the adverse effects of reactive oxygen species on normal physiological functions (Wang *et al.*, 2000). Among these

compounds, tea catechins act as antioxidants *in vitro* by sequestering metal ions such as iron ions and by scavenging reactive oxygen species and nitrogen species (Frei and Higdon, 2003; Wiseman *et al.*, 1997). Iron ions are known to catalyze many processes leading to the appearance of free radicals (Saija *et al.*, 1995). Another powerful antioxidant, the (+)-catechin hydrate, acts as a free radical scavenger and was shown to prevent efficiently lipid peroxidation both *in vivo* and *in vitro* (Kappus *et al.*, 1979; Albrecht *et al.*, 1978). Moreover, in a recent study, Rozoy *et al.* (2013a) have shown that the addition of a green tea extract containing catechins to cyclic voltammetry buffer solutions resulted in a decrease in their ORP. As a result, those compounds could potentially be efficient to protect oxygen-sensitive probiotic bacteria from oxygen toxicity. Catechins are natural products and their addition does not require any changes in the original processing steps. However, there are variable data on the effects of catechins and green tea extract on bacterial viability. Tea components, and particularly catechins, have been shown to have antimicrobial activity against many pathogenic bacteria (Bancirova, 2010; Lee *et al.*, 2006) but no adverse effect on lactic acid bacteria have been reported in many studies (Ankolekar *et al.*, 2011; Cueva *et al.*, 2010; Jaziri *et al.*, 2009). In some instances, stimulation of growth was noted (López de Felipe *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2012) and catechins were even metabolized (LoCascio *et al.*, 2006). However, in none of these studies, has the link between catechins and the detrimental effect of the aerobic environment been examined. There is a need to better characterize the effects of catechins on probiotic bacteria in the context of oxygen sensitivity of the strains.

The objective of this study was, therefore, to evaluate the effects of different concentrations of green tea extract, epigallocatechin gallate and (+)-catechin hydrate on the growth of oxygen-sensitive probiotic bacteria in presence or absence of oxygen in order to determine if these compounds could limit the negative effect of oxygen exposure on probiotic bacteria. ORP measurements of the culture medium as well as Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy analyses on bacterial cells were also carried out to evaluate the effects of GTE supplementation. FTIR spectroscopy can be used as a rapid means to monitor the changes occurring in bacterial cells in response to stress conditions (Alvarez-Ordóñez and Prieto, 2010).

3.4 Materials and Methods

3.4.1 Chemicals

Capsules of commercial green tea extract (GTE) were purchased from the Pharmacie des Vosges (Nice, France). The composition of this green tea extract is presented in Table 3.1. Moreover, (-)- epigallocatechin gallate from green tea ($\geq 95\%$; EGCG) and (+)-catechin hydrate ($\geq 98\%$; (+)-CH) were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA) and L (+) ascorbic acid from VWR international (Ville Mont Royal, Qc, Canada).

Table 3.1: Catechin composition of the commercial green tea extract used in this study (Rozoy *et al.*, 2013b).

Catechins	Concentration (mg/mL)	Catechin proportions (%)
Epigallocatechin (EGC)	2.29 ± 0.27	17.83
Epicatechin (EC)	0.67 ± 0.11	5.22
Epigallocatechin gallate (EGCG)	4.94 ± 0.29	38.47
Gallocatechin gallate (GCG)	3.53 ± 0.25	27.49
Epicatechin gallate (ECG)	1.41 ± 0.01	10.98

3.4.2 Microorganisms and culture conditions

Lactobacillus helveticus R0052 was kindly provided by Lallemand-Rosell (Montreal, Canada) and *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 was gratefully received from the D. Roy collection (Food Sciences and Nutrition department, Laval University, Quebec, Canada). *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 was purchased from ATCC (Manassas, VA, USA) and kept in the bacterial collection of the Food Research and Development Centre (Saint-Hyacinthe, Canada). The two *Bifidobacterium* strains

were chosen for this study because they were significantly affected by oxygen and the redox potential of media in the study of Bolduc et al (2006). Moreover, strain *Lactobacillus helveticus* R0052 was chosen because it is a commercial strain having oxygen-sensitivity.

Stock cultures were prepared by mixing a fresh culture with sterile 20% glycerol and sterile 20% (w/v) reconstituted skim milk in a 2:5:5 ratio, with subsequent storage at -80°C in portion of 1 mL placed in 2 mL-vials (Greiner Bio-one, Monroe, NC). Before each independent assay, fresh cultures were prepared by adding one thawed stock culture to 9 mL of lactobacilli MRS broth enriched with ascorbic acid (0.1%), and incubating between 12 and 16 h at 37°C in an anaerobic jar containing Anaerogen sachets (Oxoid, Nepean, ON, Canada). The incubation period was variable so that each culture was collected once it had reached the beginning of the stationary growth phase.

3.4.3 Preparation of antioxidant solutions

Aqueous GTE, EGCG and (+)-CH solutions were prepared by solubilization of the product at a concentration of 100 mg/mL and centrifuged (RC3C, Sorvall Instrument, Dupont, Wilmington, USA) at 9800 rpm for 10 min at room temperature in order to remove any residue. GTE and EGCG were solubilized in deionized water while (+)-CH was dissolved in ethanol (50% v/v) because this compound is not soluble in water. Solutions were sterilized by filtration through 0.45µm filter units (Sterile AcrodiscR. #4654 Syringe filters, Pall Life sciences, Mississauga, ON, Canada). Aqueous L (+) ascorbic acid solutions (10%) were sterilized by filtration through 0.2 µm cellulose acetate filter units (VWR international, Ville Mont Royal, Canada).

3.4.4 Protocols:

Three protocols were carried out:

1) *Effect of MRS supplementation on growth of probiotic bacteria*

Growth curves for each strain used in this study were obtained by reading optical density (OD) using a microplate reader (Powerwave XS2 Biotek microplate reader, Biotek, Winooski, USA) as described by Bolduc *et al.* (2006). Growth behaviour of the strains, under aerobic and anaerobic conditions, was followed on different media: a) unsupplemented lactobacilli MRS medium, b) MRS supplemented with different concentrations (0-1000 $\mu\text{g/mL}$) of GTE, EGCG or (+)-CH to study growth in media containing antioxidant compounds and c) MRS supplemented with ascorbic acid (0.1%) as positive control medium and to study growth of the strains in a medium with a reduced oxygen level. Ascorbic acid was used for comparison because it is a powerful oxygen scavenger and its addition often improves the growth pattern of anaerobic cultures under such experimental conditions (Bolduc *et al.*, 2006). The concentration range of catechins was selected on the basis of previous data reported in the literature for the effects of catechins on bacteria (Cueva *et al.*, 2010; Parkar *et al.*, 2008). Moreover, the ethanol concentration in media supplemented with (+)-CH did not exceed 0.5% which was shown to have no adverse effect on the growth of the bacteria tested.

Two wells of the microplate were filled with 200 μL of each medium to obtain a duplicate reading for each strain and inoculated with 20 μL of a fresh culture. To further reduce the presence of oxygen in the medium, 50 μL of sterile mineral oil were added to the wells on the surface of the inoculated media; this will be referred to as "anaerobic conditions". The plates were incubated for 24 h at 37°C. OD measurements (600nm) were taken every 15 min, with the microplate reader agitation set at "moderate shaking" for 30 sec before each OD reading. Three independent assays were carried-out. Maximal OD (OD_{max}) values obtained were determined. To compare the growth rate of the bacteria tested, OD data were transformed into ln values of biomass and plotted against time. The slope of the exponential growth part of the curve, giving the maximal growth rate (μ_{max}), was obtained by a simple linear regression of the ln scale plot (Sigma Plot software, Jandel, Chicago, USA). Statistical analyses were performed using SigmaPlot software (Systat software, Inc., San Jose, USA) on the results obtained for the growth of bacteria.

A one-way analysis of variance (ANOVA) at a significance level of 0.05 was performed on the OD_{max} and μ_{max} results.

2) *Effects of addition of GTE, EGCG, (+) CH and ascorbic acid on the oxido-reduction potential*

To evaluate the impact of catechins and ascorbic acid addition on the medium, the ORP values of lactobacilli MRS culture media with added concentrations (0-1000 μg/mL) of GTE, EGCG, (+)-CH or with 1000 μg/mL ascorbic acid were measured using a VWR Symphony platinum electrode (VWR Scientific, West Chester, USA) filled with a solution of Ag/AgCl. This electrode was connected to a VWR Symphony portable SP20 pH/ISE meter. The electrode reading was verified with a homemade solution of potassium ferrocyanide and potassium ferricyanide having an ORP value of +234mV. (Bazinet *et al.*, 2009). Three independent replicates were carried out for each condition and the data presented are the average of these three assays.

3) *Fourier transform infrared spectroscopy analysis*

To evaluate the effect of the presence or absence of oxygen or the presence of GTE in the culture medium on the lipid molecular structure in the phospholipid bilayer of bacterial membrane, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analyses were performed. A 10% inoculum of a fresh culture of *Lactobacillus helveticus* R0052 was grown at 37°C in 50 mL test tubes in control MRS broth (without ascorbic acid) in presence or absence of oxygen or in MRS (without ascorbic acid) supplemented with 250 μg/mL GTE in presence of oxygen. A moderate agitation of the test tubes was carried out every two hours for fermentations in presence of oxygen while test tubes were incubated in anaerobic jars containing an Anaerogen sachet (Oxoid) for those in absence of oxygen. Fermentations were stopped when the cultures had reached the beginning of the stationary phase. Cells were pelleted by centrifugation at 9800 rpm for 5 min at 4°C and washed twice with deionized water. The bacterial paste obtained was placed on a CaF₂ window and stove-dried 15 min at 50°C to form a transparent bacterial film. These drying duration and temperature were first used by Alvarez-Ordóñez and Prieto (2010). Infrared spectra were measured at room temperature with a Magna 560 Nicolet spectrometer. FTIR spectra

were recorded from 4000 to 900 cm^{-1} at a resolution of 2 cm^{-1} . Each spectrum represents an average of 128 scans and is apodized with a Happ-Genzel function. The sample chamber of the spectrometer was continuously purged with dried and CO_2 -free air to prevent atmospheric water vapor obscuring the bands of interest. Water vapor subtraction was undertaken when necessary. Spectral processing was performed using Omnic software (version 3.1, Thermo Electron Corporation). The scale of each spectrum was normalized to minimize differences due to sample amount and the baseline was corrected in the spectral region 3000-2800 cm^{-1} to correct spectra with sloped or varying baselines.

Statistical analyses were performed using SigmaPlot software (Systat Software Inc., San Jose, CA) on all results obtained. One-way analyses of variance at the significance level of 0.05, followed by Holm-Sidak tests, were performed.

3.5 Results

3.5.1 Effect of MRS supplementation on growth of probiotic bacteria.

The strain *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 did not grow under aerobic conditions in any of the culture media tested. Only results obtained for the growth under anaerobic conditions are therefore presented (Table 3.2). Low values of OD_{max} and μ_{max} were obtained in unsupplemented MRS media and in MRS supplemented with GTE or (+)-CH. Moreover, addition of 1000 $\mu\text{g/mL}$ of GTE or of more than 125 $\mu\text{g/mL}$ EGCG in the medium totally inhibited the growth of the bacteria. In contrast, a significant stimulation of the growth was observed in media enriched with 62.5 and 125 $\mu\text{g/mL}$ EGCG. Nevertheless, maximal growth of the strain was obtained in the control medium, i.e. MRS supplemented with ascorbic acid. This important growth obtained in control medium was also observed for strain *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. OD_{max} and μ_{max} values of 0.34 ± 0.07 and $0.05 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ respectively were obtained for this strain in control medium under aerobic conditions and of 0.43 ± 0.02 and $0.09 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ respectively under anaerobic conditions. However, this strain did not grow in unsupplemented MRS media and in MRS media supplemented with different concentrations of GTE, (+)-CH and EGCG both in aerobic and anaerobic conditions.

The third strain, *Lactobacillus helveticus* R0052, grew under aerobic and anaerobic conditions (Table 3.3) in all media tested. In unsupplemented MRS media, the OD_{max} value obtained was significantly lower for growth under aerobic conditions than under anaerobic conditions. Nevertheless, the growth of *Lactobacillus helveticus* was greatly enhanced, under aerobic conditions, by supplementation with 62.5 to 500 $\mu\text{g/mL}$ GTE as demonstrated by high OD_{max} and μ_{max} values obtained in these media. These growth parameter values were similar to those obtained in the same media under anaerobic conditions and in the control medium under both conditions. High OD_{max} values were also reached in media containing 1000 $\mu\text{g/mL}$ GTE but lower growth rates values

Table 3.2: Influence of catechins and green tea extract supplementation on maximal optical densities (OD_{max} , 600 nm) and maximal growth rates (μ_{max}) obtained during growth, at 37°C and under anaerobic conditions, of *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 in MRS media.

Medium	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	OD_{max}	μ_{max} (h^{-1})
MRS		0.20 ± 0.02 c	0.04 ± 0.01 b
MRS + GTE	62.5	0.29 ± 0.07 c	0.06 ± 0.01 b
	125	0.35 ± 0.01 bc	0.08 ± 0.03 ab
	250	0.30 ± 0.06 c	0.06 ± 0.01 b
	500	0.39 ± 0.02 bc	0.09 ± 0.04 ab
	1000	NG	ND
MRS + EGCG	62.5	0.62 ± 0.10 b	0.07 ± 0.01 ab
	125	0.74 ± 0.17 ab	0.06 ± 0.01 b
	250	NG	ND
	500	NG	ND
	1000	NG	ND
MRS + (+)-CH	62.5	0.54 ± 0.05 bc	0.07 ± 0.02 ab
	125	0.53 ± 0.05 bc	0.09 ± 0.02 ab
	250	0.45 ± 0.14 bc	0.07 ± 0.04 b
	500	0.45 ± 0.12 bc	0.06 ± 0.01 b
	1000	0.54 ± 0.08 bc	0.06 ± 0.16 b
Control (MRS + ascorbic acid)	1000	0.98 ± 0.10 a	0.12 ± 0.02 a

N.G.: no growth and N.D.: Not determined (when OD did not rise over 0.1, μ_{max} was not determined). a,b,c: For a given column, data (\pm standard deviation) followed by the same letter are not significantly different ($P > 0.05$).

Table 3.3: Influence of catechins supplementation on maximal optical densities (OD_{max}, 600 nm) and maximal growth rates (μ_{max}) obtained during growth, at 37°C and under aerobic and anaerobic conditions, of *Lactobacillus helveticus* R0052 in MRS media.

Medium	Concentration (μg/mL)	Aerobic			Anaerobic (oil at surface)				
		OD _{max}		μ _{max} (h ⁻¹)	OD _{max}		μ _{max} (h ⁻¹)		
MRS		0.59 ± 0.11	cd	0.27 ± 0.04	a	1.47 ± 0.23	a	0.24 ± 0.01	ab
MRS + GTE	62.5	1.41 ± 0.13	ab	0.27 ± 0.04	a	1.55 ± 0.03	a	0.23 ± 0.03	abc
	125	1.28 ± 0.15	ab	0.28 ± 0.03	a	1.56 ± 0.03	a	0.25 ± 0.03	ab
	250	1.39 ± 0.32	ab	0.27 ± 0.02	a	1.57 ± 0.07	a	0.22 ± 0.01	abc
	500	1.28 ± 0.40	ab	0.24 ± 0.04	a	1.56 ± 0.08	a	0.21 ± 0.04	abc
	1000	1.09 ± 0.08	bc	0.13 ± 0.03	bc	1.37 ± 0.18	a	0.18 ± 0.06	bc
MRS + EGCG	62.5	0.70 ± 0.10	c	0.19 ± 0.01	ab	1.30 ± 0.30	a	0.14 ± 0.02	c
	125	0.64 ± 0.15	cd	0.19 ± 0.02	ab	1.45 ± 0.11	a	0.15 ± 0.02	c
	250	0.42 ± 0.15	d	0.11 ± 0.07	bc	1.35 ± 0.21	a	0.12 ± 0.03	c
	500	0.53 ± 0.20	d	0.07 ± 0.01	c	1.24 ± 0.18	a	0.07 ± 0.02	c
	1000	NG		ND		NG		ND	
MRS + (+)-CH	62.5	0.63 ± 0.09	cd	0.26 ± 0.02	a	1.49 ± 0.07	a	0.23 ± 0.02	abc
	125	0.65 ± 0.08	cd	0.27 ± 0.03	a	1.53 ± 0.18	a	0.24 ± 0.04	ab
	250	0.65 ± 0.18	cd	0.25 ± 0.04	a	1.39 ± 0.19	a	0.19 ± 0.02	bc
	500	0.55 ± 0.07	d	0.29 ± 0.03	a	1.44 ± 0.13	a	0.20 ± 0.01	abc
	1000	0.50 ± 0.09	d	0.27 ± 0.02	a	1.46 ± 0.14	a	0.19 ± 0.01	bc
Control (MRS + Ascorbic acid)	1000	1.65 ± 0.12	a	0.26 ± 0.03	a	1.63 ± 0.06	a	0.28 ± 0.03	a

N.G.: No growth and N.D.: Not determined (when OD did not rise over 0.1, μ_{max} was not determined).

a,b,c,d: For a given column, data (± standard deviation) followed by the same letter are not significantly different (P > 0.05).

were measured in the presence or absence of oxygen. On the other hand, supplementation of the medium with EGCG and (+)-CH did not promote significantly the growth of *Lactobacillus helveticus* and the presence of 1000 µg/mL EGCG in the medium resulted in a total inhibition of its growth.

3.5.2 Effect of addition of GTE, EGCG, (+) CH and ascorbic acid on the medium oxido-reduction potential

The average initial ORP of the unsupplemented MRS medium used in this experiment was around + 249mV (Figure 3.1). The addition of GTE, EGCG and (+)-CH decreased the ORP of this culture medium within 15 min. Furthermore, an increase in concentrations of these compounds resulted in a decrease in ORP values in an order 2 manner, with EGCG being the most efficient. Maximal decreases of 62.2%, 54.4% and 36.9% of the initial ORP value were obtained by addition of 1000 µg/mL of EGCG, GTE and (+)-CH respectively. Moreover, a very important decrease (331 mV) of the initial ORP value of the culture medium was obtained by the addition of 1000 µg/mL ascorbic acid and a final value of -74.3 mV was reached (result not shown).

3.5.3 FTIR analysis

Figure 3.2 presents normalized FTIR spectra, in the region characteristic of membrane components i.e. acyl chains, of *Lactobacillus helveticus* R0052 cells grown in unsupplemented MRS media in presence or absence of oxygen or in MRS + 250 µg/mL GTE in presence of oxygen. This spectral region (3000-2800 cm⁻¹) is dominated by the CH₃, CH₂ and CH-stretching vibrations of groups usually present in fatty acid components of the various membrane amphiphiles (Helm *et al.*, 1991) and the bands with frequencies near 2960, 2930, 2875 and 2855 cm⁻¹ have been assigned, respectively, to CH₃ and CH₂ asymmetric and CH₃ and CH₂ symmetric stretching vibrations (Melin *et al.*, 2001).

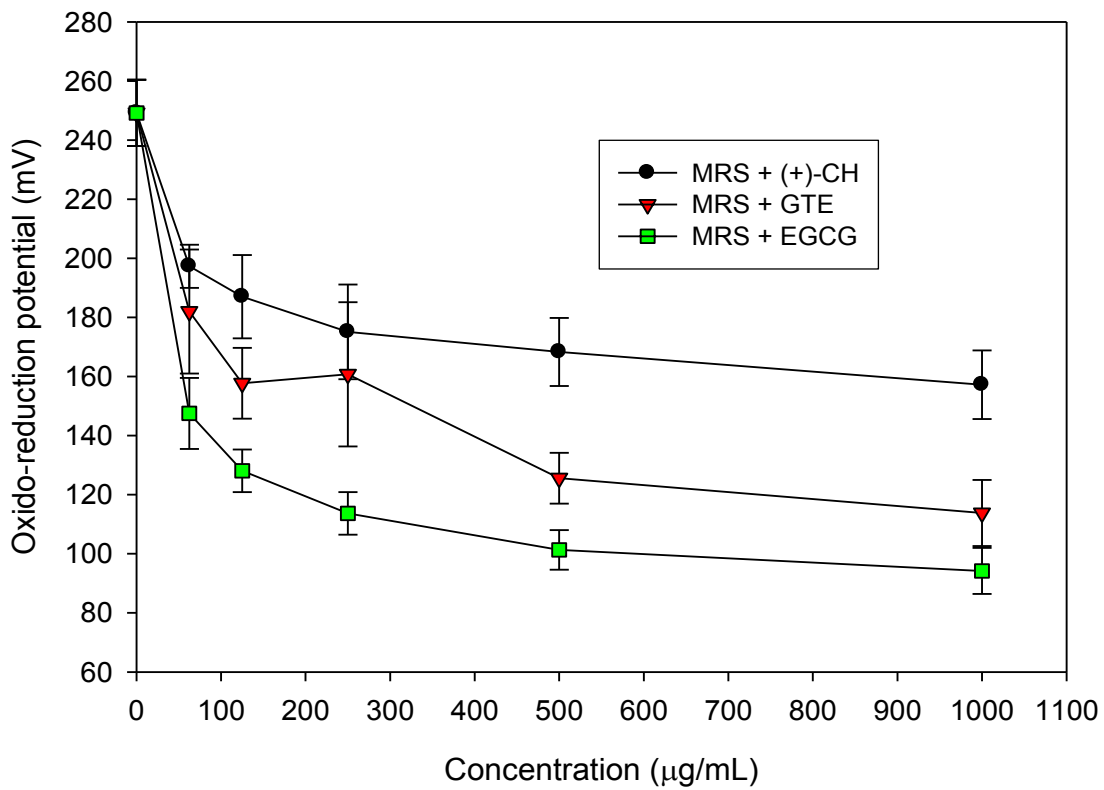


Figure 3.1: Effects of GTE, EGCG or (+)-CH on the oxido-reduction potential of MRS culture medium. Error bars represent standard deviation.

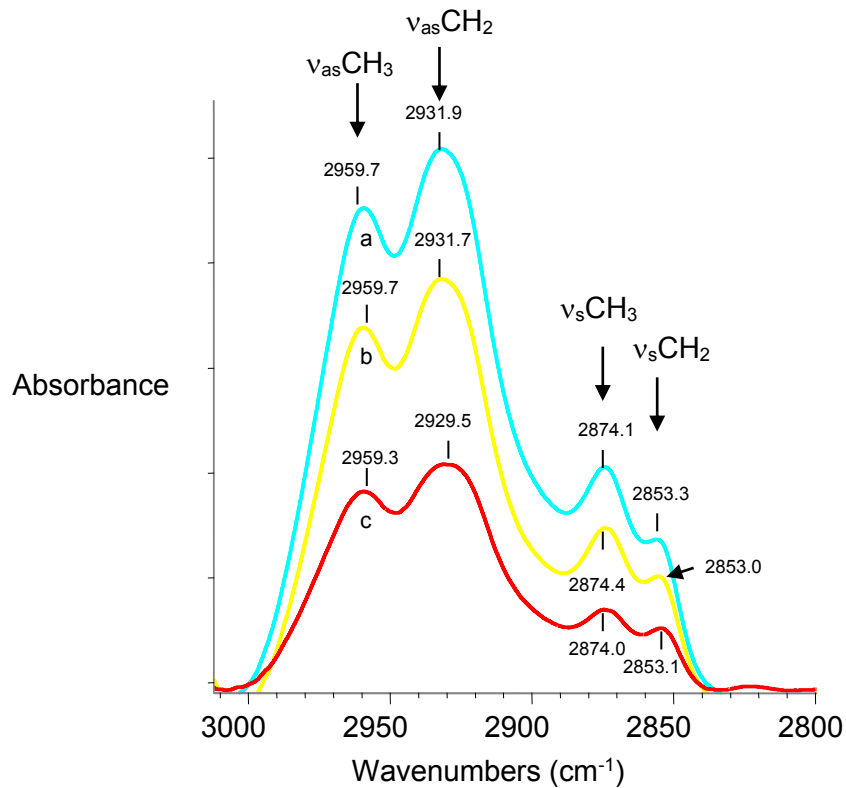


Figure 3.2: Normalized FTIR spectra (3010-2800 cm⁻¹) of *Lactobacillus helveticus* R0052 cells grown in a) control MRS media in presence of oxygen, b) in MRS + 250 µg/mL GTE in presence of oxygen and c) in control MRS in absence of oxygen.

Differences in FTIR spectra in the 3000-2800 cm^{-1} region for cells grown in unsupplemented media in the presence or absence of oxygen can be observed (Figure 3.2). The absorption intensity of the peaks corresponding to CH_3 ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$) and CH_2 ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$) asymmetric stretching vibrations obtained for cells grown in presence of oxygen was more important than for cells grown in absence of oxygen. The wavenumber of the peak corresponding to $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ stretching vibrations was also higher for cells grown in the presence of oxygen in the unsupplemented medium in comparison with cells grown in absence of oxygen (2931.9 cm^{-1} instead of 2929.5 cm^{-1}). The wavenumber of the peaks recorded for cells grown in presence of oxygen in MRS supplemented with GTE and in unsupplemented media were very similar. However, spectra with intermediate peak intensities were obtained for cells grown in presence of oxygen in MRS supplemented with 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GTE.

3.6 Discussion

Supplementation of the culture media with catechins had very different effects on the growth, under aerobic or anaerobic conditions, of the three bacteria tested. Thus, the stimulatory or detrimental effects of the catechins on growth were not only linked to their nature and their concentration, but also to strain and incubation environment. *Bifidobacterium longum* has been reported to be very sensitive to oxygen (Bolduc *et al.*, 2006; Jayamanne and Adams, 2009; Simpson *et al.*, 2005) and this is in accordance with the fact that strain *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 did not grow under aerobic conditions even in media containing catechins. On the other hand, supplementation of the media with 62.5 and 125 µg/mL EGCG was an efficient means to promote growth of this strain under anaerobic conditions. This stimulation effect might be due, in part, to the important antioxidant properties of EGCG (Bancirova, 2010). However, higher concentrations of EGCG totally inhibited the growth of the strain. Thus, the effect of EGCG on growth of the strain was concentration dependent. Growth of the strain was also inhibited in media supplemented with 1000 µg/mL GTE. The high proportion of EGCG in the GTE used in this study (Table 3.1) might be responsible, in part, for the inhibitory effect of this compound observed at this concentration. Nevertheless, supplementation with GTE at lower concentrations did not inhibit growth of this strain. This result is in concordance with those of Ankolekar *et al.* (2011) and Ye *et al.* (2012) who observed that green tea extracts or powder had no significant effects on beneficial intestinal bacteria. In contrast, the growth of the strain in the control medium and under anaerobic conditions was very good. The important growth of *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and of other *Bifidobacterium* strains with ascorbic acid supplementation of MRS media was also observed by Bolduc *et al.* (2006).

The other *Bifidobacterium* strains tested, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, had also optimal growth in the control medium under both aerobic and anaerobic conditions. This could be due to the important oxygen radical scavenging properties of ascorbic acid (Nikki, 1991). However, the absence of growth in the culture medium with

catechins could be due to the very high oxygen sensitivity of this strain. In a study comparing viability in milk of many *Bifidobacterium* spp. including *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, the last strain was shown to be the least tolerant to the presence of oxygen (Bolduc *et al.*, 2006). It is known that the susceptibility of bifidobacteria to oxidative stress is linked to the presence of some enzymes and also to changes in morphology and components on the cell surface (Ruiz *et al.*, 2011) and this effect is strain-dependent (Cruz *et al.*, 2012b).

In contrast, strain *Lactobacillus helveticus* R0052 was able to grow in the presence of oxygen. This suggests a less important oxygen-sensitivity for this strain compared to the two other *Bifidobacterium* strains used in this study. However, the OD_{max} value obtained under anaerobic conditions in unsupplemented MRS was almost three times higher than the one obtained under aerobic conditions. This result confirmed that this strain is also oxygen-sensitive. Cells of *Lactobacillus helveticus* do not appear to possess any cellular mechanisms of protection against toxic oxygen compounds such as H₂O₂ (Guerzoni *et al.*, 2001). However, as observed for the other probiotic strains tested, growth of the strain in the control medium was very good. Moreover, supplementation of the medium with low concentrations of GTE (62.5 - 500 µg/mL) also greatly enhanced its growth under aerobic conditions as shown by the growth parameters obtained which were similar than those obtained in the control medium. EGCG and (+)-CH did not promote the growth of the strain. The higher growth-promoting activity of GTE for this strain in comparison with EGCG alone could be explained by the more important scavenging capacity for free-radical of a mixture of tea catechins than for EGCG (Shen *et al.*, 1993) which suggests synergistic or additive effects of tea catechins in green tea extract for scavenging free radicals (Chen *et al.*, 2002). This could also indicate that other unknown polyphenolic compounds were also involved in growth stimulation (Theobald *et al.*, 2008). Moreover, catechol or other simple phenols produced from catechin metabolism could be related to the stimulatory effect of green tea on probiotic bacteria (Gyawali and Ibrahim, 2012). However, the effect of GTE supplementation was strain-dependent. Ye *et al.* (2012) also observed a positive effect of hawk tea supplementation on *Lactobacillus*

strains counts in yoghurt while the presence of the tea did not have an effect on *Bifidobacterium* numbers.

The efficiency to decrease the ORP value of the medium was different for the catechins tested and the ascorbic acid. The more important reductions of ORP values by EGCG in comparison with those obtained with (+)-CH could be explained by the fact that galloyl esters of catechins, such as EGCG, have lower redox potentials than non-galloylated catechins (Balentine *et al.*, 1997), like (+)-catechin-hydrate. The GTE used in this study was also more efficient than (+)-CH to decrease ORP values of the media, probably due to its high proportion of galloylated catechins. Moreover, a very important decrease in ORP value was obtained by addition of ascorbic acid to the medium. The redox potential of this compound is lower than those of tea catechins, which means that ascorbic acid is a better electron donor than tea catechins (Jovanovic *et al.*, 1996; 1997). The reduction of more than 50% of the medium's ORP initial value by addition of GTE could also have enhanced growth of the *Lactobacillus* strain. Effectively, some anaerobes are not killed by high redox potentials but cannot grow until the medium is more reduced (Hungate, 1969). However, since the desirable potential redox range for the growth of obligate anaerobic microorganisms is +100 to -250 mV or lower (Ray, 2004), the lowering of the ORP brought by the supplements was presumably insufficient to enable growth of *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 under aerobic conditions. Nevertheless, the important reduction of the ORP to a negative value by addition of ascorbic acid might be responsible, in part, for the good growth of the *Bifidobacterium* strains tested in media containing this compound.

The ORP results suggested that the important growth-promoting effect of GTE observed for strain *Lactobacillus helveticus* R0052 could not totally be explained by the resulting reduction of the medium ORP. This could also be due to the capacity of catechins to interact with the lipids of the membranes (Uekusa *et al.* 2007) and to affect their structures. The interaction of flavonoids, such as catechins, with bilayers could be a relevant mechanism in the protection of membrane oxidation (Oteiza *et al.*, 2005). Effectively, it has been suggested that hydrophilic flavonoids interact, by hydrogen

bonding, with the polar head groups at the lipid water interface of membranes and that this type of interactions may provide a level of protection of the bilayer from external and internal aggressors such as oxidants, contributing to preserve the structure and function of biological membranes (Oteiza *et al.*, 2005). In order to explore this hypothesis, FTIR measurements were carried out on cells of *Lactobacillus helveticus* grown under aerobic and anaerobic conditions in unsupplemented MRS and under aerobic conditions in MRS enriched with 250 µg/mL GTE. This concentration of GTE was chosen because of the high OD_{max} and µ_{max} values obtained for growth in media at this concentration.

FTIR spectra reflect the spectral characteristics of cell components such as fatty acids, membrane and intracellular proteins, polysaccharides and nucleic acids (Vodnar *et al.*, 2010). The wavenumber of the spectral bands gives information about structure, conformation and intermolecular interactions (Cakmak *et al.*, 2006) and the signal intensity and the areas under the bands gives information about the amount of the functional groups responsible for the corresponding band (Garip *et al.*, 2007). In the spectra, the asymmetric and symmetric CH₂ bands correspond to the CH asymmetric (ν_{as}CH₂) and symmetric (ν_sCH₂) stretching of CH₂ groups in fatty acids (Davis and Mauer, 2010). These bands are useful in the study of the physical properties of phospholipids (Arrondo and Gõni, 1998). Differences in spectra of the cells grown in the presence or absence of oxygen (Figure 3.2) suggest that exposure to oxygen had an effect on the lipids of the membrane. The higher wavenumber of the CH₂ asymmetric vibrations band for cells grown in presence of oxygen recorded at room temperature in comparison with those of cells grown in absence of oxygen implies that a corresponding lipids structural change, which resulted from a decreased packing density of the acyl chains of the lipids, occurred during growth under aerobic conditions. This could be due to active response of bacteria to the stress conditions imposed. Effectively, the bacterial membrane adapts to changing environment by altering the membrane lipid components by which it is formed (Geiger *et al.*, 2010). Mohan *et al.* (2010) observed a higher permeability of the lipid membrane of the cells of *Bacillus subtilis* after exposure to oxidative stress which seems to result from a higher synthesis of unsaturated fatty acids.

The presence of GTE in the medium did not seem to have limited the effect of oxygen on the structure or molecular interactions of the lipids in the phospholipid bilayer of cells as suggested by the similar wavenumbers of the CH₂ and CH₃ spectral bands obtained for cells grown in unsupplemented MRS and in MRS enriched with GTE. On the other hand, supplementation of the growth medium with GTE resulted in lower band intensities recorded for membrane lipids of cells grown under aerobic conditions in that medium in comparison with those of cells grown in unsupplemented MRS. This suggests that components of the GTE had an effect on the membrane lipid contents of the *Lactobacillus helveticus* strain used in this study. Thus, the presence of GTE in the growth medium could have limited the alteration of the lipid components due to an active response of bacteria to the toxic effect of oxygen.

3.7 Conclusion

Supplementation of culture media with low concentrations of GTE greatly promoted growth under aerobic conditions of *Lactobacillus helveticus* R0052. Results obtained suggest a dual level of activity of the GTE. Firstly, GTE decreases the ORP value of the culture medium by more than 54%. By reducing the ORP level, one could expect a lower free oxygen level in the medium, which would result in a lower production of toxic H₂O₂ per se. FTIR results suggest also a change in the contents of lipids of the phospholipids bilayer for cells grown in media enriched with GTE. Thus, GTE could have had an effect both on the medium and on the cells. To our knowledge, this study is the first to demonstrate a decrease in ORP values of culture media by supplementation with catechins, as well as the interaction between the aerobiosis of the environment and the redox-catechin level on the growth of probiotic bacteria. The negative effects of oxygen exposure seem to have been limited by the presence of GTE in the culture medium for the *Lactobacillus* strain. However, supplementation of the culture medium with catechins and the resulting decrease in its ORP value did not allow the growth of the two *Bifidobacterium* strains under aerobic conditions. These strains seemed to have a very high oxygen-sensitivity. Consequently, these data point to limit the benefits of catechins as a function of the oxygen sensitivity of the strains.

From an economic standpoint, GTE could be an interesting ingredient for commercial producers of *Lactobacillus* probiotics because this product is natural and relatively inexpensive and its addition to culture media is very simple and could allow growth of strains in the presence of oxygen. GTE could also be added to food products containing probiotic bacteria as a source of antioxidant compounds and also to preserve the viability of the bacteria. Further assays will now be conducted on the stability of probiotic bacteria during storage in food matrices containing GTE in order to assess potential interactions between catechins and food components. Moreover, since the FTIR analysis results suggested an effect of GTE on the lipids of the bacterial membrane, a complementary

study on the effects of GTE concentration in the medium on the structure of the constituents of bacterial cells is in progress.

CHAPITRE 4:

**Lipid modification in *Lactobacillus helveticus*
cells in response to oxygen and green tea extract
exposure**

Transition contextuelle

Dans le chapitre précédent, les tests de croissance par spectroscopie automatisée ont montré une stimulation de la croissance en présence d'oxygène de la souche *L. helveticus* R0052 lorsque le milieu MRS était enrichi avec de l'extrait de thé vert (ETV). Cette stimulation pourrait être causée, en partie, par la diminution du potentiel d'oxydo-réduction du milieu de culture par ajout d'ETV à différentes concentrations. L'ETV a donc eu un impact direct sur le milieu utilisé pour la croissance des bactéries. Les résultats d'analyses FTIR ont suggéré que l'ETV agirait aussi directement sur les cellules bactériennes en ayant un effet sur leurs lipides. Pour mieux comprendre les mécanismes d'action de l'ETV permettant une stimulation de la croissance de cette souche en présence d'oxygène, l'objectif de cette étude est d'étudier les effets de l'exposition des cellules bactériennes à l'oxygène et à différentes concentrations d'ETV sur leurs lipides et de mettre en évidence le ou les mécanismes de résistance à l'oxygène induits par l'ajout d'ETV.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article intitulé:

«Lipid modification in *Lactobacillus helveticus* cells in response to oxygen and green tea extract exposure».

Les auteurs sont: Hélène Gaudreau (candidate au doctorat: conception, planification, exécution des travaux pratiques, interprétation des résultats et rédaction de l'article scientifique), Dr. Claude P. Champagne et Dr. Gabriel E. Remondetto (co-directeurs: contribution à la planification des travaux de recherche, à la discussion des résultats et à la révision de l'article), Dr. Pedro A. Alvarez et Dr. Ahmed Gomaa (discussion des résultats d'analyse FTIR et révision de l'article) et Dr. Muriel Subirade (directrice: contribution à la planification des travaux de recherche, à la discussion des résultats et à la révision de l'article).

4.1 Résumé

L'exposition à l'oxygène durant la croissance et l'entreposage de bactéries probiotiques sensibles à ce composé peut causer une diminution de leur viabilité. Toutefois, une étude récente réalisée dans nos laboratoires a montré qu'une souche probiotique sensible à l'oxygène, *Lactobacillus helveticus* R0052, a eu une croissance équivalente en conditions aérobiques et anaérobiques lorsque le milieu de culture était enrichi de 250 ou 500 µg/mL d'extrait de thé vert (ETV). Dans le présent travail, l'impact de la concentration d'ETV (de 0 à 2000 µg/mL) et de l'exposition à l'oxygène sur les populations de la souche *L. helveticus* R0052 et sur les lipides cellulaires a été évalué par comptes viables, spectroscopie infrarouge et chromatographie en phase gazeuse. Les résultats obtenus ont montré que l'enrichissement du milieu de culture avec 500 µg/mL d'ETV a légèrement stimulé la croissance de la souche en conditions anaérobies et n'a pas eu d'effet significatif sur les lipides bactériens. Toutefois, à une concentration d'ETV de 2000 µg/mL, une augmentation significative des populations bactériennes obtenues à la fin des fermentations en présence d'oxygène est survenue ainsi qu'une augmentation de l'ordre des lipides bactériens et un changement significatif de leur composition en acides gras. Ces résultats suggèrent une interaction entre les catéchines de l'ETV et les lipides des cellules ainsi qu'une adaptation des cellules bactériennes à la présence de 2000 µg/mL d'ETV dans le milieu de culture par une modification de leurs lipides. Ces phénomènes auraient limité les effets de l'oxygène dissous sur les bactéries et ainsi stimulé la croissance de la souche en conditions aérobies. À notre connaissance, ce travail est le premier à établir un lien entre les effets d'un ETV sur les lipides d'une souche bactérienne sensible à l'oxygène et une stimulation de la croissance de cette souche en présence d'oxygène.

4.2 Abstract

Exposure to oxygen causes viability loss of oxygen-sensitive probiotic bacteria. Green tea extract (GTE), with its important antioxidant properties, could limit the effect of oxygen on those strains. A recent study in our laboratory demonstrated that a *Lactobacillus helveticus* strain with oxygen sensitivity was able to grow under aerobic conditions to the same extent than under anaerobic conditions when the culture medium was enriched with GTE at concentrations up to 500 µg/mL. In the present work, the effects of GTE concentrations (0 to 2000 µg/mL) and exposure to oxygen on populations of *Lactobacillus helveticus* R0052 and on bacterial lipids were evaluated using viable counts, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and gas chromatography analyses. Results showed that, at 500 µg/mL GTE, growth of the strain was slightly stimulated under anaerobic conditions and no significant effect was observed on the bacterial lipids. However, supplementation of the culture medium with 2000 µg/mL GTE resulted in high population levels reached following growth of the strain under aerobic conditions concomitant with an increase in bacterial lipid order and important changes in fatty acid composition of the bacterial lipids. Indeed, bacterial cells have adapted to the presence of a high concentration of GTE in the growth medium by changing their lipid composition. Interactions between GTE components and bacterial lipids were also shown by FTIR results. To the best of our knowledge, this work is the first to establish a relationship between the effects of GTE at 2000 µg/mL on bacterial cell's lipids and a stimulation of growth under aerobic conditions of an oxygen-sensitive strain.

4.3 Introduction

Green tea (*Camellia sinensis*) contains polyphenols which have been reported to have many potential health benefits such as cancer chemopreventing properties (Mukhtar and Ahmad, 2000, Yang *et al.*, 2002), anti-HIV (Nance and Shearer, 2003), anti-aging (Esposito *et al.*, 2002) and anti-inflammatory activities (Donà *et al.*, 2003). These health-promoting properties have been attributed, in part, to strong antioxidative activities of tea catechins (Jaziri *et al.*, 2009). The major catechins in green tea include (-)-epigallocatechin gallate, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin and (-)-epicatechin gallate (Kajjiya *et al.*, 2002). The antimicrobial activity of green tea and green tea catechins against a large spectrum of pathogenic bacteria is also well known (Hamilton-Miller, 1995; Kim *et al.*, 2013, Si *et al.*, 2006, Radji *et al.*, 2013, Sharma *et al.*, 2012). In contrast, these products had no inhibitory effect on many beneficial bacteria (Jaziri *et al.*, 2009; Almajano *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2008). Evidence suggests that green tea catechins may even stimulate the growth of some beneficial bacteria both in *in vitro* (Vodnar *et al.*, 2012) and in *in vivo* either in animal (Hara *et al.*, 1995; Ishihara *et al.*, 2001) or in human studies (Okubo *et al.*, 1992; Jin *et al.*, 2012). Moreover, a recent study in our laboratory demonstrated that a probiotic strain with oxygen sensitivity, *Lactobacillus helveticus* R0052, was able to grow under aerobic conditions (Gaudreau *et al.*, 2013) to the same extent than under anaerobic conditions when the culture medium was enriched with a green tea extract (GTE) at concentrations up to 500 µg/mL. The important ability of tea catechins to scavenge oxygen and nitrogen species (Frei and Higdon, 2003; Wiseman *et al.*, 1997), to chelate metal ions known to catalyze many processes leading to the appearance of free radicals (Saija *et al.*, 1995) and to decrease the oxido-reduction potential of the growth medium (Gaudreau *et al.*, 2013) could explain in part stimulation of the growth observed under aerobic conditions. Preliminary Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopic analyses suggested that the effects of GTE could also involve the bacterial cell membrane's lipids.

The modulation, by catechins, of the physical structure of phospholipid model bilayers has been demonstrated in several studies (Caturla *et al.*, 2003; Kajjiya *et al.*, 2002; Kumazawa *et al.*, 2004) but their effects on the lipids of bacterial cells have been less

studied (Bernal *et al.*, 2010; Zhao and Shah, 2014b). FTIR spectroscopy can be employed to study the interactions between a compound and phospholipid model membranes (Gaussier *et al.*, 2003; Lefèvre and Subirade, 2000 and 2001) or living bacterial cells (Feo *et al.*, 2004; Santivarangkna *et al.*, 2010). This technique is also a useful tool to monitor the properties of bacterial membranes in changing environments (Ami *et al.*, 2009; Beney *et al.*, 2004; Scherber *et al.*, 2009) and structural changes in bacterial cells after exposure to stress conditions (Alvarez-Ordóñez and Prieto, 2010; Kamnev, 2008) because FTIR spectra of bacterial cells reflect the biochemical composition of their cellular constituents (Naumann, 2000). In this study, FTIR was employed to monitor the effects of GTE and of dissolved oxygen exposure on the structure and order of lipids of *Lactobacillus* cells. Moreover, the impact of GTE exposure on the composition of bacterial cell lipids was studied by gas chromatography analyses. In this context, the objective of the present work was to employ viable counts, FTIR spectroscopy and fatty acid analysis to study the impacts of aeration conditions (aerobic versus anaerobic) and of GTE concentration in the culture medium on *L. helveticus* R0052 populations and on the lipids of these bacterial cells.

4.4 Materials and Methods

4.4.1 Microorganism and culture conditions

Lactobacillus helveticus R0052 was kindly provided, in a frozen vial, by Lallemand-Health Solutions Inc. (formerly Institut Rosell, Montreal, Qc, Canada). The thawed culture (1 mL) was added to 9 mL of lactobacilli MRS broth (EMD Millipore, Billerica, MA) + L(+) ascorbic acid (0.1%), and incubated at 37°C in an anaerobic jar containing Anaerogen sachets (Oxoid, Nepean, ON, Canada) until the pH of the medium reached 4.5. One subculture was carried out in identical conditions. Stock cultures were prepared by mixing the fresh subculture with sterile 20% (w/v) glycerol and sterile 20% (w/v) reconstituted skim milk in a ratio 2:5:5, with subsequent storage at -80°C in portions of 1 mL placed in 2mL CryosTM vials (Greiner Bio-one, Monroe, NC).

Before each independent assay, fresh cultures were prepared by adding one thawed stock culture to 9 mL of lactobacilli MRS broth + ascorbic acid (0.1%), and incubating 10 h at 37°C in an anaerobic jar containing Anaerogen sachets (Oxoid). A pH close to 4.5 was reached under these inoculation and incubation conditions.

4.4.2 Preparation of green tea extract solutions

Aqueous green tea extract (GTE) solutions were prepared by solubilising, in deionized water, a GTE purchased from the Pharmacie des Vosges (Nice, France). This solution was centrifuged (RC3C, Sorvall Instrument, Dupont, Wilmington, DE) at 7800 rpm for 10 min at room temperature in order to remove insoluble components. Supernatant fluids were sterilized by filtration through 0.45µm filter units (Sterile AcrodiscR. # 4654 Syringe filters, Pall, Mississauga, ON, Canada). A solution of 50 mg/mL GTE contained 4.9 mg/mL epigallocatechin gallate, 3.5 mg/mL gallocatechin gallate, 2.3 mg/mL epigallocatechin, 1.4 mg/mL epicatechin gallate, 0.7 mg/mL epicatechin and 3.7 mg/mL caffeine (Rozoy *et al.*, 2013b).

4.4.3 Effects of aeration conditions and GTE concentration in the culture medium on biomass production by *L. helveticus* R0052 cells and on cell lipids

A 1% inoculum of a fresh culture was grown at 37°C in MRS broth supplemented with different concentrations of GTE (0, 250, 500, 1000 and 2000 µg/mL). These concentrations were selected because a previous study (Gaudreau *et al.*, 2013) has shown that GTE had no negative effect on growth rates of *L. helveticus* R0052 at concentrations up to 500 µg/mL, but increased the biomass levels when up to 1000 µg/mL GTE was added. Aerobic broth cultures were continuously shaken at 140 rpm (Labline Orbit Environ-shaker, Melrose Park, IL). Anaerobic growth was performed in anaerobic jars containing Anaerogen sachets (Oxoid). All liquid cultures were grown in 50 mL test tubes with a tube volume to fluid volume ratio of 2:1. Fermentations were stopped when the cultures had attained the beginning of the stationary growth phase, i.e. when the pH of the culture media was close to 4.5. Three independent replicate experiments were carried out for each treatment and the data presented are the average of these three assays. Viable counts, fatty acids and FTIR analyses were carried out on samples obtained at the end of the fermentations. Dissolved oxygen concentration analyses were carried out on the culture media at the beginning and at the end of fermentations.

4.4.4 Effect of a short time exposure of *L. helveticus* R0052 cells to GTE

Fresh cultures of *L. helveticus* R0052 were prepared as described previously in an anaerobic environment. Cells were harvested by centrifugation at 3500 rpm for 5 min at 4°C. Following two washes with deionized water and subsequent centrifugation, bacterial pastes were suspended in MRS containing 0 or 2000 µg/mL GTE and incubated 30 min at 37°C in the presence of oxygen. FTIR analyses were carried out on bacterial cells. Three independent replicate experiments were carried out for each treatment.

4.4.5 Analyses

Viable counts

Viable counts on samples taken at the end of fermentations were obtained by plating appropriate dilutions (0.1% sterile peptone) in MRS agar (EMD Millipore, Billerica, MA). Plates were incubated at 37°C for 48 h in anaerobic jars containing Anaerogen sachets (Oxoid).

Dissolved oxygen

Dissolved oxygen in broths was measured using a VWR Symphony electrode (VWR Scientific Products, West Chester, PA, cat. No. 14002-800) mounted with the specified membrane and filled with the supplied DO electrolyte solution (cat. no. 14002-830). The electrode was connected to a VWR Symphony SP50D portable DO meter.

Fatty acids analysis

Total lipids were extracted according to the method developed by Lewis *et al.* (2000) after adaptations. Cells were harvested by centrifugation at 3500 rpm for 5 min at 4°C and washed with a 1% NaCl solution. Cell pellets were extracted for lipids in glass tubes to which a total of 11.4 mL were added in the following sequence: chloroform, methanol and potassium phosphate buffer (0.05M, pH 7.5) to achieve final chloroform: methanol: phosphate buffer concentrations of 1: 2: 0.8 (v/v/v). Samples were Vortex-mixed for 15 s following the addition of each solvent and allowed to stand in the darkness for about 18 h at 5°C. The mixtures were filtrated with 2.5µm pore size membranes (Scliecher and Schuell Bioscience Inc., Keene, NH) to remove residues. The lipids were then partitioned by addition of chloroform and saturated NaCl solution (3.5%) to obtain a final chloroform: methanol: aqueous phase ratio of 1: 1: 0.9. The lower organic phases were recovered and filtered through monstr-pette pipettes filled with about 1 cm glass wool and 1 cm anhydrous sodium sulfate (Anachemia Canada, Lachine, Qc, Canada). The total lipid extracts were dried under a gentle stream of nitrogen and dissolved in 1 mL hexane. Lipids were then methylated by addition of 500 µL of a 0.5N sodium metoxide solution

in methanol (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) followed by a heat treatment of 15 min at 45°C. The lipids were partitioned by addition of chloroform (4 mL) and saturated saline (5 mL). The lipid phases were recovered and filtered through Pasteur pipettes filled with about 1 cm delipidated cotton and 1 cm anhydrous sodium sulfate (Anachemia Canada, Lachine, Qc, Canada). Hexane (5 mL) was added to the filtrated lipids and the lipid phase was recovered and filtered through Pasteur pipettes filled with delipidated cotton and anhydrous sodium sulfate. The resulting fatty acid methyl esters (FAME, 1 µL) were analyzed by gas chromatography using a Hewlett-Packard serie II (Mississauga, ON, Canada) gas chromatograph equipped with a BPX-70 capillary column (SGE, Melbourne, Australia, 25 m x 0.22 mm i.d., 0.25 µm film thickness) with a flame ionization (FID; at 250°C) and a splitless detector. The oven temperature was: 60°C for 1 min; 5°C/min up to 210°C for 15 min. Hydrogen was used as carrier gas under a constant head pressure of 100 kPa. Identification was performed by comparison with spectra of a FAMEs standard mixture (GLC-607, Nu Chek Prep, Elysian, MN) analyzed under the same conditions.

Identification of fatty acid methyl esters was verified and completed by GC-MS analysis using a Hewlett Packard HP 6890 model gas chromatograph and equipped with an Agilent (Mississauga, ON, Canada) mass selective detector model 5973N. The column used and the analysis conditions were as presented above for GC analyses except that the split ratio was 25:1. The mass spectra were recorded at an electron energy of 70 eV. The ion source, transfer line and quadrupole temperatures were 230°C, 170°C and 150°C respectively. The mass range used was 30 to 450 amu. Identification was performed by comparison with mass spectra of the NIST2005 MS database and of a BAME mixture (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) and CLA pure standards (Nu-Chek Prep, Elysian, MN) analyzed under the same conditions.

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy

Cells were harvested after fermentation by centrifugation at 3500 rpm for 5 min at 4°C and quickly washed two times with deionized water in order to prevent interferences from

media components and bacterial metabolites in the FTIR spectra. A thin layer of a bacterial cell pellet was spread on a CaF₂ window and stove-dried (15 min, 50°C). These drying duration and temperature were used according to Alvarez-Ordóñez and Prieto (2010). Infrared spectra were recorded at room temperature with a Magna 560 Nicolet spectrometer (Madison, WI) equipped with a liquid nitrogen cooled mercury-cadmium-telluride (MCT) detector. The sample chamber of the spectrometer was continuously purged with dried and CO₂-free air to prevent atmospheric water vapor obscuring the bands of interest. Spectra were recorded in the mid-IR region over the range of 900 to 4000 cm⁻¹ at a resolution of 2 cm⁻¹. Each spectrum represented an average of 128 accumulated scans and was apodized with a triangular function. Spectral processing was performed using Omnic software (version 7, Thermo Electron Corporation) and Varian Resolution Pro 4.0 (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada). Water vapor subtraction was undertaken when required. Spectra were baseline-corrected and the wavenumber of any given bands was determined using the peak maximum function in the Omnic software. Spectra were normalized against the protein amide I peak area (1720-1600 cm⁻¹) since normalization eliminates path length variation and also reduces differences in measurement for a same sample (Davis and Mauer, 2010). Three independent replicates were run for each treatment and the data presented are the means of these three assays.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SigmaPlot software (Systat Software Inc., San Jose, CA) on all results obtained. One-way analyses of variance at the significance level of 0.05, followed by Holm-Sidak tests, were performed. Paired-T tests were also carried out to specifically compare two groups of results.

4.5 Results and Discussion

4.5.1 Effects of aeration conditions and GTE concentration in the culture medium on biomass production.

The effect of GTE addition to a MRS medium on growth parameters of *Lactobacillus helveticus* R0052 cells had already been determined in a previous study (Gaudreau *et al.*, 2013), by measuring the maximal optical densities and growth rates of cells as a function of GTE concentration and growth conditions (aerobic and anaerobic conditions). The important increase in maximal optical densities obtained, under aerobic conditions, by enrichment of the growth medium with GTE as compared with unsupplemented MRS suggested an increase in biomass production of cells in GTE enriched media. In order to quantify the impact of GTE and of the growth conditions on biomass production, the effect of GTE concentration and of aeration conditions on final bacterial populations was studied in this work.

The culture medium was inoculated at 1% with a fresh culture which gave initial cell counts around Log 7.2 CFU/mL, and growth occurred in all instances. The aeration conditions during growth in unsupplemented MRS had a significant effect ($P= 0.01$) on the populations obtained. Indeed, the maximal population reached under anaerobic conditions in this medium was 4 times higher than the one obtained under aerobic conditions (Figure 4.1). It should be noted that an important drop in the dissolved oxygen concentration from 3.9 ± 0.2 mg/L to 0.4 ± 0.1 occurred in all of the culture media during fermentation under aerobic conditions. The GTE concentration in the culture medium had also an impact on bacterial populations reached at the end of fermentation. When cultures were grown under anaerobic conditions, CFUs increased in media containing up to 500 $\mu\text{g/mL}$ GTE. The maximal population reached in MRS + 500 $\mu\text{g/mL}$ GTE was 2.7 times higher than the one obtained in unsupplemented MRS, and paired t tests between CFUs for each assay showed this to be statistically significant ($P = 0.02$). Supplementation of the medium with other concentrations of GTE did not have a significant effect on CFUs obtained ($P > 0.05$) during growth under anaerobic conditions. Under aerobic conditions, enrichment of the culture medium with GTE at concentrations between 0 and 1000

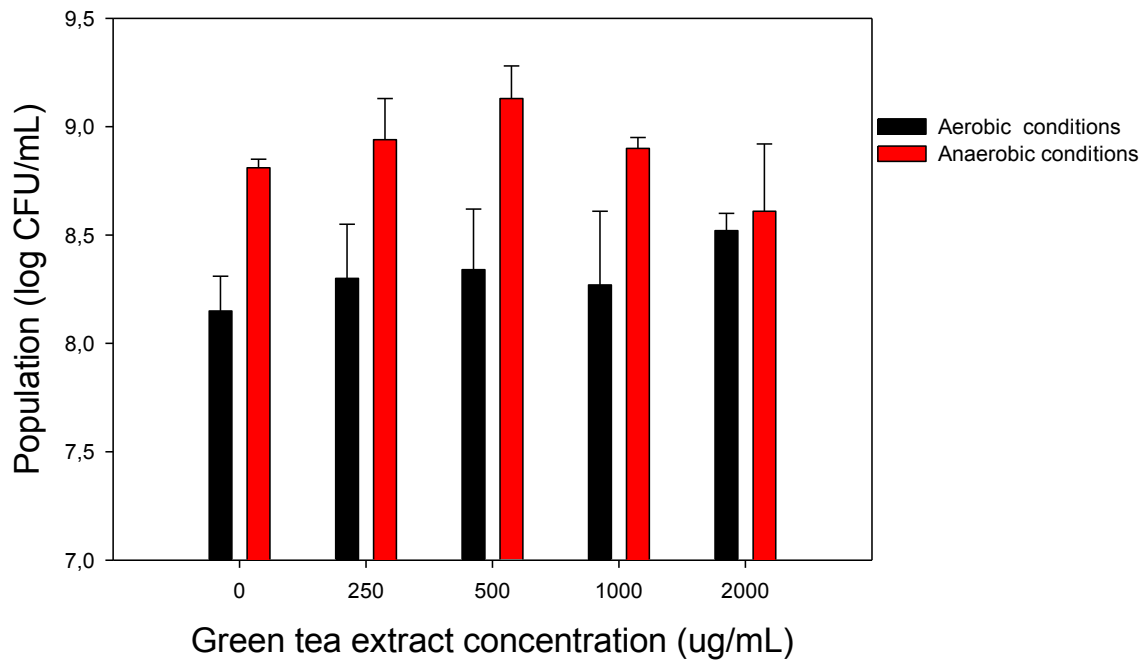


Figure 4.1: Influence of GTE concentration on maximal populations (in log CFU/mL) obtained for *L. helveticus* R0052 cells grown 10 h at 37°C in MRS medium under anaerobic or aerobic conditions. Error bars represent standard deviation.

$\mu\text{g/mL}$ also did not have a significant effect on maximal populations obtained ($P > 0.05$). Nevertheless, at $2000 \mu\text{g/mL}$ GTE, CFUs were almost 3 times higher than those obtained in unsupplemented MRS ($P < 0.05$). Additionally, at this GTE concentration, maximal populations obtained were not significantly different when cells were grown under anaerobic or aerobic conditions ($P > 0.05$).

The lower populations obtained for cells grown under aerobic conditions compared to those grown under anaerobic conditions confirmed the oxygen sensitivity of the strain as previously observed (Gaudreau *et al.*, 2013) but oxygen exposure, under the conditions tested, was not lethal for the bacteria. *L. helveticus* R0052 is a facultative anaerobic organism (Smith, 2014). The lower population obtained when cells were incubated under aerobic conditions without catechins (Figure 4.1) could be due to the fact that, in the presence of oxygen, many *Lactobacillus* strains produce hydrogen peroxide (H_2O_2 ; Marty-Teyssset *et al.*, 2000) which is a major detrimental metabolite resulting from the physiological use of oxygen in lactic cultures (Talwalkar and Kalaisapathy, 2003a). Unfortunately, most lactobacilli do not produce catalase (Podlešný *et al.*, 2011), an enzyme essential for the breakdown of H_2O_2 (Da Cruz *et al.*, 2007). Moreover, oxygen radicals produced when cells are grown under aerobic conditions can damage bacterial cell membrane phospholipids (Sigler *et al.*, 1999) leading to lipid peroxidation, cell leakage and death. Nevertheless, some *L. helveticus* strains have antioxidative defense systems involving excision of endonucleases (Cappa *et al.*, 2005) and/or involving the activation of a membrane-associated oxygen-consuming defensive desaturase system (Guerzoni *et al.*, 2001). Moreover, NADH oxidase and NADH peroxidase are present in a wide variety of lactic acid bacteria including *Lactobacillus* (Sakamoto and Komagata, 1996). These enzymes catalyze the reduction of O_2 molecules to H_2O_2 and decompose H_2O_2 to H_2O (Condon, 1987). The activity of these enzymes could explain, in part, the drop in dissolved oxygen concentration in culture media observed for fermentations carried out under aerobic conditions. However, as a function of the defense systems that exist in a particular strain, an accumulation of H_2O_2 can still occur due to the overall activity of an H_2O_2 -production system being greater than that of an H_2O_2 -elimination

system (Sakamoto and Komagata, 1996). This presumably occurred for cells grown in presence of oxygen and without catechins.

In addition to the bacteria's natural defenses, the detrimental effect of oxygen can be limited by addition of antioxidants in the medium (Dave and Shah, 1997b; Gaudreau *et al.*, 2013). Therefore, the higher viable counts reached for cells grown under aerobic conditions in MRS containing 2000 µg/mL GTE in comparison with those grown in unsupplemented MRS could be due to the important antioxidant properties of tea catechins (Armoskaite *et al.*, 2011). An increase in biomass production by a *L. casei* strain grown in the presence of oxygen in MRS media supplemented with green tea leaves extracts was also observed by Vodnar *et al.* (2012). Tea catechins could protect cells in three fashions: 1) act as antioxidants by sequestering metal ions such as iron ions that are known to catalyze many processes leading to the appearance of free radicals (Saija *et al.*, 1995), 2) scavenge reactive oxygen species and nitrogen species (Frei and Higdon, 2003; Wiseman *et al.*, 1997) and 3) modulate the structure of phospholipids of cell membranes. Indeed, catechins have been shown to modulate the structure of phospholipid model membranes (Caturla *et al.*, 2003; Kajiya *et al.*, 2001 and 2002; Kumazawa *et al.*, 2004) and could potentially modulate the lipids of cell membranes. In order to verify the third hypothesis, the structure of cellular lipids were investigated using FTIR spectroscopy.

4.5.2 Effects of aeration conditions and GTE concentration in the culture medium on the conformational order and structure of bacterial lipids.

FTIR spectra

The maximal wavenumber values of the bands on FTIR spectra provide information about the structure, conformation and intermolecular interactions (Cakmak *et al.*, 2006) of components of bacteria, whereas signal intensity, and more accurately the area under each band, give information about the amount of the functional groups responsible for the corresponding band (Garip *et al.*, 2007). Figure 4.2 shows a representative spectrum (4000-1000 cm⁻¹) of *L. helveticus* R0052 cells grown in unsupplemented MRS at 37°C

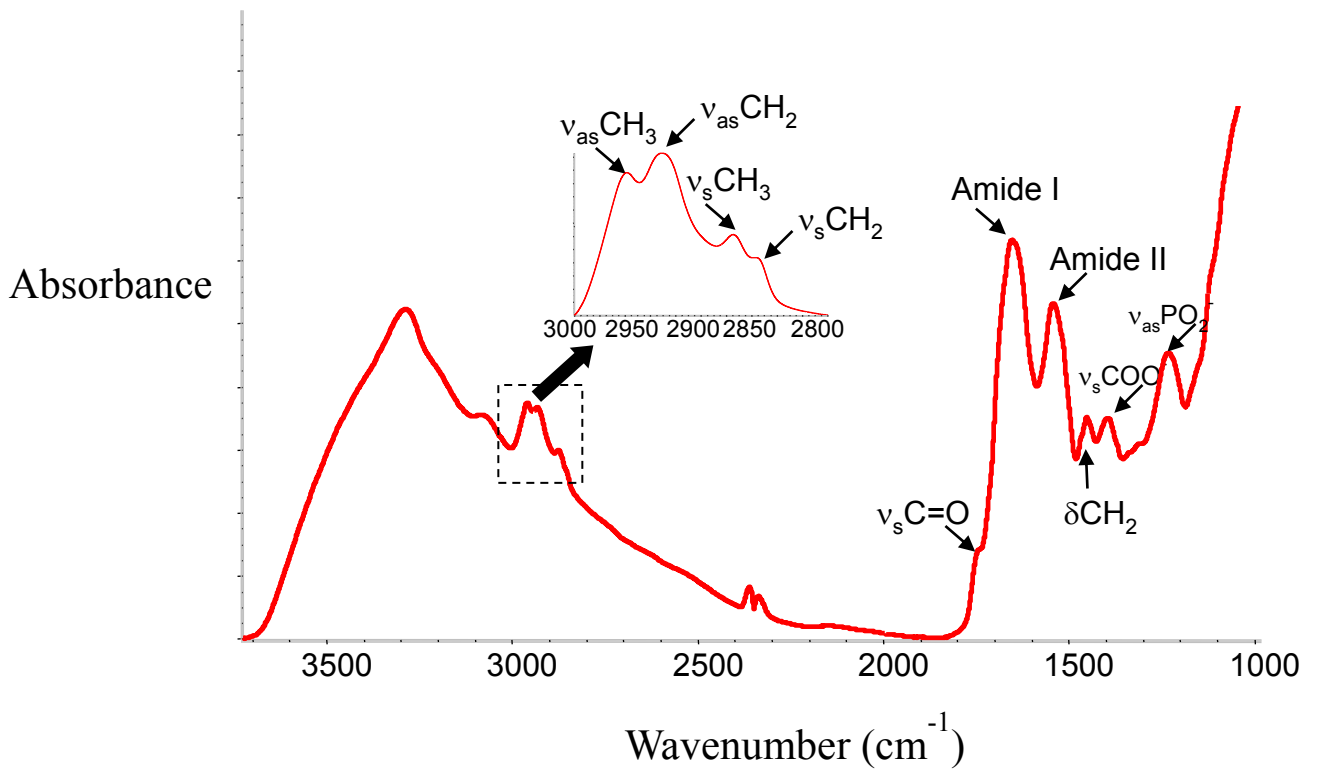


Figure 4.2: Representative FTIR spectrum of *L. helveticus* R0052 cells grown under anaerobic conditions in unsupplemented MRS culture medium. The inset shows the CH₂ and CH₃ asymmetric and symmetric stretching bands. v_{as}= asymmetric stretch, v_s = symmetric stretch, δ = symmetric bending. The band assignments were based on Davis and Mauer (2010).

and under anaerobic conditions. This spectrum is similar to the spectra previously reported for other bacteria (Al-Qadiri *et al.*, 2008; Baldauf *et al.*, 2007; Zhao et Shah, 2014a; Zoumpopoulou *et al.*, 2010). Band assignments were made according to Davis and Mauer (2010) and are provided in Table 4.1.

Table 4.1: Assignment of functional groups associated with major vibration bands in mid-IR spectra of bacteria (adapted from Davis and Mauer, 2010).

Wavenumber (cm ⁻¹)	Molecular vibrations of functional groups and the biomolecule contributor
2955	C-H asymmetric stretching of >CH ₃ in fatty acids
2930	C-H asymmetric stretching of >CH ₂ in fatty acids
2870	C-H symmetric stretching of >CH ₃ in fatty acids
2850	C-H symmetric stretching of >CH ₂ in fatty acids
1740	>C=O stretching of lipid esters
1695-1675	Amide I band components of proteins
1550-1520	Amide II band of proteins
1455	C-H deformation of >CH ₂ in lipids and proteins
1400	C=O symmetric stretching of COO ⁻ group in amino acids, fatty acids
1240	P=O asymmetric stretching of phosphodiester in phospholipids

The spectral region between 3000 and 2800 cm⁻¹ is composed of four bands assigned to the asymmetric ($\nu_{as}CH_2$) and symmetric (ν_sCH_2) C-H stretching vibrations of the CH₂ groups and to the asymmetric ($\nu_{as}CH_3$) and symmetric (ν_sCH_3) C-H stretching vibrations of CH₃ groups in fatty acids (Davis and Mauer, 2010). Little contribution from functional groups of proteins, carbohydrates and nucleic acids occurs in this spectral region (Wang *et al.*, 2012). The wavenumbers of the $\nu_{as}CH_2$ and ν_sCH_2 are conformation sensitive (Mantsch and McElhaney, 1991) and thus provide information about the conformational order of the lipid acyl chains. A shift in the bands corresponding to those functional groups to higher wavenumbers implies introduction of disorder in the lipid acyl chains (Lewis and McElaney, 1998). Moreover, shifts in the bands associated with the CH₂, C=O and PO₂⁻ groups stretching vibrations simultaneously provide information about changes that occur, respectively, in the hydrophobic, interfacial and polar head group regions of the lipid bilayer of the bacterial membranes (Lewis and McElhaney, 1996; Popova and

Hincha,2003). A shift of bands corresponding to those functional groups demonstrates the effect of the growth conditions and environment on bacterial lipids. Thus, to investigate the relationship between the effects of the aeration conditions and GTE concentration on the structure and conformation of lipids in whole bacterial cells, the spectral bands influenced by molecular vibrations of those functional groups in fatty acids were studied.

Effects of the aeration conditions

Figure 4.3 shows normalized spectra of bacterial cells grown under anaerobic and aerobic conditions in unsupplemented MRS. The wavenumber of the $\nu_{as}CH_2$ stretching vibration band for cells grown under aerobic conditions was significantly higher ($P = 0.01$) than the one recorded for cells grown under anaerobic conditions. A shift to a lower wavenumber of the band assigned to the C=O stretching vibration ($\sim 1740\text{ cm}^{-1}$) of lipids for cells grown under aerobic conditions relative to those grown under anaerobic conditions also shows the effect of aerobic conditions on bacterial cell lipids. The wavenumbers of the other bands corresponding mainly to the functional groups of bacterial lipids were not significantly different for bacterial cells grown under both aeration conditions.

The fatty acids (FA) in microorganisms are mostly in the form of phospholipids and are mainly found in cell membranes (Melin *et al.*, 2001). As such, the obtained results reflect the effects of aeration conditions during growth on membrane lipids of the bacterial cells. Therefore, the shift to a higher wavenumber of the $\nu_{as}CH_2$ groups stretching bands for cells grown under aerobic conditions in comparison with those grown under anaerobic conditions (Figure 4.3) suggests a decrease in the acyl chain order of the membrane lipids. This phenomenon, also observed in our previous study (Gaudreau *et al.*, 2013), could be due to exposure of membrane lipids to oxidant species that may lead to radical propagation reactions resulting in accumulation of oxidized phospholipids (Wratten *et al.*, 1992) which could have shorter lipid tails due to the presence of aldehyde or hydroperoxide groups (Porter *et al.*, 1995).

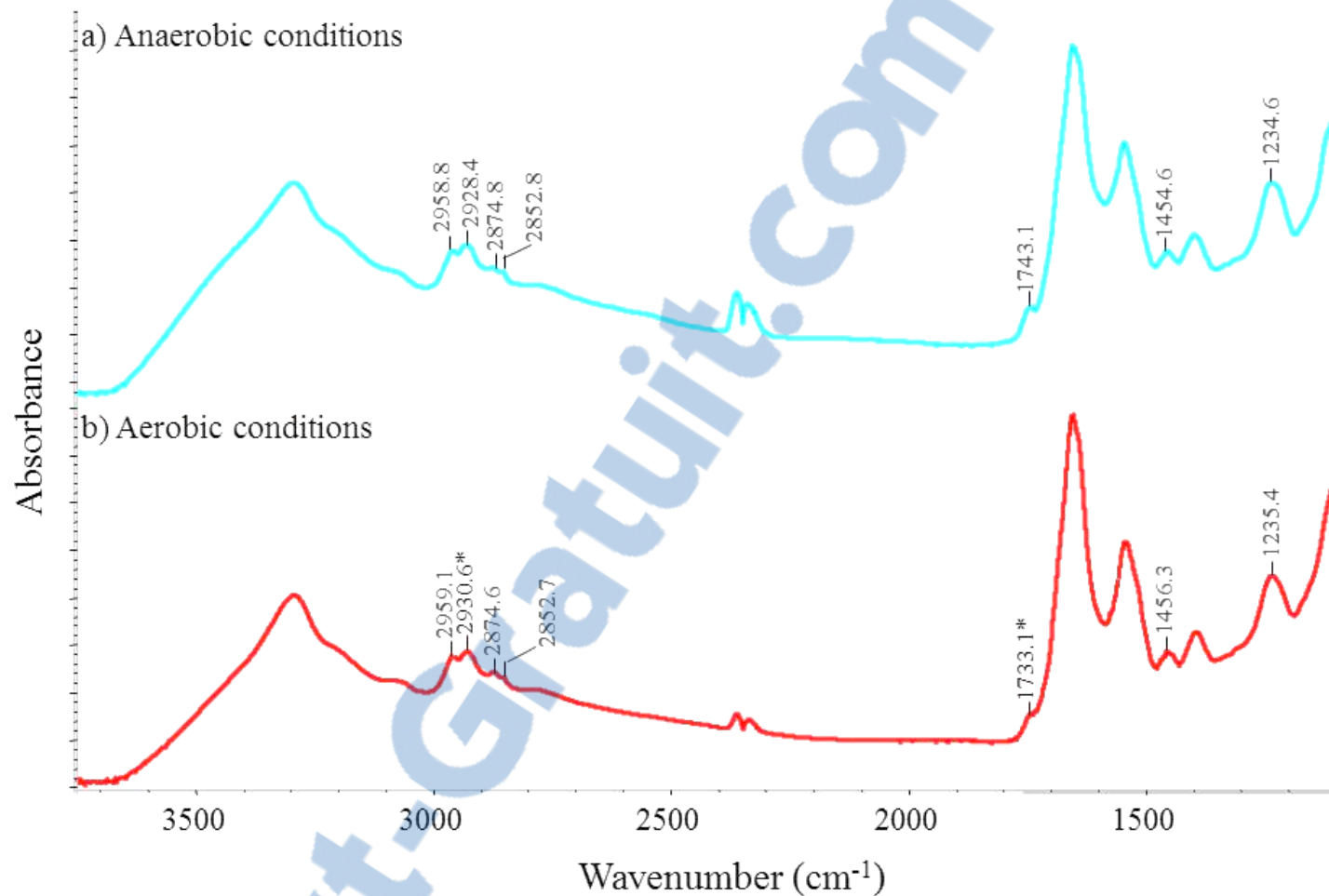


Figure 4.3: Normalized FTIR spectra of *L. helveticus* R0052 cells grown under anaerobic and aerobic conditions in unsupplemented MRS medium. Asterisks above a wavenumber for cells grown under aerobic conditions indicate significant difference ($P > 0.05$) compared with the wavenumber of the same band for cells grown under anaerobic conditions.

Chain shortening is known to increase membrane fluidity (Russel *et al.*, 1995) and, then, to decrease the acyl chain order. A reduction in acyl chains ordering was also reported by Wong-ekkabut *et al.* (2007) and Wratten *et al.* (1992) when oxidized phospholipids accumulated in model membranes. The suggested decrease in lipid order of the bacterial membranes could also be due to a bacterial response to the aerobic conditions encountered during cells growth.

Effects of GTE concentrations

Figures 4.4a and 4.4b show the acyl chain regions of spectra of cells grown under anaerobic and aerobic conditions in MRS with 0 to 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE. For both aeration conditions tested, the spectra for cells grown in media enriched with 0 to 1000 $\mu\text{g/mL}$ GTE were similar. However, the intensities of the bands measured for cells grown in MRS enriched with 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE were higher than those of cells grown in unsupplemented MRS. Moreover, the difference in intensities of the bands corresponding to $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ and $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ stretching bands was clearly more important for cells grown in MRS + 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE than in unsupplemented MRS. The higher calculated ratios $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3/\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ band areas of 0.60 ± 0.03 and 0.60 ± 0.02 for cells grown in unsupplemented MRS under anaerobic and aerobic conditions, respectively, as compared with the ratios measured for cells grown in MRS enriched with 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE under anaerobic (0.46 ± 0.05) and aerobic (0.47 ± 0.07) conditions confirm the effect of GTE at this concentration on bacterial cell lipids. The maximal wavenumbers of bands corresponding to functional groups in bacterial lipids were also determined and are presented in Table 4.2. For cells grown under anaerobic conditions, the global effect of GTE addition was barely judged as being not significant. Nevertheless, paired t tests showed that the $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ bands wavenumbers of cells grown in media containing 0 and 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE are significantly different ($P = 0.03$). A significant shift (3.8 cm^{-1} ; $P = 0.01$) of the $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ stretching band wavenumber of cells grown under aerobic conditions in MRS + 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE relative to the one of cells grown in unsupplemented MRS was also observed.

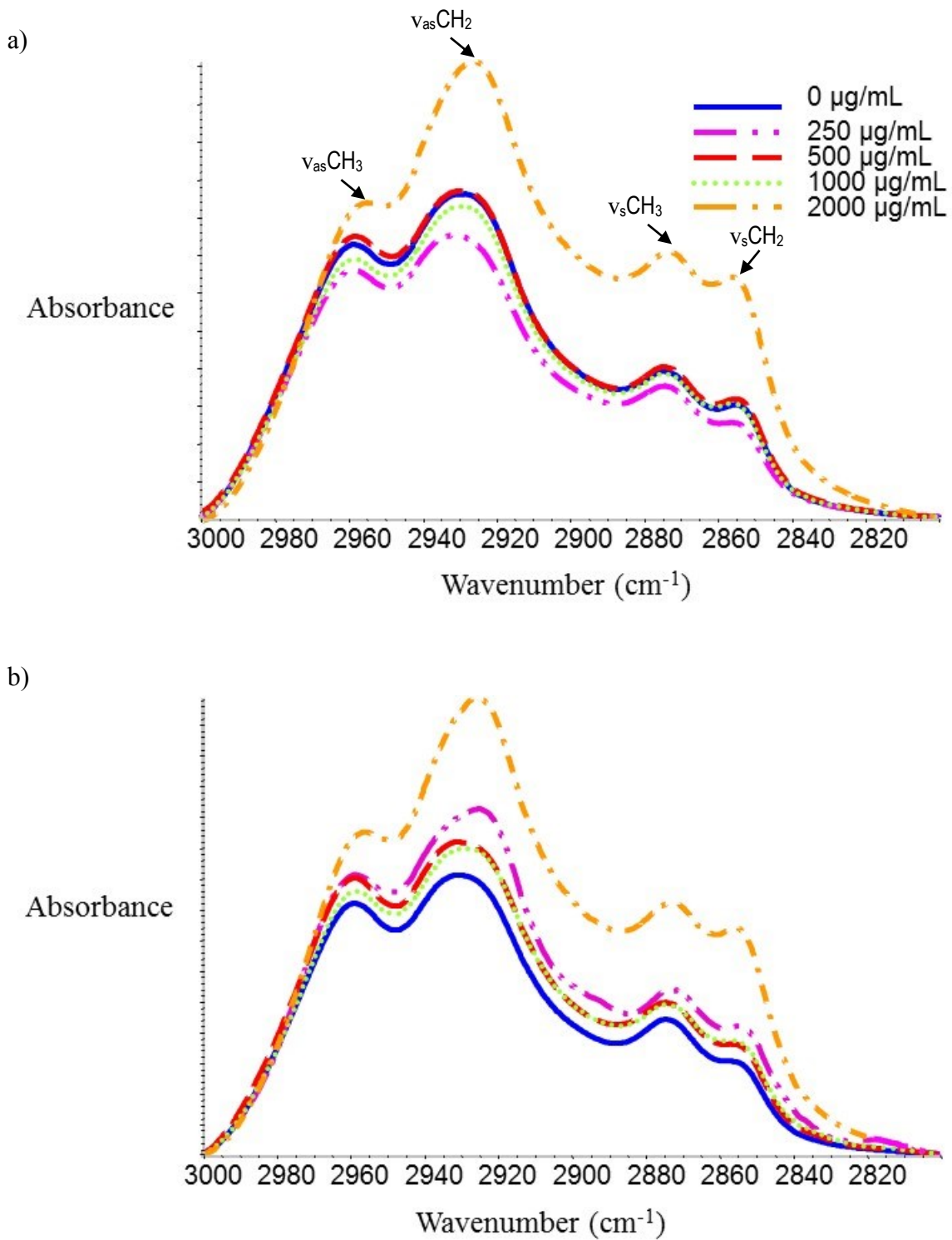


Figure 4.4: Normalized FTIR spectra (3000-2800 cm⁻¹) of *L. helveticus* R0052 cells grown under (a) anaerobic and (b) aerobic conditions in MRS culture medium supplemented with GTE at concentrations from 0 to 2000 µg/mL.



Table 4.2: Mean wavenumbers of the FTIR bands corresponding mainly to lipid functional groups of *L. helveticus* R0052 cells grown about 10 h at 37°C in MRS containing different concentrations of GTE.

Functional groups	Aeration conditions	GTE concentration (µg/mL)				
		0	250	500	1000	2000
CH ₃ asymmetric stretching	Aerobic	2959.1 ± 0.1 a	2959.1 ± 0.2 ab	2959.1 ± 0.1 ab	2958.8 ± 0.1 ab	2957.8 ± 1.2 b
	Anaerobic	2958.8 ± 0.3 a	2959.0 ± 0.2 a	2958.9 ± 0.2 a	2958.7 ± 0.3 a	2956.6 ± 0.9 b
CH ₂ asymmetric stretching	Aerobic	2930.6 ± 0.2 a	2931.0 ± 0.4 a	2931.1 ± 0.8 a	2929.2 ± 1.5 ab	2926.8 ± 1.6 b
	Anaerobic	2928.4 ± 0.1 a	2930.3 ± 1.8 a	2930.1 ± 1.4 a	2928.3 ± 2.2 a	2926.6 ± 0.6 a
CH ₃ symmetric stretching	Aerobic	2874.6 ± 0.1 a	2874.7 ± 0.1 a	2874.8 ± 0.2 a	2874.7 ± 0.3 a	2873.2 ± 1.4 a
	Anaerobic	2874.8 ± 0.2 a	2874.5 ± 0.1 a	2874.6 ± 0.1 a	2874.0 ± 0.9 a	2873.9 ± 0.8 a
CH ₂ symmetric stretching	Aerobic	2852.7 ± 0.7 a	2853.0 ± 0.4 a	2852.8 ± 0.2 a	2852.9 ± 0.5 a	2853.0 ± 0.4 a
	Anaerobic	2852.8 ± 0.4 a	2853.1 ± 0.5 a	2853.1 ± 0.3 a	2853.3 ± 0.1 a	2852.9 ± 0.9 a
CH ₂ bending	Aerobic	1455.7 ± 1.1 a	1453.6 ± 1.3 ab	1454.3 ± 0.6 ab	1453.6 ± 1.0 b	1454.6 ± 0.8 ab
	Anaerobic	1455.2 ± 2.6 a	1455.8 ± 0.2 a	1455.6 ± 0.3 a	1455.8 ± 0.1 a	1454.9 ± 1.4 a
PO ₂ ⁻ asymmetric stretching	Aerobic	1237.6 ± 0.6 a	1237.5 ± 1.2 a	1237.2 ± 0.7 ab	1236.4 ± 0.6 ab	1234.6 ± 1.5 b
	Anaerobic	1236.6 ± 0.1 a	1236.8 ± 0.9 a	1237.9 ± 0.2 a	1237.3 ± 0.7 a	1234.5 ± 0.1 b

a,b: For a given row, data (± standard deviation) followed by the same letter are not significantly different (P > 0.05).

Maximal wavenumbers of the $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ and of the $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ stretching bands were also significantly lower for cells grown, under both aeration conditions, in MRS supplemented with 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE as compared to unsupplemented MRS (Table 4.2). The maximal wavenumbers of the C=O groups of lipid esters stretching bands were difficult to determine due to the high amide I absorption band on the spectra. Therefore, a second derivative transformation was performed in the spectral region corresponding to these functional groups (1770-1730 cm^{-1}). This transformation is often carried out to process spectral data in order to separate overlapping absorption bands, remove baseline shifts and increase apparent spectral resolution (Lin *et al.*, 2004). Thus, the second-derivative spectra of cells grown in MRS supplemented with different concentrations of GTE are presented in Figure 4.5. The addition of GTE to the culture medium at concentrations up to 1000 $\mu\text{g/mL}$ did not have a significant effect on the spectra of bacterial cells in this region compared with those of cells grown in unsupplemented MRS. However, an important shift in the bands corresponding to these functional groups to lower wavenumbers occurred for cells grown in MRS supplemented with 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE.

Although supplementation of the growth medium with GTE at concentrations ranging from 0 to 1000 $\mu\text{g/mL}$ had no marked effect on the structure and conformation of bacterial lipids, significant effects on the hydrophobic, interfacial and polar head groups region in the lipids of the bacterial cells grown in MRS + 2000 $\mu\text{g/mL}$ were observed. The decrease in the relative areas of the $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ compared to $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ stretching vibration bands observed for cells grown in MRS + 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE (Figure 4.4 a and b) relative to those of cells grown in unsupplemented MRS indicates a lower methyl contribution and higher methylene contribution to the FA spectral region. This suggests an increase in FA chain length (Coates, 2000) in bacterial cell lipids due to exposure to 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE. Similar spectral changes were also observed by Zhao and Shah (2014a) in their study on the effects of green tea in culture medium (ratio green tea powder: culture medium of 1:50 w/v) on the growth of a *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* strain.

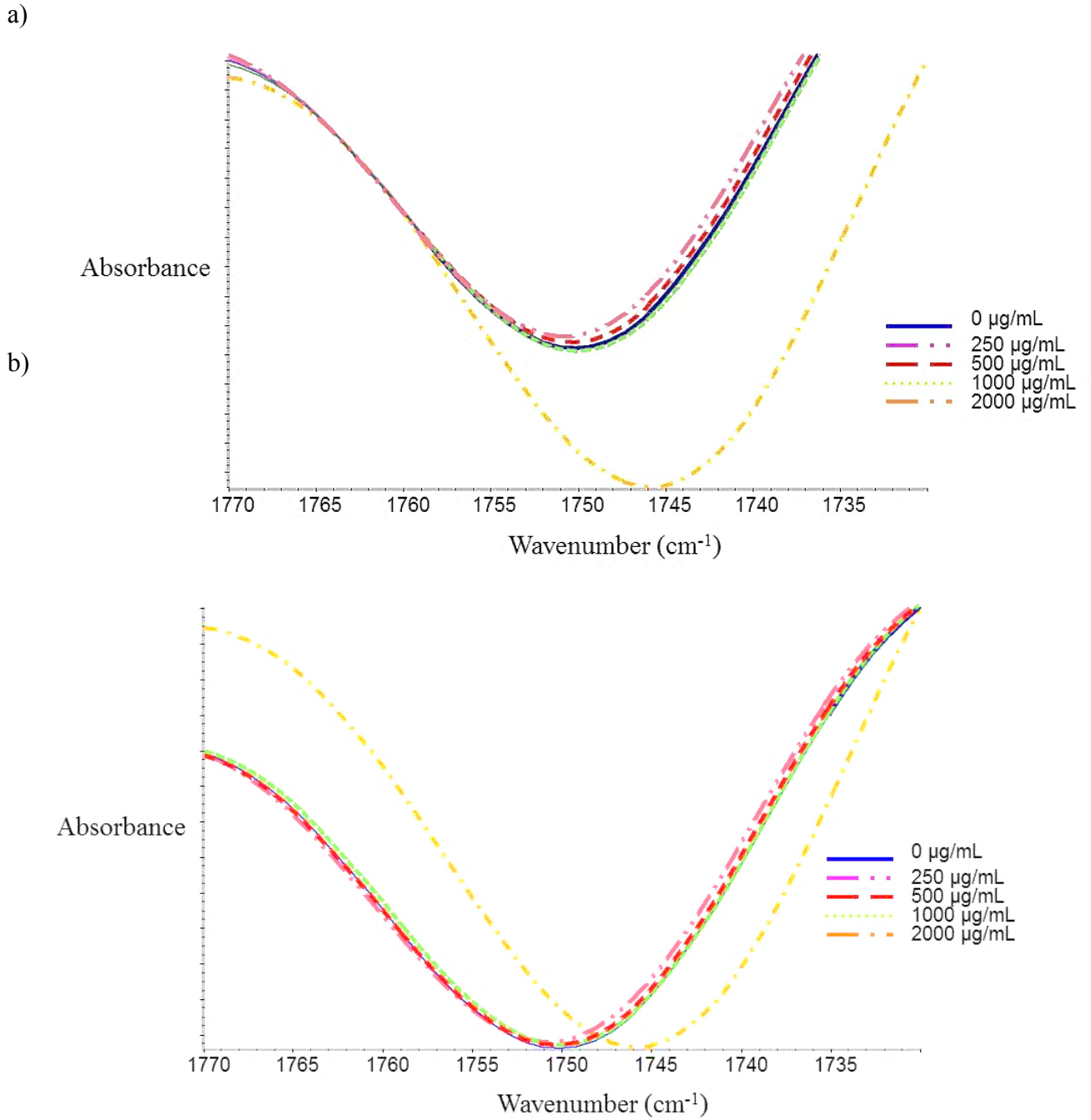


Figure 4.5: Representative second-derivative FTIR spectra (1770-1730 cm^{-1}) of *L. helveticus* R0052 cells grown, under (a) anaerobic and (b) aerobic conditions in MRS culture medium supplemented with GTE at concentrations from 0 to 2000 $\mu\text{g/mL}$.

Moreover, the shift to lower wavenumbers of the $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ stretching vibration bands observed for cells grown, under both aeration conditions, in MRS + 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE (Table 4.2) relative to those of cells grown in unsupplemented MRS suggests an ordering effect of GTE components on the membrane acyl chains of cells. This is in accordance with the increase in membrane lipid order induced by catechins which has been demonstrated in many studies with model membranes (Caturla *et al.*, 2003; Tsuchiya, 2001, Tsuchiya *et al.*, 2008) and with *Staphylococcus aureus* cells (Bernal *et al.*, 2010). The ordering effect could be due to the inclusion of galloylated catechins, in particular epigallocatechin gallate, in membranes (Caturla *et al.*, 2003) leading to the formation of new complexes between these catechins and the phospholipids (Iftime *et al.*, 2010). Membrane perturbation increases lipid order by producing tightly packed acyl chains in the bilayer (Taylor *et al.*, 2005). The increase in lipid order could occur due to direct hydrogen bonding between GTE components and the phospholipids and this potential interaction was studied in this work by monitoring the hydrogen-bonding sensitive bands in the infrared spectrum which are the $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ and C=O groups stretching bands (Santivarangkna *et al.*, 2010). The shift to lower wavenumbers of those bands observed for cells grown in MRS + 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE (Table 4.2 and Figure 4.5) suggests direct hydrogen bonding between the mentioned functional groups of the phospholipids and GTE components. It is known that flavanols, such as catechins, can interact with membrane phospholipids through hydrogen bonding with the polar head groups of phospholipids (Verstraeten *et al.*, 2003) and this is in accordance with the results obtained. Additionally, a study using model phospholipid membranes demonstrated that catechins which penetrate deep in the bilayer predominantly formed interactions with the lipid oxygen atoms further away from the bilayer surface whereas those that remained adsorbed on the bilayer surface predominantly formed hydrogen bonds with the phosphate oxygen atoms (Sirk *et al.*, 2008). The observed effects of GTE at a concentration of 2000 $\mu\text{g/mL}$ on bacterial lipids could, then, be linked to a direct interaction of GTE components with bacterial lipid functional groups. Since FTIR results suggest an increase in FA chain length for bacterial cells grown in MRS + 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE, the FA composition of bacterial lipids was analyzed by gas chromatography.

4.5.3 Influence of aeration conditions and of GTE concentration in growth medium on fatty acid composition of *L. helveticus* R0052 cells.

The FA composition of cells grown under aerobic and anaerobic conditions in MRS supplemented with 0 to 2000 µg/mL GTE was determined (Table 4.3). The main FA in the bacterial cells grown in unsupplemented MRS under anaerobic conditions were palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), oleic acid (C18:1 cis 9), vaccenic acid (C18:1 cis 11) and dihydrosterculic acid (C18:0 9,10-di Me). Their relative contents were between 6.5 and 30.4 % totalling more than 89% of all FA identified. Myristic acid (C14:0), pentadecanoic acid (C15:0), delta 10 cis pentadecenoic acid methyl ester (C15:1), palmitelaidic acid (C16:1 trans) and stearic acid (C18:0) were also detected but in lower amounts.

The FA profile of the strain used was in accordance to those of *Lactobacillus* strains since they typically have n-C16 :0, n-C18 :1 and C18:0 9,10-di Me as major fatty acids with lesser amount of C14:0, C16:1 and C18:0 (Drucker, 1981). Growth of the cells under aerobic conditions in comparison with anaerobic conditions induced changes in the cell's lipids composition (Table 4.3). Cells grown under aerobic conditions in unsupplemented MRS contained higher concentrations of lauric acid (C12:0), C14:0, and C18:0 9,10-di Me than those grown in the absence of oxygen and their concentration of C18:1 cis 11 was more than 14 times lower. The ratios saturated FA/ unsaturated FA were also higher for cells grown under aerobic conditions. These important changes of the cellular fatty acid profiles of cells grown under aerobic conditions compared with those grown under anaerobic conditions confirmed the effect of oxygen exposure during growth on the lipids of those cells and also are in accordance with oxygen effects observed by FTIR analyses. For cells grown under aerobic conditions, the combined proportions of all C18 (65%) and C16 acyl chains (16%) of bacterial lipids were lower than those of cells grown under anaerobic conditions (72 and 18% respectively). In contrast, the combined content of C15 and C14:0 (~11%) and C12:0 (4%) acyl chains measured for cells grown under aerobic conditions were more important than those of cells grown under anaerobic conditions (4 and 0% respectively).

Table 4.3: Fatty acid composition (% of total fatty acids) of *L. helveticus* R0052 grown, under aerobic and anaerobic conditions in MRS containing 0 to 2000 µg/mL GTE.

Fatty acids	0 µg/mL GTE		250 µg/mL GTE		500 µg/mL GTE		1000 µg/mL GTE		2000 µg/mL GTE	
	Aerobic	Anaerobic	Aerobic	Anaerobic	Aerobic	Anaerobic	Aerobic	Anaerobic	Aerobic	Anaerobic
C12:0	4.37± 0.37	0	4.76±0.78	0	5.46±0.66	0	3.44±0.99	0.51±0.04	1.48±0.36	0.71±0.06
C14:0	9.10± 2.18	2.70±0.14	8.85±2.49	2.57±0.26	8.96±2.04	2.60±0.16	4.16±0.40	1.21±0.26	5.31±1.88	0.81±0.11
isoC15:0	1.55± 0.11	0.63±0.06	1.95±0.21	0.66±0.02	2.20±0.06	0.74±0.06	1.04±0.25	0.27±0.07	0.44±0.12	0.09±0.06
C15:1	0	0.43±0.03	0	0	0	0	0	0.17±0.03	0	0.19±0.10
C16:0	12.38±2.09	11.14±0.41	12.74±1.48	11.41±0.54	11.96±1.66	11.64±0.33	7.02±1.02	7.01±0.59	5.45±0.19	5.60±0.94
C16:1	3.80± 0.67	6.49±0.52	3.73±0.68	6.38±0.38	4.04±0.42	6.43±0.37	2.04±0.40	2.92±0.51	1.64±0.12	1.64±0.12
C16:1 t	0	1.45±0.10	0	1.37±0.11	0	1.44±0.06	0	0.61±0.15	0.30±0.06	0.40±0.14
C18:0	1.77±0.65	0.80±0.23	1.47±0.44	0.92±0.12	1.49±0.17	1.08±0.13	1.39±0.11	1.15±0.16	1.30±0.14	1.15±0.05
C18:1 9t	0	0	0	0	0	0	0	0.90±0.17	0.30±0.06	0.24 ± 0.06
C18:1 9c	38.33±8.18	30.38±3.49	37.77±7.63	30.49±1.23	37.25±2.84	30.51±0.40	62.57±4.31	62.26±1.12	69.59±2.14	66.80±3.81
C18:1 11c	1.85±0.23	24.10±1.29	1.66±0.13	24.31±1.15	1.76±0.06	25.50±0.28	2.07±0.03	12.93±2.52	2.55±0.18	9.40±2.40
C18:0 9,10-di Me	23.40±2.60	17.10±2.70	22.55±1.78	17.54±2.04	23.94±0.62	16.09±0.14	9.65±2.35	5.16±1.01	2.16±0.51	1.74±0.55
Unknown	0	3.77±0.80	0	3.76±0.31	0	3.67±0.07	0	1.56±0.57	0	1.14±0.55
9c,11tCLA	0	0	0	0	0	0	1.91±0.37	2.21±0.26	2.80±0.39	2.83±0.24
c,c-CLA	0	0	0	0	0	0	1.76±0.35	2.01±0.24	2.62±0.35	2.81±0.28
t,t-CLA	0	0	0	0	0	0	1.42±0.41	0.96±0.08	1.69±0.38	1.42±0.18
SFA/UFA	0.68	0.24	0.69	0.25	0.70	0.25	0.26	0.13	0.19	0.11

SFA/UFA: % of saturated fatty acids/ % of unsaturated fatty acids. % of C18:0 9,10-di Me % was not included in the total % of UFA.

Thus, a shortening of the FA carbon chain occurred when cells were grown under aerobic conditions and that could explain, in part, the decrease in the order of the lipids of the bacterial cell membranes as suggested by FTIR results (Figure 4.3). The changes in lipid composition could be due to a response of the cells to oxygen exposure. It is known that bacteria have sophisticated mechanisms to control the formation of new FA and to modify the structure of existing FA in order to adjust membrane viscosity to match environmental requirements (Zhang and Rock, 2008). Since *L. helveticus* R0052 prefers anaerobic conditions, it can be postulated that the cells adapted to the presence of dissolved oxygen in the medium by changing the lipid content and the lipid structure in their membranes. An increase in proportion of short carbon chains of cellular FA was also observed for a *Bifidobacterium longum* (Ahn *et al.*, 2001) strain grown in the presence of oxygen. Moreover, the increased ratio saturated FA/unsaturated FA calculated for cells grown under aerobic conditions in our study (Table 4.3) in comparison with those grown under anaerobic conditions was also observed by Guerzoni *et al.* (2001) for *L. helveticus* cells grown in whey in the presence of oxygen in comparison with cells grown under anaerobic conditions.

Supplementation of the medium with GTE had also significant effects on the FA profiles of *L. helveticus* cells (Table 4.3). When grown, under both aeration conditions, in MRS with 0 to 500 µg/mL, the FA composition of cells was very similar to the ones of cells grown in unsupplemented MRS. Nevertheless, for cells grown under aerobic and anaerobic conditions in MRS + 1000 and 2000 µg/mL GTE, smaller proportions C14:0, C16:0, C16:1 and C18:0 9,10-di Me and lower saturated FA/unsaturated FA ratios were calculated in comparison with those of cells grown in unsupplemented MRS. Conjugated linoleic acid (CLA) and isomers of conjugated linoleic acid were also produced by cells exposed to high concentrations (1000 and 2000 µg/mL) of GTE. Additionally, the relative proportions of oleic acid greatly increased from 38 and 30% for cells grown under aerobic and anaerobic conditions, respectively, in unsupplemented MRS to more than 62% and 66% of the total lipids for cells grown in the presence of 1000 and 2000 µg/mL GTE respectively.

The similar FA composition of lipids of cells grown, under aerobic or anaerobic conditions in MRS enriched with 250 and 500 µg/mL GTE suggests that, at these concentrations, no bacterial response to the presence of GTE components occurred. Bacterial cells seem to have adapted to the presence of GTE at higher concentrations by the production of unsaturated FA and by increasing the FA chain length of the lipids of their membranes to maintain the cell membrane in a suitable state of fluidity. Similarly, some lactic acid bacterial strains exposed to phenolic acids responded by increasing the unsaturated FA contents of their membranes (Rozès and Peres, 1998). An increase in FA chain length in bacterial membranes was also observed by Wu *et al.* (2012) following acid stress of a *L. casei* strain. In our study, the increase in chain length of the bacterial FA for cells grown in MRS + 2000 µg/mL GTE is in accordance with the increase in order and packing of lipids of cells grown in this growth medium suggested by FTIR results (Table 4.2). Indeed, longer chains span more easily the width of the membrane bilayer, thereby promoting acyl chain packing (Cao-Hoang *et al.*, 2008). The increased amounts of long chain FA in lipids of cells grown in MRS + 2000 µg/mL is also in accordance with the decrease ratio $v_{\text{as}}\text{CH}_3/v_{\text{as}}\text{CH}_2$ observed on the spectra of those cells in comparison with those grown in unsupplemented MRS (Figure 4.4).

The lipids of cells grown with 1000 and 2000 µg/mL GTE also have a very high content in oleic acid. Incorporation of oleic acid in the lipids of bacterial membranes was observed for lactic acid bacterial cells grown in media supplemented with Tween 80 (Corcoran *et al.*, 2007; Johnsson *et al.*, 1995) which is constituted of up to 90% oleic acid (Partanen *et al.*, 2001). Thus, the important content of oleic acid observed for cells grown in MRS + 1000 and 2000 µg/mL could be due to the intact incorporation of oleic acid, from Tween 80 contained in the MRS broth used, into the lipids of the bacterial cells. Since the amount of Tween 80 and, consequently, of oleic acid in the growth medium was the same independently of the concentration of GTE added, the very important proportion of oleic acid in lipids of cells grown in MRS + 1000 and 2000 µg/mL GTE could also be due, in part, to a response of the bacteria to the presence of GTE at high concentrations. Guerzoni *et al.* (2001) also observed an increase in oleic acid in lipids of

a *L. helveticus* strain in the presence of multiple stress factors such as low pH and high NaCl concentrations.

Thus, the FA analyses showed that bacterial cells responded to exposure to 2000 µg/mL GTE by changing the FA composition of their membrane lipids. These changes could have occurred during growth of the bacterial cells or following a short exposure to GTE at the beginning of the fermentation. To get more insight into the bacterial cell response to GTE, the effects of a short exposure of bacterial cells to 2000 µg/mL GTE on the structure and conformation of their lipids and on their FA composition were studied.

4.5.4 Effect of a short exposure of *L. helveticus* R0052 cells to GTE

Figure 4.6 presents FTIR spectra (3000-2800 cm⁻¹) of *L. helveticus* cells grown in an anaerobic environment, washed two times and incubated 30 min at 37°C in MRS containing 0 or 2000 µg/mL GTE. The band assigned to the $\nu_{as}CH_2$ functional groups was more intense than the one assigned to the $\nu_{as}CH_3$ functional groups for cells exposed to GTE for 30 min and the different ratio of $\nu_{as}CH_3/\nu_{as}CH_2$ band areas calculated for cells exposed to 0 and 2000 µg/mL GTE were 0.79 ± 0.09 and 0.66 ± 0.02 , respectively. The maximal wavenumbers of bands mainly assigned to lipid functional groups on the FTIR spectra of bacterial cells were also determined and are presented in Table 4.4. Incubation of cells in the presence or absence of GTE did not have a significant effect on the wavenumbers of stretching bands studied except for the ν_sCH_2 stretching bands for which the wavenumber was shifted to a slightly higher value for cells incubated 30 min in MRS + 2000 µg/mL GTE in comparison to cells incubated in unsupplemented MRS. Mean fatty acids composition of cells exposed to 0 or 2000 µg/mL GTE was also determined. The main fatty acids measured for cells incubated in unsupplemented MRS were C16:0 (8.69% ± 0%), C18:1 9c (25.11% ± 4.5) and C18:1 11c (18.1% ± 5.2). The relative proportions (in %) of the main fatty acids for cells exposed 30 min to 2000 µg/mL GTE were: C16:0 (5.45 ± 0.69); C16:1 (1.62 ± 0.02); C18:1 9c (72.41 ± 8.90); C18:1 11c (5.03 ± 0.66); conjugated linoleic acid (2.94 ± 0.43) and conjugated linoleic acid isomers (2.80 ± 0.35).

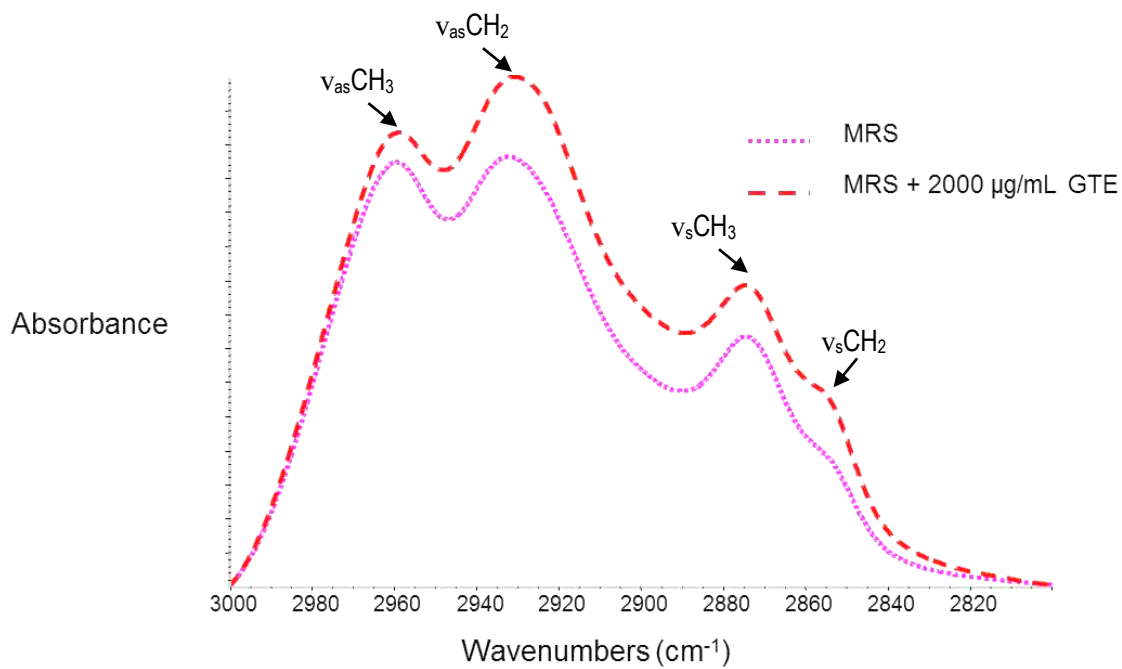


Figure 4.6: Normalized FTIR spectra (3000-2800 cm^{-1}) of *L. helveticus* R0052 cells incubated 30 min at 37°C in unsupplemented MRS or in MRS + 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE.

Table 4.4: Mean maximal wavenumbers measured for *L. helveticus* R0052 cells incubated 30 min. at 37°C in MRS containing 0 or 2000 µg/mL green tea extract.

Functional groups	0 µg/mL green tea extract	2000 µg/mL green tea extract
CH ₃ asymmetric stretching	2959.3± 0.4 a	2958.7± 0.4 a
CH ₂ asymmetric stretching	2932.0 ± 0.1 a	2930.1 ± 0.7 a
CH ₃ symmetric stretching	2874.4 ± 0.1 a	2874.1 ± 0.2 a
CH ₂ symmetric stretching	2853.4 ± 0.1 b	2853.9 ± 0.1 a
CH ₂ bending	1453.4 ± 0.6 a	1454.0 ± 0.1 a
PO ₂ ⁻ asymmetric stretching	1236.4 ± 0.6 a	1237.6 ± 0.3 a

a,b: For a given row, data (± standard deviation) followed by the same letter are not significantly different (P > 0.05).

This fatty acids composition of cells exposed 30 min at 37°C to GTE at a concentration of 2000 µg/mL was relatively similar to the one of cells grown (about 10 h/37°C) under both aeration conditions in MRS + 2000 µg/mL (Table 4.3).

The increase in $v_{as}CH_3/v_{as}CH_2$ intensity ratio observed for cells exposed to 2000 µg/mL GTE seems to occur, in part, at the beginning of the fermentation as shown by changes in the acyl chains spectral region (Figure 4.6) of cells exposed to GTE which were already apparent following the 30 min incubation period. This important ratio is in accordance with the proportion of long chain fatty acids in bacterial lipids, which is higher for cells exposed to GTE, principally due to their very high proportion of oleic acid.

All presented results showed an important effect of GTE at 2000 µg/mL on bacterial lipids during growth and also following short exposure to GTE at this concentration. Since supplementation of the growth medium with GTE at this concentration also resulted in an increase of cell biomass obtained for cells grown under aerobic conditions, a link between the effects of GTE on bacterial lipids and on biomass levels obtained

could be made. Indeed, besides the important antioxidant properties of GTE, the interaction of tea catechins with head groups of the phospholipids through hydrogen bonding observed could have provided a level of protection of the bilayer from external and internal aggressors (i.e. oxidants), contributing to preserve the structure and function of the membranes (Oteiza *et al.*, 2005). Interactions with the lipid bilayers are well established for galloylated catechins such as epigallocatechin gallate (Kajiya *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009). Indeed, catechins formed hydrogen bonds with model membranes, with hydroxyl groups of the catechins serving as hydrogen bond donors and the oxygen atoms of the phospholipids as hydrogen bond acceptors (Sirk *et al.*, 2009). Epigallocatechin gallate can also interact with the embedded proteins in the membranes of the bacterial cells (Nakayama *et al.*, 2013). As a consequence, those compounds can accumulate at the membrane surface and could intercept free radicals before they oxidize the head groups of the lipids. Additionally, the slight increase in the order of membrane lipids caused by GTE when used at a concentration of 2000 $\mu\text{g/mL}$ and the production of long chain FA by bacterial cells in response to GTE at this concentration could also have resulted in inhibition of lipid peroxidation due to slowdown of free radical reactions (Arora *et al.*, 2000) in more ordered membrane lipids and could have reduced the effects of oxygen on the lipids of the bacterial cells. Thus, a combined effect of the GTE components on the growth medium and also on bacterial cells could have occurred during growth of *Lactobacillus* cells in MRS supplemented with GTE at 2000 $\mu\text{g/mL}$. The important scavenging ability of catechins and their capacity to decrease the oxido-reduction potential of the growth medium (Gaudreau *et al.*, 2013) could have provided, under aerobic conditions, a better environment for the growth of the oxygen-sensitive bacterial cells used in this study. Moreover, interactions of catechins with the membrane bilayers of those bacterial cells and the bacterial response to the presence of 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE in the growth medium have limited the effect of oxygen exposure on the bacterial cells.

4.6 Conclusion

This work provides useful information about the effects of the aeration conditions and GTE concentrations on biomass production and on the lipids of cells of *L. helveticus* R0052, a probiotic strain. At 500 $\mu\text{g/mL}$ GTE, growth of the strain was only slightly stimulated under anaerobic conditions and no significant effect was observed on the lipids of the bacterial cells. Nevertheless, our results have pointed out to the existence of a threshold GTE concentration, between 1000 and 2000 $\mu\text{g/mL}$, above which the acyl chain length and order of lipids of the membranes of cells and also biomass production were significantly affected. They also present evidence that the bacterial cells responded to the presence of 1000 and 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE by changing the composition of their lipids. Thus, the interactions of GTE components with bacterial lipids and a bacterial response to the presence of GTE at high concentrations in the culture medium seem to have decreased the effect of oxygen exposure on the bacterial cells and, consequently, resulted in an increase in biomass production under aerobic conditions. To the best of our knowledge, this work is the first to establish a relationship between the effects of catechins on the lipids of bacterial cells and a stimulation of growth under aerobic conditions of an oxygen-sensitive strain. Moreover, as GTE could be incorporated in food products containing probiotic cultures, such as yogurts (Jaziri *et al.*, 2009) and juices (Shah *et al.*, 2010) to produce new functional foods and/or to increase cell survival, the knowledge of the effects of GTE on bacterial cell components and of a bacterial response to the presence of GTE depending of the concentration employed is indispensable for appropriate utilization of GTE.

CHAPITRE 5:

Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* cells and green tea extract in whey protein-coated pectin microparticles

Transition contextuelle

Les chapitres de résultats précédents ont montré une diminution des effets de l'oxygène sur la souche *Lactobacillus helveticus* R0052 lors de sa croissance en présence d'un extrait de thé vert. Pour exercer ses effets positifs sur la santé, cette souche doit demeurer viable jusqu'à l'atteinte de la partie inférieure du tractus gastrointestinal. Cependant, une multitude de facteurs peuvent affecter la viabilité de cellules bactériennes soit durant leur entreposage dans des produits alimentaires, s'il y a lieu, soit après leur ingestion tels que la présence d'oxygène dissous, un bas pH, la présence d'ingrédients inhibiteurs pour les bactéries, le stress oxydatif et les sels biliaries. Les résultats obtenus précédemment, les propriétés antioxydantes des extraits de thé vert et leurs effets bénéfiques démontrés sur la survie de certaines souches de bactéries probiotiques durant leur passage dans le tractus gastrointestinal suggèrent qu'un extrait de thé vert pourrait être utilisé dans un système visant la livraison, à la partie inférieure du tractus gastrointestinal, de bactéries sensibles à l'oxygène viables. Dans cette étude, une microencapsulation de bactéries probiotiques avec de l'extrait de thé vert a été réalisée et les effets de cette co-encapsulation sur la survie des bactéries dans les conditions rencontrées dans la partie supérieure du tractus gastrointestinal ont été évalués.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article intitulé:

«Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* cells and green tea extract in whey protein-coated pectin microparticles ».

Les auteurs sont: Hélène Gaudreau (candidate au doctorat: conception, planification, exécution des travaux pratiques, interprétation des résultats et rédaction de l'article scientifique), Dr. Claude P. Champagne et Dr. Gabriel E. Remondetto (co-directeurs: contribution à la planification des travaux de recherche, à la discussion des résultats et à la révision de l'article), Dr. Ahmed Gomaa (discussion des résultats d'analyse FTIR et révision de l'article) et Dr. Muriel Subirade (directrice: contribution à la planification des travaux de recherche, à la discussion des résultats et à la révision de l'article).

5.1 Résumé

Les effets bénéfiques potentiels pour la santé de microorganismes probiotiques et aussi d'extraits de thé vert (ETV) sont nombreux. Des ETV ont aussi eu des effets positifs sur la survie de bactéries probiotiques incorporées dans des aliments ou durant leur exposition à des conditions gastrointestinales simulées. Dans cette étude, des microparticules de pectine contenant des cellules de *Lactobacillus helveticus* R0052 et de l'extrait de thé vert (ETV) ont été préparées par émulsion/gélification interne. Les effets d'une période d'incubation de l'ETV (0 à 2000 µg/mL) dans les solutions de pectine avant la microencapsulation sur les propriétés antioxydantes de ces solutions, les groupements fonctionnels de la pectine, les caractéristiques des microparticules obtenues (morphologie, diamètre moyen et propriétés antioxydantes) et les rendements d'encapsulation des bactéries et des polyphénols ont été étudiés. Certaines des microparticules produites ont été enrobées de protéines de lactosérum et leur capacité à protéger les bactéries lors d'une exposition à des conditions gastrointestinales simulées a aussi été évaluée. Des matrices possédant des propriétés antioxydantes ont été obtenues par addition d'ETV dans les solutions de pectine. De plus, des microparticules sphériques et de petites tailles (~ 100 µm) ont été produites, à l'aide de ces matrices, par la méthode de microencapsulation employée. La période d'incubation de l'ETV à une concentration de 500 µg/mL dans les solutions de pectine a permis des taux d'encapsulation de bactéries et de polyphénols élevés et la production de microparticules possédant une activité antioxydante. De plus, le taux de survie des bactéries dans les microparticules enrobées de protéines de lactosérum et exposées aux conditions gastrointestinales simulées était supérieur à celui des cellules libres exposées aux mêmes conditions. La microencapsulation des bactéries avec 1000 µg/mL d'ETV a, de plus, prodigué une protection supplémentaire aux bactéries exposées aux conditions gastriques simulées. Cette étude montre que les microparticules de pectine enrobées de protéines de lactosérum pourraient être un vecteur efficace pour la livraison combinées de bactéries probiotiques et de catéchines du thé vert jusqu'à la partie inférieure du tractus gastrointestinal.

5.2 Abstract

Probiotics and green tea extract (GTE) have numerous potential health benefits. GTE was also reported to have positive effects on the survival of probiotic bacteria in food products or during their exposure to simulated gastrointestinal conditions. In this study, pectin microparticles containing *Lactobacillus helveticus* R0052 cells and GTE were prepared by an emulsification/internal gelation process. The effects of an incubation period of 0 to 2000 µg/mL GTE in pectin solutions before the microencapsulation process on their antioxidant activity, pectin functional groups, calcium pectinate microparticles characteristics (morphology, mean diameter and antioxidant activity) and on bacterial cell and polyphenol encapsulation yields were evaluated. A part of the pectin microparticles were coated with whey proteins and the ability of these coated microparticles to protect cells from the severe gastrointestinal conditions was also investigated. The addition of GTE to the pectin solutions resulted in the formation of matrices with radical scavenging activity and in which interactions between pectin and GTE component's functional groups occurred. Moreover, small (~ 100 µm) and spherical microparticles were produced using the emulsification/internal gelation encapsulation method. The incubation period of GTE at a concentration of 500 µg/mL in pectin solutions resulted in high bacterial and polyphenol encapsulation yields and in the production of microparticles with antioxidant activities. Microencapsulation of the cells in whey protein-coated microparticles increased significantly their survival rate in simulated gastrointestinal conditions compared to free cells. Microencapsulation of bacterial cells with 1000 Mg/mL GTE provided additional protection to the cells under gastric conditions. This study indicated that whey protein-coated pectin microparticles could be an interesting system for the combined delivery of viable probiotic cells and of GTE to the lower part of the gastrointestinal tract.

5.3 Introduction

A daily intake of 10^9 - 10^{10} colony forming units (CFU) probiotic viable cells has been shown to provide positive effects on the host health (Hemaiswarya *et al.*, 2013), particularly, by affecting the intestinal microflora (Ohashi and Ushida, 2009). Health benefits of these microorganisms have been attributed to different mechanisms of action such as the production of antimicrobial agents (Doron and Gorbach, 2006; MacIntyre and Cymet, 2005; Vanderhoof and Young, 2004), the stimulation of the immune system (Roller *et al.*, 2004), the enhancement of the barrier function (Doron and Gorbach, 2006), their ability to protect the host against toxins produced by other microorganisms (Oelschlaeger, 2010) and to the reduction of fecal enzymes that may be involved in the formation of carcinogenic compounds (Spanhaak *et al.*, 1998). In order to affect the host intestinal microflora and immune response (Adams, 2010), probiotic microorganisms should remain viable during the shelf life of the product, such as food products, in which they are incorporated and during passage through the upper gastrointestinal tract. Several factors have been reported to affect the viability of probiotic microorganisms when incorporated into food products, including pH and titratable acidity, oxido-reduction potential, dissolved oxygen content and storage temperature (Mortazavian *et al.*, 2012). Exposure to dissolved oxygen can play a major role in viability loss of oxygen-sensitive bacteria. Indeed, several studies showed a decrease in viability, due to the presence of oxygen, of *Lactobacillus* bacteria incorporated in yoghurts (Dave and Shah, 1997 b and c; Hull *et al.*, 1984; Talwalkar and Kailasapathy, 2003b). Moreover, ingested microorganisms are exposed during their transit through the gastrointestinal tract to successive stress factors that have an impact on their survival. Among them, the very low pH in the stomach and the presence of bile substances in the duodenum are the most important (Lee and Salminen, 2009). Probiotic bacteria viability can also be affected by exposure to oxidative stress during their transit in the digestive tract (Rochat *et al.*, 2005).

Catechins, the primary polyphenolic compounds in green tea (Lee *et al.*, 2008) or green tea extracts can also have an effect on the intestinal microflora. Catechins have promoted

the growth of beneficial bacteria during *in vivo* studies (Jin *et al.*, 2012; Okubo *et al.*, 1992) and are reported to have antimicrobial activity against many pathogens microorganisms (Almajano *et al.*, 2008; Gahlaut and Dabur, 2014; Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2008). These compounds also stimulated the growth of bifidobacteria in soymilks (Zhao and Shah, 2014b) and increased the survival of probiotic bacteria in simulated gastrointestinal environment (Vodnar and Socaciu, 2012, 2014) and during storage in fruit juices (Shah *et al.*, 2010) and yoghurts (Akahoshi and Takahashi, 1996). Moreover, green tea catechins possess potent antioxidant (Zaveri, 2006), cancer chemopreventive (Kuzuhara *et al.*, 2008; Mukhtar and Ahmad, 2000; Yang *et al.*, 2002), anti-inflammatory (Donà *et al.*, 2003), anti-HIV (Nance and Shearer, 2003) and anti-aging (Esposito *et al.*, 2002) properties. These reported antioxidant properties and positive effects on bacteria in food products and gastrointestinal tract suggest that green tea extracts could be used to improve the survival of oxygen-sensitive bacteria in products and/or during passage through the upper part of the gastrointestinal tract while providing, at the same time, green tea catechins having potential health benefits to the hosts.

Microencapsulation consists in the formation of a wall or a shell around a compound (Shahidi and Han, 1993) and could be employed to protect sensitive substances against deteriorative environments (Waterhouse *et al.*, 2014). This process was shown to improve the viability of probiotic bacteria in food products and in the gastrointestinal tract (Chávarri *et al.*, 2010; Riaz et Masud, 2013; Shafiei *et al.*, 2012) and the stability of catechins in simulated gastrointestinal fluids (Lee *et al.*, 2009). The microencapsulation of probiotics cells with GTE may better protect the bacteria in the gastrointestinal tract due, in part, to the antioxidant properties of the catechins and the physical barrier provided by the microencapsulation process and, at the same time, could also protect the catechins from the conditions encountered in the digestive tract. Among all encapsulating materials that can be used for microencapsulation, pectin is a non-toxic, low cost and biodegradable carrier (Gerez *et al.*, 2012; Shukla *et al.*, 2011). It has also potential prebiotic effect (Hasselwander, 2008). Moreover, calcium pectinate gel microparticles, formed by the Ca^{2+} -induced ionotropic gelation of pectin molecules (Lee *et al.*, 2008)

have been used to improve the survival of probiotic bacteria incorporated in yoghurts (Sandoval et Castilla, 2010) and during their exposure to simulated gastrointestinal conditions (Gebara *et al.*, 2013). Calcium pectinate gels are nontoxic, resistant to acidic conditions and mechanically strong (Atyabi *et al.*, 2005; Sriamornsak, 1998). However, co-entrapping catechins with probiotic bacteria in a gel matrix by extrusion in CaCl₂ might be difficult because catechins are small and mostly water-soluble compounds that tend to diffuse out of the matrix into the CaCl₂ solution during the gelation period. This could result in low catechins encapsulation efficiency (Lee *et al.*, 2009). Nevertheless, polyphenols, such as catechins, can form interactions with pectin (Vernhet *et al.*, 1996). With respect to these potential interactions, it was our hypothesis that an incubation period for a green tea extract in pectin solutions will favor interactions between pectin and catechins that would be helpful to obtain high polyphenol encapsulation efficiency. This encapsulation efficiency could also be increased by using an emulsification/internal gelation technique known to limit catechins diffusion out of the encapsulating matrix (Lee *et al.*, 2009). In this context, the objective of this study was to co-encapsulate probiotic bacterial cells and a green tea extract rich in catechins in pectin microparticles using an emulsification/internal gelation process. The effect of an incubation period for the green tea extract in pectin solutions on their antioxidant activity, pectin functional groups, calcium pectinate microparticles characteristics (morphology, mean diameter, antioxidant activity) and on bacterial cells and polyphenol encapsulation yields was evaluated. The ability of whey protein coated pectin microparticles to protect the cells in simulated gastrointestinal conditions was also investigated.

5.4 Materials and Methods

5.4.1 Materials

Partially amidated low methoxy (LM) pectin (GENU[®] pectin type LM-104 AS-Z; degree of esterification typically of 27%, and degree of amidation typically of 20%) extracted from citrus peel was a generous gift from CP Kelco (Atlanta, GA). A whey protein isolate (Bipro, Davisco Food International Inc., Le Sueur, MN) was kindly provided by Coopérative Agropur, Saint-Hubert, Canada). Canola oil used to form the emulsions was purchased locally (Merit Selection brand, Canada). Calcium carbonate (< 30µm particle size), Span 80, calcium chloride, sodium citrate tribasic dihydrate, Tween 80, gallic acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent (2N) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO) and pancreatin (MP Biomedicals, USP x1) and pepsin (MP Biomedicals, 5x USP) from Fisher scientific (Ottawa, ON, Canada). MRS *Lactobacillus* agar and broth (EMD Millipore, Billerica, MA), glacial acetic acid (EMD Millipore) and anhydrous sodium carbonate (EMD Millipore) were purchased from VWR International (Ville Mont-Royal, Qc, Canada).

Capsules of commercial green tea extract (GTE) were purchased from the Pharmacie des Vosges (Nice, France). A solution of 50 mg/mL GTE contained 4.9 mg/mL epigallocatechin gallate, 3.5 mg/mL gallocatechin gallate, 2.3 mg/mL epigallocatechin, 1.4 mg/mL epicatechin gallate, 0.7 mg/mL epicatechin and 3.7 mg/mL caffeine (Rozoy *et al.*, 2013).

5.4.2 Bacterial strain, culture conditions and preparation of cell concentrates

Lactobacillus helveticus R0052 was kindly provided, in a frozen vial, by Lallemand Health solutions (Montreal, Qc, Canada). The thawed culture (1 mL) was added to 9 mL of lactobacilli MRS broth (EMD Millipore) + L(+) ascorbic acid (0.1%) and incubated at 37°C in an anaerobic jar containing Anaerogen sachets (Oxoid, Nepean, ON, Canada) until a pH of 4.5-4.6 was reached (typically after 10 h). One subculture was carried out in

identical conditions. Stock cultures were prepared by mixing the fresh subculture with sterile 20% glycerol and sterile 20% (w/v) reconstituted skim milk in a ratio of 2:5:5, with subsequent storage at -80°C in portions of 1 mL placed in 2mL Cryos™ vials (Greiner Bio-one, Monroe, NC).

Before each independent assay, fresh cultures were prepared by adding one thawed stock culture to 99 mL of lactobacilli MRS broth + ascorbic acid (0.1%), and incubating at 37°C in an anaerobic jar containing Anaerogen sachets (Oxoid) until a pH of 4.5-4.6 was reached (typically after 10 h). The cells (25 mL) in early stationary phase were harvested by centrifugation (3500 rpm; 5 min; 4°C), washed twice with sterile 0.1% (w/v) peptone solution and re-suspended in 2.5 mL of the peptone solution to obtain cell concentrates with a final cell concentration of 9 to 10 log CFU/mL (w/v).

5.4.3 Preparation of green tea extract solutions

Aqueous green tea extract (GTE) solutions were prepared by solubilising GTE in deionized water. The solutions were then centrifuged (RC3C, Sorvall Instrument, Dupont, Wilmington, DE, USA) at 7800 rpm for 10 min at room temperature in order to remove insoluble components. The supernatant fluids were sterilized by filtration through 0.45µm filter units (Sterile AcrodiscR. # 4654 Syringe filters, Pall, Mississauga, ON, Canada).

5.4.4 Preparation of pectin solutions

Pectin solutions (3% w/w) containing 0 to 2000 µg/mL GTE were prepared by adding the required amounts of pectin and GTE to sterile deionized water and mixing for 1 hour at room temperature. These solutions were then stored 16 h at 5°C under continuous stirring to allow good pectin hydration. Afterwards, the solutions were heated at 80°C for 15 min, cooled and stored 2 h30 at room temperature. The addition of GTE at the beginning of the hydration step implies that the GTE was already in those solutions during the storage (16 h at 5°C) and heating (80°C/15 min) steps. In some instances, pectin solutions were

prepared without GTE, stored overnight and pasteurised and GTE was added at concentrations from 0 to 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, just prior to the microencapsulation process in order to evaluate if potential interactions between pectin's functional groups and GTE components could be formed during the incubation period. These pectin solutions in which GTE was added just prior the microencapsulation step were named P_s (GTE in solution) and those in which GTE was added at the beginning of the pectin hydration step were named P_m (GTE in the microencapsulation matrix).

5.4.5 Microencapsulation and coating procedures

Microparticles were prepared by the emulsification/internal gelation technique (Poncelet *et al.*, 1992) with modifications. This method is based on the release of calcium ions from an acid-soluble calcium salt in emulsified ionic polysaccharide solution. Calcium ion release is initiated via gentle acidification with an oil-soluble acid, which partitions to the aqueous polysaccharide phase and, thereby, initiates gelation (Chen and Subirade, 2006). A calcium carbonate slurry was prepared by adding calcium carbonate (CaCO_3) to deionized water to obtain a 2% solution. This solution was ultrasonicated for 5 min and further mixed using a vortex. Cell concentrates (200 μL) were dispersed in 10 mL P_s or P_m suspensions to form a cell/GTE/pectin aqueous phase. Then, 200 μL of the CaCO_3 final solution was added to all pectin suspensions.

The emulsification and gelation steps were performed in a 140 mL beaker using a caframo overhead stirrer with a pitched blade propeller. Pectin suspensions were introduced dropwise into 40 mL canola oil containing 1% (v/v) Span 80 while stirring at 600 rpm at room temperature. Following emulsification for 15 min at 600 rpm, 10 mL of canola oil containing 35 μL glacial acetic acid was added dropwise to liberate Ca^{2+} from the insoluble salt. After continuous stirring for 15 min at 600 rpm, 80 mL of calcium chloride (50 mM) was gently added on the side of the beaker. The agitation was stopped 1 min latter. After complete partitioning of the microparticles to the aqueous phase, the oil was discarded and the microparticles were filtered through a 40 Mesh sieve, recovered

with 40 µm cell strainers (Fisher Scientific) and rinsed with a 1% (v/v) Tween 80 solution.

Whey protein-coated pectin microparticles were employed to study the effect of exposure to gastrointestinal conditions on the survival of microencapsulated bacteria. For the coating, pectin microparticles (1 g) were immersed (10 min/ room temperature) in 10 mL of a 10% (w/w) whey protein isolate solution previously adjusted to pH 4.8. Coated microparticles were recovered with 40 µm cell strainers (Fisher Scientific).

5.4.6 Analyses

Determination of the antioxidant activity of the pectin solutions

The antioxidant activity of pectin solutions containing 0 to 2000 µg/mL GTE was evaluated using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging assay according to the AOAC method 2012.04 described by Plank *et al.* (2012) with some modifications. Briefly, 500 µL of pectin solutions were mixed with 5 mL of 0.1 mM DPPH methanolic solution. The reaction mixtures were incubated in the dark at ambient temperature for 30 min and their absorbance at 517 nm was measured. The percentage of DPPH free radical scavenging activity of solutions was determined using the following equation:

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = (\text{ABS}_{\text{DPPH}} - \text{ABS}_{\text{extract}} / \text{ABS}_{\text{DPPH}}) \times 100$$

where ABS_{DPPH} is the absorbance value at 517 nm of the methanolic solution of DPPH and $\text{ABS}_{\text{extract}}$ is the absorbance value at 517 nm for the sample extracts (Siripatrawan and Harte, 2010).

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy

P_m and P_s pectin solutions (30 µL) containing 0 to 2000 µg/mL GTE were spread on a BaF₂ window and dried 15 min at 37°C. The samples were dried in order to reduce

spectral interference from water. Indeed, the presence of high water content would interfere with the primary amide band (amide 1) due to overlapping between amide 1 with the H-O-H bending mode of water at 1642 cm^{-1} (Sivam *et al.*, 2013). Infrared spectra were recorded at room temperature with a Magna 560 Nicolet spectrometer (Madison, WI) equipped with a liquid nitrogen cooled mercury-cadmium-telluride (MCT) detector. The sample chamber of the spectrometer was continuously purged with CO₂-free dried air to prevent atmospheric water vapor obscuring the bands of interest. Spectra were recorded in the mid-IR region over the range of 800 to 4000 cm^{-1} at a resolution of 2 cm^{-1} . Each spectrum represented an average of 128 accumulated scans and was apodized with a triangular function. Spectral processing was performed using Omnic software (version 7, Thermo Electron Corporation). Water vapor subtraction was undertaken when required. Spectra were baseline-corrected and the wavenumber of the bands were determined using the peak maximal function in the Omnic software. Three independent replicate experiments were run for each treatment. The data presented are the means of these three assays.

Morphological study

The shape of the microparticles was observed using an Olympus BX50W1 optical microscope (Olympus, Melville, NY) fitted with a digital camera (model U-TV1 X, Olympus Optical, Tokyo, Japan).

Microparticle diameter

The average diameter (μm) and D (0.5) (diameter at which the cumulative volume reaches 50% of the total volume), of microparticles were determined using a Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Southborough, MA). Measurement of microparticles diameter was performed at 25°C.

Determination of bacterial loading and encapsulation yields

The viability of the culture was determined by counting viable cells in both initial cell/pectin solutions and freshly produced microparticles. Accurately weighed amounts of

microparticles (~ 500 mg) were dissolved in 5 mL of 2% sterile sodium citrate solution (Gebara et al., 2013) (pH 6.0) followed by vigorous stirring. After disintegration, the microorganisms were released and enumerated by the drop plate method (Herigstad *et al.*, 2001) on MRS agar. The plates were incubated 48 h at 37°C in anaerobic jars containing Anaerogen sachets (Oxoid, Nepean, ON, Canada). All bacterial cell determinations were done in triplicate.

The encapsulation yield (EY), which is a combined measurement of the efficacy of entrapment and survival of viable cells during the microencapsulation process (Annan *et al.*, 2008), was calculated as follows:

$$EY = (N/N_0) \times 100$$

where N is the number of free living cells released from the microparticles and N₀ the number of free cells in the pectin solutions before the production of microparticles (Gebara *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2013; Vodnar and Socaciu, 2012). Tests were conducted in triplicate.

Determination of polyphenol encapsulation yields

In order to evaluate the total phenolic content of microparticles, 500 mg of weighed microparticles were dissolved in 5 mL of 2% sodium citrate (pH 6.0) followed by vigorous stirring. The samples were centrifuged (6900 rpm/4°C/ 3 min) in order to remove bacterial cells from the solutions. The total phenolic content in the supernatant fluids was measured according to the International Organization for Standardization (ISO) 14502-1 method (ISO 14502; 2005) and described by Anesini *et al.* (2008) with slight modifications. Briefly, 1.0 mL of the supernatant fluids was transferred in a glass tube containing 5.0 mL of a 1/10 dilution of the Folin-Ciocalteu's reagent in water. Then, 4.0 mL of a sodium carbonate solution (7.5% w/v) was added. The tubes were then allowed to stand at room temperature in the dark for 30 min before absorbance at 765 nm was measured against a blank. The concentration of polyphenols in samples was derived

from a standard curve of gallic acid ranging from 10 to 50 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2= 0.999$). The results were expressed as μg equivalents of gallic acid per g of samples.

The polyphenol encapsulation yields (PEY) were then calculated as follows:

$$\text{PEY} = (\text{A/B}) \times 100$$

where A is the amount of polyphenol released from the microparticles and B is the amount of polyphenol in the initial pectin solutions.

Determination of the antioxidant activity of the microparticles

The antioxidant activity of pectin microparticles was evaluated using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging assay as described previously for pectin solutions but 200 mg of microparticles were used in these assays.

Exposure of free and microencapsulated cells to gastrointestinal conditions

Free cells and cells in whey protein-coated microparticles produced from P_m solutions were incubated in simulated gastric and intestinal juices. The method was based on USP (2007) simulated gastric and intestinal solutions with modifications. Simulated gastric juice (SGJ) consisted of 0.2% (w/v) NaCl and 0.32% (w/v) pepsin in deionized water. The final pH of the SGJ was adjusted to 2.0 with hydrochloric acid. The simulated intestinal fluid (SIJ) consisted of 6.8 g of monobasic potassium phosphate dissolved in 250 mL deionized water and added to 190 mL of 0.2 N sodium hydroxide and 400 mL of double-distilled water. Pancreatin (10.0 g, activity equivalent to USP specifications) and bile salts (3 g/L) were also added to this mixture. The pH was adjusted to 7.4 ± 0.1 using 0.2 N sodium hydroxide, and the final volume was then brought to 1000 mL with deionized water. For the determination of cell survival in SGJ, 200 μL of cell concentrates were diluted in 10 mL SGJ containing different concentrations of GTE (0 to 2000 $\mu\text{g/mL}$). The obtained solutions were incubated at 37°C for 0, 60 and 120 min in a shaking water bath with an agitation of 60 rpm. To determine the effect of a sequential exposure of cells to SGJ followed by SIJ, the free cells were treated for 60 min in SGJ, recovered by centrifugation (3500 rpm/5min/ 4°C), resuspended in 10 mL SIJ and

incubated 120 min at 37°C in the shaking bath with an agitation of 60 rpm. The initial count of free cells was adjusted with suitable dilution to about 9.0 log CFU/g to match with the initial cell population of the microparticles.

The survival of microencapsulated cells in simulated gastric juice was studied using 200 mg of freshly prepared whey protein-coated microparticles diluted in 2 mL of SGJ and incubated at 37°C for 0, 60 and 120 min in a shaking water bath with an agitation of 60 rpm. For the determination of the effect of a sequential exposure to SGJ and SIJ of microencapsulated cells, 200 mg of microparticles were treated for 60 min in 2 mL SGJ and recovered using 40 µm cell strainers (Fisher Scientific). The SGJ were then centrifuged (3500 rpm/5min/4°C) to recover cells released from the microparticles and the cell pellets were diluted in 2 mL SIJ. The microparticles were incorporated in these SIJ and the mixtures were incubated 120 min at 37°C with an agitation of 60 rpm. At the end of the incubation periods, 2 mL of sodium citrate (4%, pH 6.0) were added to dissolve the microparticles followed by vigorous stirring. After dissolution, the microorganisms were released and enumerated by the drop plate method on MRS agar after incubation for 48 h at 37°C in anaerobic jars containing Anaerogen sachets (Oxoid).

Statistical analyses

All experiments were performed in triplicate. One-way analyses of variance at a significance level of 0.05, followed by Holm-Sidak tests, were performed on the data. Paired-T tests were also carried out to specifically compare two groups of results.

5.5 Results and discussion

5.5.1 Effects of an incubation period of GTE in pectin solutions

Prior to the microencapsulation process, the impact of an incubation period of GTE in pectin solutions (P_m solutions) in comparison with GTE addition in solutions just prior to the analyses (P_s solutions) and of GTE concentration on pectin solution's antioxidant activities and functional groups was evaluated. Free radical scavenging activity is a direct method for the measurement of the antioxidant activity (Dehkharghanian *et al.*, 2009) of a compound. DPPH \cdot , a stable free radical with a characteristic absorption at 517 nm, was used to measure the radical scavenging effect of pectin solutions containing GTE. As antioxidant compounds donate protons to DPPH radicals, the absorption decreases and the reduction in absorption is taken as a measurement of the extent of radical scavenging (Gezer *et al.*, 2006). Pure pectin solutions had no DPPH radical scavenging activity at the pectin concentration used (0.03g/mL) but GTE addition resulted in a significant rise in their DPPH radical scavenging activities ($P < 0.001$; Table 5.1).

Table 5.1: DPPH radical scavenging activity of pectin solutions containing 0 to 2000 $\mu\text{g/mL}$ green tea extract (GTE) added at the beginning of the pectin hydration step (P_m) or in pectin solutions just before the analysis (P_s).

Pectin solutions	Initial GTE concentration ($\mu\text{g/mL}$)	DPPH scavenging activity (%)
Pectin	0	0.0 ± 0.0 c
P_m	500	78.3 ± 2.9 a
	1000	79.6 ± 0.3 a
	2000	82.9 ± 5.7 a
	500	22.0 ± 7.9 b
P_s	1000	74.0 ± 7.5 a
	2000	85.6 ± 2.4 a

a,b,c,: For a given column, data (\pm standard deviation) followed by the same letter are not significantly different ($P > 0.05$).

Except for $P_s + 500 \mu\text{g/mL}$ GTE solutions, all pectin solutions showed high radical scavenging activities. More than 70% of GTE antioxidant activity can be attributed to tea catechins (Salah *et al.*, 1995) due to their capacity to neutralize free radicals by giving hydrogen ion from their phenolic groups (Mendoza-Wilson and Glossman-Mitnik, 2006; Bazinet and Doyen, 2015). The higher DPPH radical scavenging activity of P_m solution containing $500 \mu\text{g/mL}$ GTE in comparison to the one of the P_s solution at the same GTE concentration could result from a potential formation, during the pectin hydration period, of pectin-GTE component complexes having important free radical scavenging activities. In order to evaluate potential interactions between pectin and GTE components, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to study the effect of the addition of GTE at different concentrations to pectin solutions on the structure of pectin's functional groups.

Three regions of the FTIR spectra of dried pectin solutions are presented in Figure 5.1. In the first region, between 3000 and 2800 cm^{-1} , the band centered at about 2920 cm^{-1} corresponds to the C-H stretching vibration of the CH_2 groups of the pectin functional groups. In the second region (1800 - 1500 cm^{-1}), three absorption bands can be observed that are associated with the methyl ester and protonated carboxylic acid groups (1741 cm^{-1} ; COOCH_3 and COOH), the primary amide group (1674 cm^{-1} ; CO-NH_2) and the carboxylic acid group (1600 cm^{-1} ; COO^-) present in pectin (Assifaoui *et al.*, 2010). The last region (below 1500 cm^{-1}) is collectively referred as the “fingerprint” region that is unique for a given compound and corresponds principally to coupled C-C, C-O-C and C-OH vibration modes of the carbohydrate ring and to the glycosidic linkage vibrations (Urias-Orona *et al.*, 2010). In that region, bands correspond to overlapping vibrational stretching mode system and cannot be unambiguously assigned to particular functional groups (Chatjigakis *et al.*, 1998).

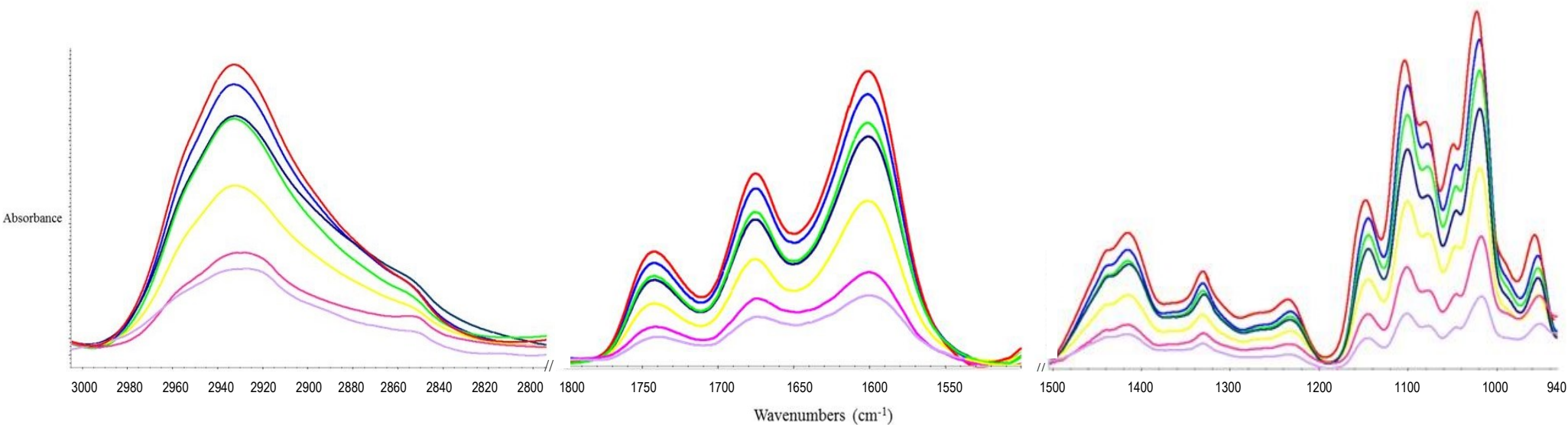


Figure 5.1: FTIR spectra (3000-900 cm⁻¹) of dried pectin solutions with green tea extract (GTE) added at different concentrations in solutions just before analysis (P_s) or at the beginning of the pectin hydration step (P_m). (— Pectin), (— P_m+ 500 μg/mL GTE), (— P_m+ 1000 μg/mL GTE), (— P_m+ 2000 μg/mL GTE), (— P_s+ 500 μg/mL GTE), (— P_s+ 1000 μg/mL GTE), (— P_s+ 2000 μg/mL GTE).

Spectra of pectin with added GTE showed the same bands as in the spectra of pure pectin solutions without GTE (Figure 5.1). Nevertheless, in the three spectral regions, the intensity of the bands decreased after GTE addition to pectin solutions. Moreover, shifts to lower wavenumbers of several bands in the fingerprint region (1230, 1150, 1020 and 960 cm^{-1}) can clearly be seen in the spectra of pectin solutions containing GTE in comparison with those of pure pectin solutions which suggested interactions between pectin and GTE components. Lower intensities of the bands, in the spectral region between 1200 and 900 cm^{-1} , were observed in P_m solutions containing 500 $\mu\text{g/mL}$ GTE in comparison to those of P_s solutions at the same GTE concentration. Such lower intensities indicate more interactions between specific pectin functional groups and GTE in P_m solutions than in P_s solutions at this GTE concentration. These findings could explain the higher antioxidant activity of this solution that was reported in Table 5.1. The average wavenumbers of the bands in the spectral regions from 3000 to 1500 cm^{-1} were measured for all pectin samples and are presented in Table 5.2. The wavenumbers of the bands in spectra of pectin solutions containing 0, 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$ GTE were not significantly different. Addition of 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE at the beginning of the pectin hydration step induced significant shifts ($P < 0.05$) in wavenumbers of the bands assigned to the pectin primary amide groups and ionized carboxylate groups compared with those measured for pectin without GTE. Moreover, the wavenumbers assigned to the pectin primary amide and to the C-H stretching of the CH_2 groups of P_s solutions containing 2000 $\mu\text{g/mL}$ GTE were significantly lower ($P < 0.05$) than those measured for pure pectin solutions. Thus, the incubation period of GTE in the pectin solutions imparted changes in the structure of the pectin functional groups slightly different than those observed for solutions in which GTE was added just prior to the analyses.

The shift to lower wavenumbers of the 1600 cm^{-1} bands suggests hydrogen bonding between GTE components and the ionized carboxylate groups in pectin. The CH_2 groups and the primary amide groups also seem to play a role in the interactions between pectin and GTE components. These results are in agreement with Vernhet *et al.* (1996).

Table 5.2: FTIR bands mean wavenumbers for pectin solutions with green tea extract (GTE) added at different concentrations at the beginning of the pectin hydration step (P_m) or just before the analysis (P_s).

Pectin solutions	Initial GTE concentration ($\mu\text{g/mL}$)	C-H stretching of CH₂ groups	Methyl ester groups (COOCH₃)	Primary amide groups (CO-NH₂)	Ionized carboxylate groups (COO⁻)
Pectin	0	2932.7 \pm 1.0 a	1741.4 \pm 1.2 a	1675.3 \pm 0.5 ab	1601.0 \pm 0.3 ab
P_m	500	2931.9 \pm 0.6 a	1741.2 \pm 1.0 a	1674.7 \pm 0.8 bc	1601.0 \pm 0.1 ab
	1000	2931.1 \pm 1.4 ab	1741.0 \pm 0.9 a	1674.4 \pm 1.2 bc	1601.5 \pm 0.2 a
	2000	2930.8 \pm 1.2 ab	1741.6 \pm 0.1 a	1673.3 \pm 0.1 cd	1598.9 \pm 1.2 c
P_s	500	2931.5 \pm 1.0 a	1741.3 \pm 1.2 a	1675.3 \pm 0.5 ab	1601.4 \pm 0.3 a
	1000	2931.5 \pm 1.4 a	1741.2 \pm 1.2 a	1675.1 \pm 0.0 abd	1601.5 \pm 0.2 a
	2000	2927.5 \pm 0.4 b	1741.4 \pm 0.1 a	1673.2 \pm 0.2 c	1599.5 \pm 1.1 bc

a,b,c,d: For a given column, data (\pm standard deviation) followed by the same letter are not significantly different ($P > 0.05$).

The authors explained that pectin-phenolic interactions are due to a cooperative hydrogen bonding between the oxygen atom of the carbohydrate and the phenolic hydroxyl group and to hydrophobic interactions (Vernhet *et al.*, 1996). Moreover, gallate-type catechins formed more stable complexes with pectin than those formed from non gallate type catechins (Hayashi *et al.*, 2005). Although shifts in the wavenumbers of the bands in the fingerprint spectral region occurred at GTE concentrations of 500 to 2000 $\mu\text{g/mL}$, those of the CH_2 , primary amide and ionized carboxylate groups only took place when GTE was added at a concentration of 2000 $\mu\text{g/mL}$ or can only be detected by FTIR analyses at the higher GTE concentration used. Renard *et al.* (2001) also observed that an increase in polyphenol concentration led to more important binding between polyphenol and polysaccharides.

All previous results showed that addition of GTE had significant effects on pectin solutions. Thus, pectin solutions with free radical scavenging activities and in which interactions with GTE components occurred were employed for the microencapsulation of probiotic cells with GTE.

5.5.2 Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* cells with GTE

Microparticles characteristics

The emulsification/internal gelation technique was used for the microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* R0052 cells with GTE. Microparticles produced were named according to the type of pectin solutions employed (P_m or P_s solutions) and their initial GTE concentration. For example, P_m500 referred to microparticles obtained from P_m solutions containing 500 $\mu\text{g/mL}$ GTE. Moreover, P_0 microparticles were produced from pure pectin solutions. Optical microscopy showed that probiotic bacteria were successfully encapsulated in pectin microparticles (Figure 5.2). The microparticles produced from P_m solutions were mainly spherical while incorporation of GTE in the pectin solutions just prior to microencapsulation process resulted in the formation of microparticles with irregular shapes.

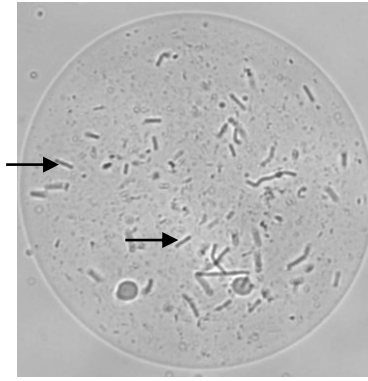


Figure 5.2: Pectin microparticles, produced from P_m solutions containing encapsulated *L. helveticus* cells (black arrows pointing to the bacterial cells) examined by optical microscopy.

The average diameter of the microparticles produced varied from 81 μm to 130 μm (Table 5.3). The use of P_m or P_s solutions and the initial concentration of GTE in the pectin solutions did not have a significant effect ($P > 0.05$) on the average diameter of the microparticles produced except for those formed from P_m500 microparticles which were significantly larger than P_0 and P_m2000 microparticles. Nevertheless, the $D(0.5)$ values, corresponding to the diameter at 50% of the distribution, for all microparticles produced were not significantly different independently of the GTE concentrations used. The observation that $D(0.5)$ values are smaller than the average diameter indicates that a large number of small microparticles was obtained in this encapsulation process.

The mean initial cell concentration in pectin solutions used for bacteria microencapsulation was 8.22 ± 0.11 log CFU/g. Addition of GTE did not result in significantly lower bacterial encapsulation yield (EY) in comparison with pure pectin solutions except for P_s1000 microparticles which had the lowest EY (48.1%). Nevertheless, the bacterial EY were always lower for P_s microparticles than for P_m microparticles and also for P_0 microparticles. This indicates that addition of GTE in pectin solutions just prior to the microencapsulation process had a negative effect on the encapsulation of bacterial cells. In contrast, the highest bacterial population and, consequently, the more important EY ($> 95\%$) were obtained for the P_m500 microparticles.

Table 5.3: Diameters, encapsulation yields and viability of *L. helveticus* cells in microparticles produced with pectin solutions containing green tea extract (GTE) added at different concentrations at the beginning of the pectin hydration step (P_m) or in solutions prior the microencapsulation (P_s).

Pectin solutions	Initial GTE concentration (µg/mL)	Average diameter of microparticles (µm)	D (0.5)* (µm)	Cell viability (log CFU/g)	Bacteria encapsulation yields (%)	Polyphenol encapsulation yields (%)
Pectin	0	90.0 ± 2.7 b	61.0 ± 2.8 a	8.08 ± 0.1 ab	73.7 ± 10.7 b	0 ± 0.0 c
P _m	500	130.4 ± 23.5 a	80.4 ± 15.3 a	8.27 ± 0.1 a	95.5 ± 8.6 a	78.95 ± 0.6 a
	1000	101.4 ± 19.2 ab	65.4 ± 4.9 a	8.10 ± 0.1 ab	71.5 ± 6.3 b	45.6 ± 18.6 b
	2000	81.4 ± 17.6 b	59.4 ± 2.4 a	8.12 ± 0.1 ab	75.7 ± 3.2 ab	36.1 ± 1.8 b
P _s	500	99.6 ± 8.8 ab	60.8 ± 14.2 a	8.01 ± 0.1 b	58.8 ± 5.8 bc	0 ± 0.0 c
	1000	97.5 ± 16.3 ab	67.5 ± 11.7 a	7.96 ± 0.0 b	48.1 ± 2.4 c	33.3 ± 13.3 b
	2000	99.6 ± 22.8 ab	59.4 ± 0.4 a	7.98 ± 0.0 b	57.0 ± 6.2 bc	39.8 ± 8.1 b

a,b,c: For a given column, data (± standard deviation) followed by the same letter are not significantly different (P > 0.05).

*: D (0.5) = diameter at 50% of the distribution (median value)

The comparison between the bacterial EY values reported in the literature is complex due to the wide range of microorganisms, encapsulation techniques and encapsulation materials employed (Gebara *et al.*, 2013). Bacterial EY obtained in this study were higher than those for *Lactobacillus acidophilus* (36.9%; Cai *et al.*, 2014), and *Bifidobacterium bifidum* cells (43-50%; Zou *et al.*, 2011) in alginate microcapsules prepared by an emulsification/internal gelation procedure and those for *Bifidobacterium infantis* or *Bifidobacterium breve* (37%; Vodnar and Socaciu, 2012) in chitosan-coated alginate microcapsules containing GTE prepared by emulsion. This could result, in part, to a lower initial cell concentration used in this work (8.22 log CFU/g) vs around 9.0 log CFU/g in the above mentioned studies, to a different sensitivity of *L. helveticus* cells to acidic conditions during microparticles preparation vs the bacterial strains employed in the other studies or to the use of different quantities of glacial acetic acid during the encapsulation procedure.

No polyphenol was detected in P₀ and P_s500 microparticles (results not shown), thus, a polyphenol encapsulation yield (PEY) of 0% was attributed to those microparticles (Table 5.3). An important diffusion of GTE hydrophilic components out of P_s500 microparticles during their partitioning to the aqueous phase following their production could explain, in part, the lack of polyphenol detection for those microparticles. Nevertheless, the interactions of GTE components with pectin functional groups in P_m solutions containing 500 µg/mL GTE (Figure 5.1) could have limited the diffusion of polyphenols out of P_m500 microparticles. Moreover, as observed for the bacterial EY, the highest PEY (> 78%) was obtained for P_m500 microparticles. Thus, incubation of GTE in the pectin solutions resulted in a greatly increased PEY at this GTE concentration. The PEY of other microparticles were not significantly different ($P > 0.05$) and varied from 33 to 45%. To the best of our knowledge, this study is the first to evaluate the encapsulation yield of green tea extract in microparticles also containing bacterial cells. Nevertheless, our PEY values are in concordance with those obtained by Lee *et al.* (2009), who obtained catechin encapsulation yields between 21 and 49% for catechin-pectinate loaded beads prepared by emulsification/internal gelation but without bacterial cells.

The DPPH radical scavenging activity of the microparticles was also measured (Figure 5.3). Microparticles without GTE had a 18% DPPH radical scavenging activity. Since no free radical scavenging activity was measured for pure pectin solutions (Table 5.1), this result could be due to an antioxidant activity of the bacterial cells in the microparticles. Indeed, a study of El-Adawi *et al.* (2012) showed that *Lactobacillus* strains had DPPH radical scavenging activities but that the level of these activities was strain dependent. In comparison with microparticles without GTE, the incorporation of GTE in pectin solutions increased the microparticles radical scavenging activity except for P_s500 and P_m2000 microparticles. Moreover, P_m2000 and P_s2000 microparticles had lower activities than P_m1000 and P_s1000 microparticles. The lower radical scavenging activity of these microparticles could result from interactions between GTE components and pectin functional groups as demonstrated by FTIR analyses of pectin solutions containing 2000 µg/mL GTE (Table 5.2), which could have limited the release of polyphenols from the microparticles during the analyses.

In addition to having radical scavenging activities, microparticles produced from P_m solutions were spherical with mean diameters near 100 µm and had high probiotic bacterial cells and polyphenol contents. In the next section, the efficiency of microparticles produced from P_m solutions to protect *L. helveticus* cells under gastrointestinal conditions was studied.

Survival of free and microencapsulated cells in simulated gastric juices

Preliminary results showed that the microencapsulation of cells in pectin microparticles produced from P_m solutions did not confer a protection to bacterial cells during exposure to simulated gastric juice (SGJ; results not shown) as compared with free cells. Coating of the pectin microparticles with native whey protein (10% whey protein isolate solution at pH 4.8) was thus carried out. Coating of pectin microparticles with whey proteins is possible due to electrostatic complexes formed by whey proteins and pectin which occur at a pH below the isoelectric point of whey proteins (pH 5.2-5.4)

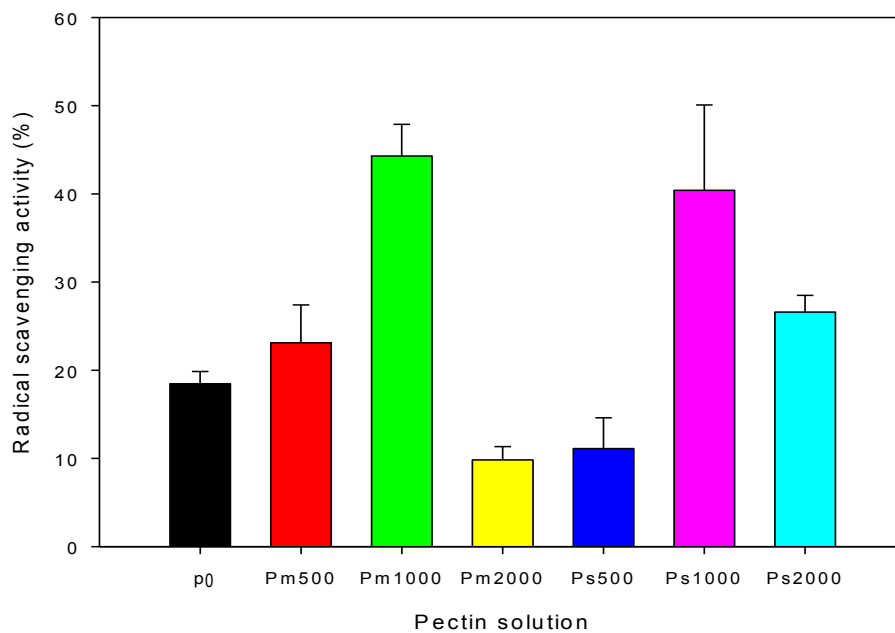


Figure 5.3: DPPH scavenging activity of microparticles produced from pectin solutions containing 0 to 2000 $\mu\text{g/mL}$ green tea extract (GTE) added at the beginning of the pectin hydration step (P_m) or in pectin solutions just before analysis (P_s). Error bars represent standard deviation.

(Guérin *et al.*, 2003; Gentès *et al.*, 2010). The attraction between these two compounds involves mainly -NH₃-groups (with positive charges) of the whey proteins and carboxyl groups (with negatively charges) of pectin (Gerez *et al.*, 2012).

Viability in SGJ of free and whey protein-coated microencapsulated cells was evaluated to determine their likely hood to survive passage through the stomach following oral administration. The viability of free cells exposed to SGJ (pH 2.0 in the presence of pepsin) was reduced as can be seen in Figure 5.4a. Initial free cell numbers (around 9.0 log CFU/g) decreased to 4.5-5.0 log CFU/g following 30 min exposure to SGJ. Cell numbers subsequently stabilised and almost no further reduction were observed following 60 and 120 min exposure. The presence of GTE did not have a significant effect ($P= 0.27$) on cell viability during exposure of free cells to SGJ. Our results suggested that free *L. helveticus* cells were sensitive to the acidic environment (pH 2.0) and that ingestion of unprotected cells should result in important viability loss. Nevertheless, more than 10⁸ CFU/g microencapsulated cells survived after 120 min in SGJ independently of the GTE concentration initially used (Figure 5.4b). Moreover, the mean survival rate of cells in microparticles produced from P_m solutions containing 1000 µg/mL GTE (104%) was significantly higher than the one for cells in P₀ microparticles (69%; $P < 0.05$). Thus, microencapsulation in coated pectin microparticles conferred protection to the bacterial cells when exposed to acidic conditions as compared to free cells and this protection was enhanced in the presence of 1000 µg/mL GTE. An increase in the viability of cells exposed to SGJ was also observed by Gerez *et al.* (2012) and Gbassi *et al.* (2009) when pectin and alginate microparticles, respectively, were coated with whey proteins. In this study, the protection of the microencapsulated microbial cells in SGJ could be due, in part, to the fact that the whey proteins-coated microparticles remained intact during exposure to the acidic conditions (Figure 5.5).

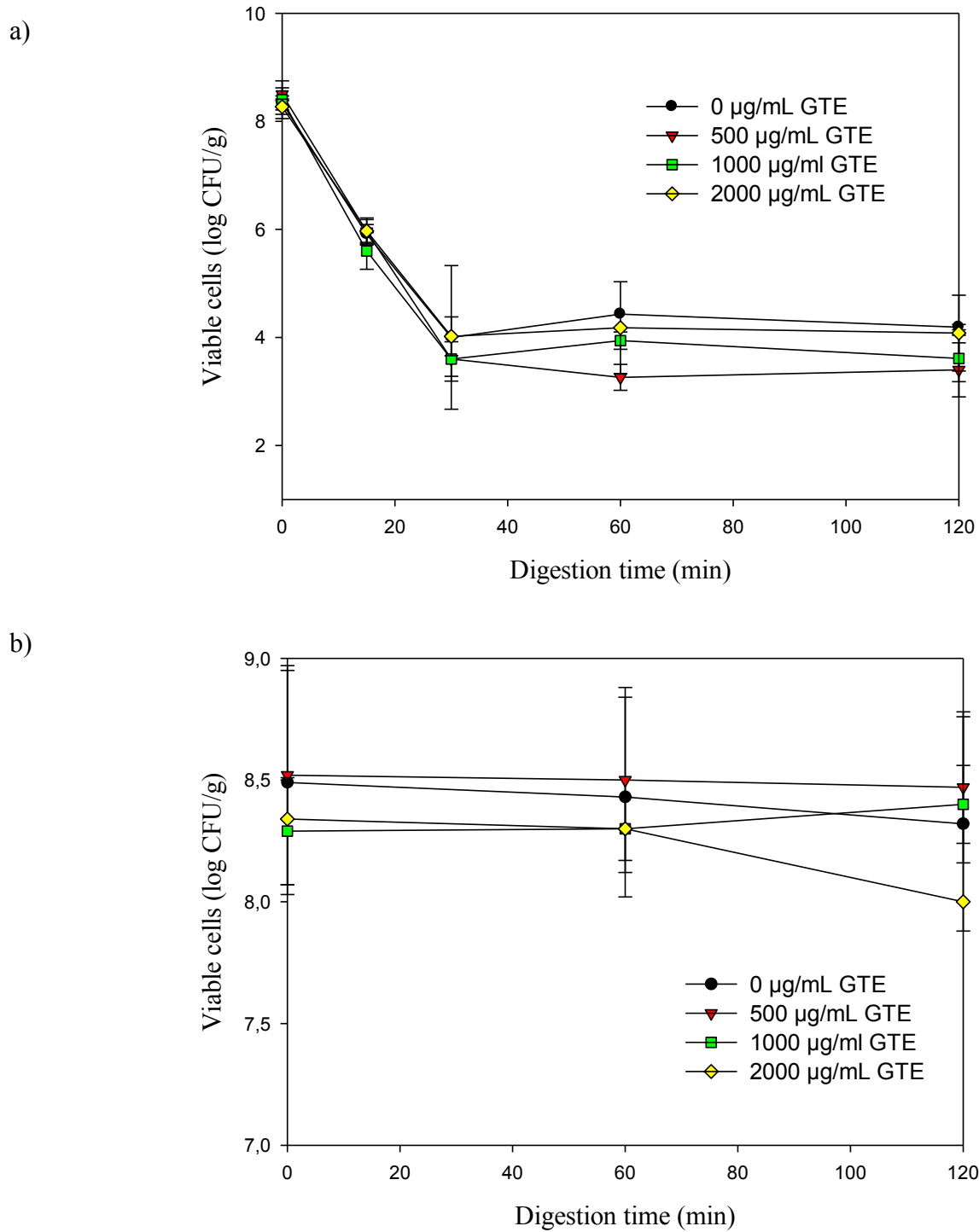


Figure 5.4: Survival during exposure to simulated gastric juice (37°C, pH 2.0 in the presence of pepsin) of free a) and microencapsulated b) *L. helveticus* R0052 cells. Error bars represent standard deviation.

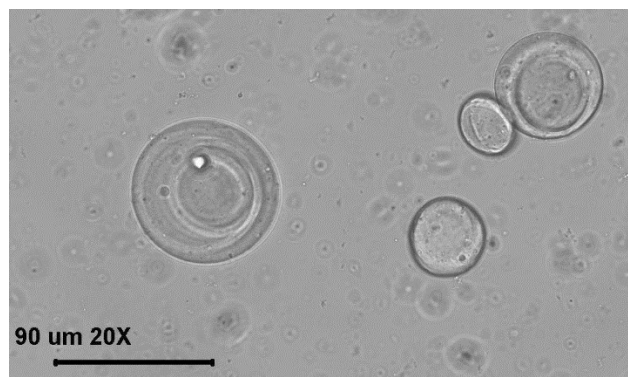


Figure 5.5: Representative micrograph of whey-protein coated microparticles containing *L. helveticus* cells following 120 min exposure to SGJ (pH 2.0 in the presence of pepsin).

The microencapsulation, thus, provided a physical barrier to cells against the conditions encountered during SGJ exposure. Moreover, the improvement of cells survival rates in the presence of 1000 $\mu\text{g/mL}$ GTE could be explained, in part, by the free radical scavenging ability of polyphenols such as catechins in GTE. The pectin solutions containing 1000 $\mu\text{g/mL}$ GTE used as encapsulating material had antioxidant capacity (Table 5.1) and could have provided protection to the oxygen-sensitive *L. helveticus* cells against the oxidative stress encountered during exposure to simulated gastric conditions. An increase in survival in SGJ was also observed for probiotic cells encapsulated in chitosan-coated alginate microparticles containing GTE (Vodnar and Socaciu; 2012) or selenium-enriched GTE (Vodnar and Socaciu, 2014). However, the GTE concentrations employed in these studies were between 1 and 10% while, in this work, the maximal concentration of GTE used was 0.2%. Moreover, several authors reported that large microparticles offer greater protection to bacterial cells in simulated gastric conditions than small particles (Chandramouli *et al.*, 2004; Lee and Heo, 2000; Muthukumarasamy *et al.*, 2006). In this study, microencapsulation conferred protection of the bacterial cells even if small microparticles were produced by the emulsification/internal gelation method used.

The viability of free and microencapsulated cells was also evaluated during sequential incubation of cells in SGJ and in simulated intestinal juice (SIJ).

Survival of free and microencapsulated cells following sequential incubation in simulated gastric and intestinal juices

Sequential exposure of free and bacterial cells in P_m microparticles coated with whey proteins to SGJ (pH 2.0, 60 min. in the presence of pepsin) followed by SIJ (pH 7.4, 120 min. in the presence of pancreatin and bile salts) was done to mimic the physiological gastrointestinal conditions. There was only a 0.5 to 1.1 log CFU/g decrease in viability of microencapsulated *L. helveticus* cells while free cells counts showed viability reduction levels of more than 4.5 log CFU/g after exposure to SGJ and SIJ (Table 5.4). Thus, as observed in SGJ, microencapsulation conferred protection to *Lactobacillus* cells in simulated gastrointestinal conditions when compared to free cells. Gbassi *et al.* (2009) also observed that coating of alginate particles with whey proteins conferred protection to bacterial cells when exposed both to SGJ (pH 1.8 in the presence of pepsin) and to SIJ (pH 6.5, in the presence of pancreatin, trypsin and bile salts). In this study, the number of viable cells in P_m500 , P_m1000 and P_m2000 microparticles was not significantly different than in P_0 microparticles ($P > 0.05$; Table 5.4). However, the decreases in mean cell counts following exposure to SGJ and SIJ were always less important in microparticles produced from $P_m + 500$ or $1000 \mu\text{g/mL}$ GTE than from pure pectin solutions.

It should be noted that the numbers of free viable bacterial cells measured following exposure to SGJ were similar to those obtained following sequential exposure to SGJ and SIJ which indicate that the strain used was not sensitive to pancreatin and to bile salts at the concentrations used. This is in concordance with the ability of this strain to survive in high concentrations of bile (Smith, 2014). For microencapsulated cells, the viable numbers were slightly higher following exposure to SGJ than after sequential exposure to SGJ and SIJ. This could be due, in part, to the recovery step of the microparticles following exposure to gastric conditions which could have led to small microparticles loss.

Table 5.4: Survival of free and microencapsulated *L. helveticus* cells (log CFU/g) in P_m microparticules with and without green tea extract following sequential incubation (37°C) in simulated gastric juice (60 min, pH 2.0) and in simulated intestinal juice (120 min, pH 7.4).

Cell Type	Initial green tea extract concentration (µg/mL)	0 min	180 min
Free cells	0	9.04 ± 0.1 a	4.49 ± 0.5 b
	500	9.20 ± 0.1 a	4.01 ± 0.2 b
	1000	8.82 ± 0.5 a	4.31 ± 0.5 b
	2000	8.97 ± 0.1 a	4.42 ± 0.2 b
Microencapsulated cells	0	8.49 ± 0.5 a	7.75 ± 0.7 a
	500	8.52 ± 0.5 a	8.03 ± 0.3 a
	1000	8.29 ± 0.2 a	7.77 ± 0.4 a
	2000	8.34 ± 0.3 a	7.26 ± 0.9 a

a,b: For a given row and also for a given column, data (± standard deviation) followed by the same letter are not significantly different (P > 0.05).

Although the coated microparticles remained intact during exposure to SGJ, microscopy revealed that they were completely dissociated after exposure to SIJ (results not shown). The microparticles must disintegrate in the gut to release the cells (Gbassi and Vandamme, 2012), so that they can confer health benefits to the host (Gebara *et al.*, 2013). The dissociation of microparticles in phosphate buffer is due to the reversible nature of the ionic network as chelating agents, such as phosphate or citrate which have a high affinity for calcium ions, will sequester the crosslinked networks and, consequently, disabled the gels (Voo *et al.*, 2011). Disintegration of whey protein-coated microparticles in SIJ was also observed by Gebara *et al.* (2013) and Gbassi *et al.* (2009 and 2011).

These data point out to the value of microencapsulation to deliver valuable bioactive ingredients to the intestinal region. Maintaining a viable cell number of at least 10⁶ CFU/mL during the passage along the human gastrointestinal tract is desired in order to impart health benefits (Shinde *et al.*, 2014). Our results suggest that a high number of viable bacterial cells can be delivered successfully to the intestine when present in whey protein-coated pectin microparticles. These data are in line with a recent study using

alginate beads coated with poly-L-lysine to protect probiotic cells (Champagne *et al.*, 2015).

5.6 Conclusion

The addition of GTE to pectin solutions resulted in the formation of matrices with radical scavenging activities that were used for the co-encapsulation of an oxygen-sensitive probiotic strain with GTE. The emulsification/internal gelation encapsulation method allowed the production of small ($\sim 100 \mu\text{m}$) and spherical microparticles with antioxidant activities and containing relatively high contents of *L. helveticus* R0052 cells and polyphenols. Incubation of GTE in pectin solutions prior to the microencapsulation improved the polyphenol encapsulation yields at low GTE concentrations. The use of P_m solutions containing $500 \mu\text{g/mL}$ GTE resulted in the production of microparticles with high bacterial (95%) and polyphenol (79%) encapsulation yields and with antioxidant activities. According to the PEY results, the polyphenol concentrations in P_m500 and P_m1000 microparticles were 235 and $270 \mu\text{M}$ respectively. Since the biological effects of green tea catechins *in vitro* are, in general, observed in the range of 10 to $100 \mu\text{M}$ (Liao *et al.*, 2001), these microparticles could be employed for direct ingestion as supplements or in liquid shots having potential health effects. Moreover, the coating of P_m microparticles with whey proteins was an efficient way to protect the bacterial cells from the conditions encountered in the upper part of the gastrointestinal tract. Microencapsulation of bacterial cells with $1000 \mu\text{g/mL}$ GTE provided an additional protection to the cells under gastric conditions. This study indicated that whey protein-coated pectin microparticles could be an interesting system for the combined delivery of viable probiotic cells and of green tea catechins to the lower part of the gastrointestinal tract.

Since probiotic bacteria and GTE are known to influence the gut microbiota composition, it could be interesting to evaluate the effects of ingestion of the microparticles on the intestinal microbiota. Moreover, the use, in food industries, of microparticles obtained from P_m solutions could result in the production of functional foods containing probiotic bacterial cells and GTE with limited effect on the sensory properties of the final products. Further data are needed to ascertain the interaction between GTE and microencapsulation on the viability of probiotics in foods, including during storage in an aerobic environment prior to consumption.

CHAPITRE 6 :
Conclusion générale et perspectives

Lors de la réalisation du premier objectif de ce travail, il a été démontré que bien que l'épigallocatechine gallate, la (+)-catéchine hydrate et l'extrait de thé vert (ETV) ont diminué le potentiel d'oxydo-réduction du milieu de culture, ils n'ont pas stimulés la croissance en présence d'oxygène des souches de bifidobactéries étudiées. Il semble donc que le maintien de conditions anaérobiques est essentiel pour permettre la croissance de ces souches ayant une sensibilité à l'oxygène élevée. Par contre, l'augmentation significative de la croissance en présence d'oxygène de la souche *Lactobacillus helveticus* dans le milieu de culture enrichi d'ETV semble être causée, entre autres, par l'effet observé des composants de l'ETV sur l'ordre des lipides bactériens. Ce phénomène a fait l'objet d'une étude plus approfondie lors de la réalisation du second objectif de ce travail.

Les effets d'une croissance de la souche *L. helveticus* R0052 en présence d'une concentration importante d'ETV sur les lipides bactériens ont été confirmés par les expérimentations réalisées dans la deuxième partie de ce travail. La résistance accrue contre les effets de l'oxygène de cette souche en présence de 2000 µg/mL d'ETV serait due, entre autres, à une augmentation de l'ordre des lipides bactériens causée par les interactions entre les groupements fonctionnels de l'ETV et les lipides des cellules bactériennes ainsi qu'à une modification significative de la composition en acides gras des lipides bactériens par une réponse des bactéries aux conditions rencontrées dans leur environnement. À notre connaissance, ces résultats montrent, pour la première fois, qu'en plus des effets directs de l'ETV sur le milieu de culture et sur les lipides bactériens, l'adaptation des bactéries à cette concentration d'ETV dans le milieu de culture aurait limité les effets de l'oxygène sur cette souche bactérienne permettant ainsi l'obtention de populations non significativement différentes en présence et en absence d'oxygène. Toutefois, l'absence de changements significatifs, autant au niveau de la structure des lipides bactériens qu'au niveau des populations bactériennes atteintes à la fin des fermentations en présence d'oxygène par ajout de 250 à 1000 µg/mL d'ETV au milieu de culture, montre qu'une quantité minimale d'ETV est requise pour qu'il y ait un effet significatif des composés de l'ETV sur les lipides bactériens et qu'une stimulation de la croissance de cette souche en présence d'oxygène survienne.

Enfin, le dernier objectif de cette thèse, portant sur la co-encapsulation bactéries-ETV, a permis de montrer que l'ETV peut aussi être utilisé pour la création d'une matrice de microencapsulation ayant d'importantes propriétés antioxydantes et dans laquelle les composés du thé vert sont liés en tout ou en partie avec les groupements fonctionnels de la pectine. De plus, une période d'incubation dans les solutions de pectine de l'ETV à des concentrations de 500 et 1000 µg/mL avant la microencapsulation des bactéries avec l'ETV a permis l'obtention de microparticules sphériques de petites tailles contenant plus de 10⁸ CFU/g de bactéries viables et plus de 200 µM de polyphénols. Ces microparticules, lorsqu'enrobées avec des protéines de lactosérum, ont protégé les bactéries de l'exposition à des conditions gastrointestinales simulées augmentant ainsi de façon considérable leurs taux de survie en comparaison avec des cellules libres exposées aux mêmes conditions.

Au terme de ce travail, il apparaît que les composés d'un extrait de thé vert, dont les catéchines, auraient limité les effets de l'oxygène dissous sur une souche sensible à l'oxygène et ont permis l'amélioration de sa croissance en présence d'oxygène dissous. La co-encapsulation bactéries-ETV a aussi amélioré considérablement la survie de cette souche dans des conditions gastrointestinales simulées en comparaison avec des cellules libres. Les hypothèses à l'origine de ce travail ont donc été vérifiées pour cette souche bactérienne. Toutefois, les effets de l'ETV sont variables selon la concentration utilisée et la sensibilité à l'oxygène des souches bactériennes employées.

Suite aux travaux de recherche réalisés, de nouvelles voies d'étude peuvent être proposées. Il serait intéressant :

- 1) de déterminer si le changement de la composition lipidique de la souche *L. helveticus* R0052 suite à sa croissance dans un milieu de culture enrichi de 2000 µg/mL d'ETV permettrait d'augmenter la résistance de cette souche dans un milieu acide comme un jus ou un fluide gastrique simulé. En effet, Corcoran *et al.* (2007) ont observé qu'une augmentation du contenu en acide oléique des lipides d'une souche de *Lactobacillus rhamnosus* par une croissance dans un milieu de culture contenant du Tween 80 a permis une augmentation importante de sa survie lors d'une exposition à des fluides gastriques

simulés. Donc, l'augmentation importante du contenu en acide oléique survenue suite à une croissance de la souche *L. helveticus* R0052 dans un milieu enrichi de 2000 µg/mL observée dans cette étude suggère que la survie de cette souche pourrait être améliorée lors d'un entreposage dans un aliment acide ou lors de son exposition à des fluides gastriques.

2) d'étudier la co-encapsulation bactéries-ETV comme moyen permettant de limiter les effets de l'oxygène sur les bactéries sensibles durant leur entreposage dans des produits alimentaires et ainsi améliorer leur survie. Une meilleure survie pourrait signifier une diminution du surdosage en bactéries probiotiques qui est parfois nécessaire pour maintenir un nombre suffisant de microorganismes viables jusqu'au moment de la consommation des produits alimentaires en contenant. L'ajout d'ETV permettrait aussi d'augmenter la valeur ajoutée de ces aliments fonctionnels dû aux effets bénéfiques potentiels de ces extraits pour la santé des humains.

3) d'évaluer l'effet d'une consommation de microparticules contenant des bactéries probiotiques et de l'ETV sur le microbiote intestinal. Les microparticules développées dans ce travail semblent permettre une livraison combinée de bactéries probiotiques viables et de catéchines à la partie inférieure du tractus gastrointestinal, ce qui pourrait avoir un effet sur le microbiote intestinal. En effet, les catéchines du thé vert peuvent moduler l'adhésion des bactéries ainsi que leur colonisation dans l'intestin (Ito *et al.*, 2008), promouvoir la croissance de bactéries bénéfiques pour la santé (Okubo *et al.*, 1992; Jin *et al.*, 2012) et inhiber la croissance de microorganismes pathogènes (Su *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2006; Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2007; Almajano *et al.*, 2008). Les catéchines dans les microparticules pourraient donc non seulement améliorer la survie des bactéries durant leur passage dans le tractus gastrointestinal, favoriser leur colonisation lorsque celles-ci seraient libérées dans les intestins, en plus d'apporter des effets bénéfiques pour l'hôte de par leurs effets potentiels pour la santé.

Bibliographie

- ACIA (2015) Agence canadienne d'inspection des aliments. Allégations relatives aux probiotiques. www.inspection.gc.ca/aliments/étiquetage/l-etiquetage-des-aliments-pour-l-industrie-allegations-sante/fra/1392834838383/1392834887794?chap=9.
- Adams, C.A. (2010) The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr. Res. Rev.* 23:37-46.
- Aguirre, M., Venema, K. (2015) Does the gut microbiota contribute to obesity? Going beyond the gut feeling. *Microorganisms*. 3: 213-235.
- Ahmed, M.M., El-Rasoul, S.A., Auda, S.H., Ibrahim, M.A. (2013) Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium-sodium alginate microparticles. *Saudi Pharm. J.* 21:61-69.
- Ahn, J.B., Hwang, H.-J., Park, J.-H. (2001) Physiological responses of oxygen-tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11:443-451.
- Ahn, Y.-J., Sakanaka, S., Kim, M.-J., Kawamura, T., Fujisawa, T., Mitsuoka, T. (1990) Effect of green tea extract on growth of intestinal bacteria. *Microb. Ecol. Health Dis.* 3:335-338.
- Ait-Belgnaoui, A., Colom, A., Braniste, V., Ramalho, L., Marrot, A., Cartier, C., Houdeau, E., Theodorou, V., Tompkins, T. (2014) Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroent. Motil.* 26:510-520.
- Akahoshi, R., Takahashi, Y. (1996) Yogurt containing *Bifidobacterium* and process for producing the same. KK Yakult Honsha. PCT International Patent Application, WO 96/37113 A1, JP 95-151108 (19950526).
- Akin, M.B., Akin, M.S., Kirmaci, Z. (2007) Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. *Food Chem.* 104:93-99.
- Albrecht, D.K., Kappus, H., Remmer, H. (1978) Lipid peroxidation and cell damage in isolated hepatocytes due to bromotrichloromethane. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 46:499-505.
- Allwyn Sundar Raj, A., Rubila, S., Jayabalan, R., Ranganathan, T.V. (2012) A review on pectin: Chemistry due to general properties of pectin and its pharmaceutical uses. 1:550 doi:10.4172/scientificreports.550
- Almajano, M.P., Carbó, R., López Jiménez, J.A., Gordon, M.H. (2008) Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chem.* 108:55-63.
- Al-Qadiri, H.M., Lin, M., Al-Holy, M.A., Cavinato, A.G., Rasco, B.A. (2008) Detection of sublethal thermal injury in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and *Listeria monocytogenes* using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy (4000 to 600 cm^{-1}). *J. Food Sci.* 73:M54-M61.
- Alvarez-Olmos, M.I., Oberhelman, R.A. (2001) Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin. Infect. Dis.* 32:1567-1576.
- Alvarez-Ordóñez, A., Prieto, M. (2010) Changes in ultrastructure and Fourier transform infrared spectrum of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells after exposure to stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:7598-7607.

- Ami, D., Natalello, A., Schultz, T., Gatti-Lafranconi, P., Lotti, M., Doglia, S.M., de Marco, A.** (2009) Effects of recombinant protein misfolding and aggregation on bacterial membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1794:263-269.
- Anal, A.K., Singh, H.** (2007) Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci. Tech.* 18:240-251.
- Anders, R.F., Hogg, D.M., Jago, G.R.** (1970) Formation of hydrogen peroxide by group *N streptococci* and its effect on their growth and metabolism. *Appl. Microbiol.* 19:608-612.
- Anesini, C., Ferraro, G.E., Filip, R.** (2008) Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *J. Agric. Food Chem.* 56:9225-9229.
- Ankolekar, C., Johnson, D., da Silva Pinto, M., Johnson, K, Labbe, R., Shetty, K.** (2011) Inhibitory potential of tea polyphenolics and influence of extraction time against *Helicobacter pylori* and lack of inhibition of beneficial lactic acid bacteria. *J. Med. Food* 14:1321-1329.
- Annan, N.T., Borza, A.D., Truelstrup Hansen, L.** (2008) Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Res. Int.* 41:184-193.
- Arltoft, D., Madsen, F., Ipsen, R.** (2008) Relating the microstructure of pectin and carrageenan in dairy desserts to rheological and sensory characteristics. *Food Hydrocolloid* 22:660-673.
- Armoskaite, V., Ramanauskiene, K., Maruska, A., Razukas, A., Dagilyte, A., Baranauskas, A., Briedis, V.** (2011) The analysis of quality and antioxidant activity of green tea extracts. *J. Medicinal Plant Res.* 5:811-816.
- Arora, A., Byrem, T.M., Nair, M.G., Strasburg, G.M.** (2000) Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 373:102-109.
- Arrondo, J.L.R., Gõni, F.M.** (1998). Infrared studies of protein-induced perturbation of lipids in lipoproteins and membranes. *Chem. Phys. Lipids* 96:53-68.
- Assifaoui, A., Loupiac, C., Chambin, O., Cayot, P.** (2010) Structure of calcium and zinc pectinate films investigated by FTIR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 345:929-933.
- Atassi, F., Brassart, D., Grob, P., Graf, F., Servin, A.L.** (2006) *In vitro* antibacterial activity of *Lactobacillus helveticus* strain KS300 against diarrhoeagenic, uropathogenic and vaginosis-associated bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 101:647-654.
- Atyabi, F., Majzoob, S., Iman, M., Salehi, M., Dorkoosh, F.** (2005) In vitro evaluation and modification of pectinate gel beads containing trimethyl chitosan, as a multi-particulate system for delivery of water-soluble macromolecules to colon. *Carbohydr. Polym.* 61:39-51.
- Baldauf, N.A., Rodriguez-Romo, L.A., Männig, A., Yousef, A.E., Rodriguez-Saona, L.E.** (2007) Effect of selective growth media on the differentiation of *Salmonella enterica* serovars by Fourier-Transform Mid-Infrared spectroscopy. *J. Microbiol. Meth.* 68:106-114.
- Balentine, D.A., Wiseman, S.A., Bouwens, L.C.M.** (1997) The chemistry of tea flavonoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37:693-704.
- Bancirova, M.** (2010) Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. *Food Res. Int.* 43:1379-1382.

- Baskett, R.C., Hentges, D.J.** (1973) *Shigella flexneri* inhibition by acetic acid. *Infect. Immun.* 8:91-97.
- Bazinet, L., Doyen, A.** 2015. Antioxidants, mechanisms and recovery by membrane processes. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* DOI:10.1080/10408398.2014.912609.
- Bazinet, L., Péricou, J., Araya-Farias, M.** (2009). Effect of flow rate and acid molarity on redox potential modulation during electroreduction of milk and simulated milk aqueous mineral phase. *Food Chem.* 114:919-926.
- Béal, C., Marin, M., Fontaine, E., Fonseca, F., Obert, J.-P.** (2008) Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. Dans: *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*, G. Corrieu, F.-M, Luquet (eds), Tech et Doc Lavoisier, Paris, pp.661-785.
- Bédié, G.K., Turgeon, S.L., Makhlof, J.** (2008) Formation of native whey protein isolate-low methoxyl pectin complexes as a matrix for hydro-soluble food ingredient entrapment in acidic foods. *Food Hydrocolloid* 22:836-844.
- Beney, L., Mille, Y., Gervais, P.** (2004) Death of *Escherichia coli* during rapid and severe dehydration is related to lipid phase transition. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:457-464.
- Bernal, P., Lemaire, S., Pinho, M.G., Mobashery, S., Hinds, J., Taylor, P.W.** (2010) Insertion of epicatechin gallate into the cytoplasmic membrane of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disrupts penicillin-binding protein (PBP) 2a-mediated β -lactam resistance by delocalizing PBP2. *J. Biol. Chem.* 285:24055-24065.
- Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L.** (1994) *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 35:483-489.
- Bernstein, H., Payne, C.M., Bernstein, C., Schneider, J., Beard, S.E., Crowley, C.L.** (1999) Activation of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein misfolding by the bile salt, deoxycholate. *Toxicol. Lett.* 108:37-46.
- Biagi, E., Candela, M., Fairweather-Tait, S., Franceschi, C., Brigidi, P.** (2012) Aging in the human metaorganism: the microbial counterpart. *Age.* 34: 247-267.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C.** (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* 36:527-543.
- Bolduc, M.-P., Raymond, Y., Fustier, P., Champagne, C.P., Vuilleumard, J.-C.** (2006) Sensitivity of bacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk. *Int. Dairy J.* 16:1038-1048.
- Borchers, A.T., Selmi, C., Meyers, F.J., Keen, C.L., Gershwin, M.E.** (2009) Probiotics and immunity. *J. Gastroenterol.* 44:26-46.
- Boylston, T.D., Vinderola, C.G., Ghoddusi, H.B., Reinheimer, J.A.** (2004) Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *Int. Dairy J.* 14:375-387.
- Brock, T.D., Madigan, M.T.** (1988) Cell biology, Dans: *Biology of microorganisms*. T.D. Brock, M.T. Madigan (eds) Fifth ed., Prentice-Hall International, Englewood Cliffs, pp. 60-112.
- Brown, M.H., Emberger, O.** (1980) Oxidation-reduction potential. Dans: *Microbial Ecology of foods: Factors affecting life and death of microorganisms*. Vol. 1, J.H Silliker *et al.* (eds), Academic Press, New York, pp.112-125.
- Bruno-Bárcena, J.M., Andrus, J.M., Libby, S.L., Klaenhammer, T.R., Hassan, H.M.** (2004) Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal

lactobacilli provides protection against hydrogen peroxide toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4702–4710.

- Buckley, N.D., Champagne, C.P., Masotti, A.I., Wagar, L.E., Tompkins, T.A., Green Johnson J.M.** (2011). Harnessing functional food strategies for the health challenges of space travel: Fermented soy for astronaut nutrition. *Acta Astronaut.* 68:731-738.
- Bukowska, H., Pieczul-Mróz, J., Jastrzebska, M., Chelstowski, K., Naruszewicz, M.** (1998) Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. *Atherosclerosis* 137:437–438.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J.** (2011) Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. *J. Food Eng.* 104:467-483.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J.** (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* 3:3–8.
- Cai, S., Zhao, M., Fang, Y., Nishinari, K., Phillips, G.O., Jiang, F.** (2014) Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686 via emulsification/internal gelation of alginate using Ca-EDTA and CaCO₃ as calcium sources. *Food Hydrocolloid* 39: 295-300.
- Cakmak, G., Togan, I., Severcan, F.** (2006) 17-β-Estradiol induced compositional, structural and functional changes in rainbow trout liver, revealed by FTIR spectroscopy: A comparative study with nonylphenol. *Aquat. Toxicol.* 77:53-63.
- Campbell, N.A., Mathieu, R.** (1995) *Biologie*. 1^{ère} édition, Édition du renouveau, Québec, 1190 pages.
- Campbell, N.A., Reece, J.B.** (2008) Membrane structure and function. Dans: *Biology*. 8^e édition, Benjamin Cummings, pp.125-141.
- Cao-Hoang, L., Marechal, P.A., Lê-Thanh, M., Gervais, P., Waché, Y.** (2008) Fluorescent probes to evaluate the physiological state and activity of microbial biocatalysts: a guide for prokaryotic and eukaryotic investigation. *Biotechnol. J.* 3:890–903.
- Capela, P., Hay, T.K.C., Shah, N.P.** (2007) Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. *Food Res. Int.* 40:1261-1269.
- Cappa, F., Cattivelli, D., Cocconcelli, P.S.** (2005) The *uvrA* gene is involved in oxidative and acid stress responses in *Lactobacillus helveticus* CNBL1156. *Res. Microbiol.* 156:1039–1047.
- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M.A., Severi, C.** (2015) The gut-brain axis: Interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals Gastroenterol.* 28:203-209.
- Caturla, N., Vera-Samper, E., Villalaín, J., Mateo, C.R., Micol, V.** (2003) The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Rad. Biol. Med.* 34:648-662.
- Cazzola, M., Tompkins, T.A., Matera, M.G.** (2010) Immunomodulatory impact of a symbiotic in TH1 and TH2 models of infection. *Ther. Adv. Respir. Dis.* 4:259-270.
- Champagne, C.P., Fustier, P.** (2007) Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotech.* 18:184-190.
- Champagne, C.P., Gardner, N.J., Roy, D.** (2005) Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:61-84.

- Champagne C.P., Raymond Y., Guertin, N., Martoni C.J., Jones M.L., Mainville I., Arcand Y.** (2015) Impact of a yogurt matrix and cell microencapsulation on the survival of *Lactobacillus reuteri* in four in-vitro gastric digestion procedures. *Benef. Microbes*, In press.
- Chan, L.W., Lee, H.Y., Heng, P.W.S.** (2002) Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. *Int. J. Pharm.* 242:259-262.
- Chan, L.W., Lee, H.Y., Heng, P.W.S.** (2006) Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydr. Polym.* 63:176-187.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., Jones, M.** (2004) An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *J. Microbiol. Meth.* 56:27-35.
- Chatjigakis, A.K., Pappas, C., Proxenia, N., Kalantzi, O., Rodis, P., Polissiou, M.** (1998) FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydr. Polym.* 37:395-408.
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F.C., Marzo, F., Villarán, M.C.** (2010) Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 142:185-189.
- Chávarri, M., Marañón, I., Villarán, M.C.** (2012) Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. Dans: *Probiotics*, E.C. Rogobelo (ed), pp.501-540.
- Chen, M.-J., Chen, K.-N.** (2007) Applications of probiotic encapsulation in dairy products. Dans: *Encapsulation and controlled release technologies in food systems*. J.M. Lakkis, J.M. (ed), Blackwell Publishing, Ames, pp. 83-112.
- Chen, L., Remondetto, G.E., Subirade, M.** (2006) Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends Food Sci. Tech.* 17:272-283.
- Chen, L., Subirade, M.** (2006) Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials.* 27:4646-4654.
- Chen, L., Subirade, M.** (2007) Effect of preparation conditions on the nutrient release properties of alginate-whey protein granular microspheres. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65:354-362.
- Chen, L., Subirade, M.** (2009) Elaboration and characterization of soy/zein protein microspheres for controlled nutraceutical delivery. *Biomacromolecules.* 10:3327-3334.
- Chen, L., Yang, X., Jiao, H., Zhao, B.** (2002) Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2 cells. *Toxicol. Sci.* 69:149-156.
- Chen, S., Zhao, Q., Ferguson, L.R., Shu, Q., Weir, I., Garg, S.** (2012) Development of a novel probiotic delivery system based on microencapsulation with protectants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 1447-1457.
- Chernyshov, P.V.** (2009) Randomized, placebo-controlled trial on clinical and immunologic effects of probiotic containing *Lactobacillus rhamnosus* R0011 and *L. helveticus* R0052 in infants with atopic dermatitis. *Microb. Ecol. Health Disease.* 21:228-232.
- Christensen, S.H.** (1986). Pectins. Dans: *Food hydrocolloids III*, M. Glicksman (ed) CRC Press, Florida, pp.205-230.

- Coates, J.** (2000) Interpretation of infrared spectra, a practical approach. Dans: Encyclopedia of analytical chemistry, R.A. Meyers (ed), John Wiley & sons Ltd., Chichester, pp. 10815-10837.
- Collado, M.C., Isolauri, E., Salminen, S., Sanz, Y.** (2009) The impact of probiotic on gut health. *Curr. Drug Metab.* 10:68–78.
- Condon, S.** (1987) Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* 46:269-280.
- Corcoran, B.M., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P.** (2007) Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice. *Microbiology.* 153:291-299.
- Cotârlet, M., Dima, S., Bahrim, G.** (2014) Psychrotrophic *Streptomyces* spp. cells immobilisation in alginate microspheres produced by emulsification–internal gelation. *J Microencapsul.* 31:93–99.
- Cruz, A.G., Castro, W.F., Faria, J.A.F., Bogusz, S. Jr., Granato, D., Celeguini, R.M.S., Lima-Pallone, J., Godoy, H.T.** (2012a) Glucose oxidase: A potential option to decrease the oxidative stress in stirred probiotic yogurt. *Food Sci. Technol.* 47:512-515.
- Cruz, A.G., Castro, W.F., Faria, J.A.F., Lollo, P.C.B., Amaya-Farfán, J., Freitas, M.Q., Rodrigues, D., Oliveirea, C.A.F., Godoy, H.T.** (2012b) Probiotic yogurts manufactured with increased glucose oxidase levels: Postacidification, proteolytic patterns, survival of probiotic microorganisms, production of organic acid and aroma compounds. *J. Dairy Sci.* 95:2261-2269.
- Cruz, A.G., Faria, J.A.F., Walter, E.H.M., Andrade, R.R., Cavalcanti, R.N., Oliveira, C.A.F., Granato, D.** (2010) Processing optimization of probiotic yogurt containing glucose oxidase using response surface methodology. *J. Dairy Sci.* 93:5059–5068.
- Cueva, C., Moreno-Arribas, M.V., Martín-Álvarez, P.J., Bills, G., Vicente, M.F., Basilio, A., López Rivas, C., Requena, T., Rodríguez, J.M., Bartolomé, B.** (2010) Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic, and pathogenic bacteria. *Res. Microbiol.* 161:372-382.
- Cullis, P.R., Hope, M.J., De Kruijff, B., Verkleij, A.J., Tilcock, C.P.S.** (1985) Structural properties and functional roles of phospholipids in biological membranes. Dans: *Phospholipids and Cellular Regulations.* J.F. Kuo (ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 1–60.
- Da Cruz, A.G., Faria, J.A.F., Van Dender, A.G.F.** (2007) Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Res. Int.* 40:951-956.
- Dave, R.I., Shah, N.P.** (1997a) Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *Int. Dairy J.* 7:31-41.
- Dave, R.I., Shah, N.P.** (1997b) Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. *Int. Dairy J.* 7:435-443.
- Dave, R.I., Shah, N.P.** (1997c) Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. *Int. Dairy J.* 7:537–545.
- Davies, R., Obafemi, A.** (1985) Response of micro-organisms to freeze-thaw stress. Dans: *Microbiology of frozen foods,* R.K. Robinson (ed) Elsevier Applied Science, London, pp.83-107.
- Davis, C.D., Milner, J.A.** (2009) Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *J. Nutr. Biochem.* 20:743–752.

- Davis, R., Mauer, L.J.** (2010) Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. Dans: Current research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, A. Méndez-Vilas, (ed.), Badajoz: Formatex Research Center, pp.1582-1594.
- De Angelis, M., Gobbetti, M.** (2004) Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. *Proteomics* 4:106-122.
- Dehkharghanian, M., Lacroix, M., Vijayalakshmi, M.A.** (2009) Antioxidant properties of green tea polyphenols encapsulated in caseinate beads. *Dairy Sci. Technol.* 89:485-499.
- Demple, B.** (1987) Adaptive responses to genotoxic damage: bacterial strategies to prevent mutation and cell death. *BioEssays.* 6:157-160.
- Denich, T.J., Beaudette, L.A., Lee, H., Trevors, J.T.** (2003) Effects of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J. Microbiol. Meth.* 52:149-182.
- De Vos, P., Faas, M.M., Sapsojevic, M., Sikkema, J.** (2010) Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int. Dairy J.* 20:292-302.
- De Vuyst, L.** (2000) Technology Aspects Related to the Application of Functional Starter Cultures. *Food Technol. Biotechnol.* 38:105–112.
- Dias, F.S., Ávila, C.L., Schwan, R.F.** (2011) In situ inhibition of *Escherichia coli* isolated from fresh pork sausage by organic acids. *J. Food Sci.* 76:M605-M610.
- Di Giancamillo, A., Vitari, F., Savoini, G., Bontempo, Bersani, C., Dell’Orto, V., Domeneghini, C.** (2008) Effects of orally administered probiotic *Pediococcus acidilactici* on the small and large intestine of weaning piglets. A qualitative and quantitative micro-anatomical study. *Histol. Histopathol.* 23:651-664.
- Dinan, T.G., Stanton, C., Cryan, J.F.** (2013) Psychobiotics: A novel class of psychotropic. *Biol. Psychiatry* 74:720-726.
- Diop, L., Guillou, S., Durand, H.** (2008) Probiotic food supplement reduces stress-induced gastrointestinal symptoms in volunteers: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Nutr. Res.* 28:1-5.
- Doherty, S.B., Auty, M.A., Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Brodtkor, A.** (2012) Application of whey protein micro-bead coatings for enhanced strength and probiotic protection during fruit juice storage and gastric incubation. *J. Microencap.* 29:713-728.
- Donà, M., Dell'Aica, I., Calabrese, F., Benelli, R., Morini, M., Albini, A., Garbisa, S.** (2003) Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. *J. Immunol.* 170 (8):4335–4341.
- Doron, S., Gorbach, S.L.** (2006) Probiotics: their role in the treatment and prevention of disease. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 4:261-275.
- Drucker, D.B.** (1981) Microbiological applications of gas chromatography. Cambridge University Press, Cambridge, 478 pages.
- Duda-Chodak, A., Tarko, T., Statek, M.** (2008) The effect of antioxidants on *Lactobacillus casei* cultures. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 7:39-51.
- Dunne, C., O’Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O’Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S. et al.** (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:386S–392S.

- Dunning, J.C., Ma, Y., Marquis, R.E.** (1998) Anaerobic killing of oral streptococci by reduced, transition metal cations. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:27-33.
- Easo, J.G., Measham, J.D., Munroe, J., Green-Johnson, J.M.** (2002) Immunostimulatory actions of lactobacilli: Mitogenic induction of antibody production and spleen cell proliferation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*. *Food Agric. Immunol.* 14:73-83.
- Ebel, B, Martin, F., Le, L.D.T., Gervais, P., Cachon, R.** (2011) Use of gases to improve survival of *Bifidobacterium bifidum* by modifying redox potential in fermented milk. *J. Dairy Sci.* 94:2185-2191.
- El-Adawi, H.I., Khalil, M.A., El-Sheekh, M.M., El-Deeb, N.M., Hussein, M.Z.** (2012) Cytotoxicity assay and antioxidant activities of the lactic acid bacterial strains. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6:1700-1712.
- Esposito, E., Rotilio, D., Di Matteo, V., Di Giulio, C., Cacchio, M., Algeri, S.** (2002) A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol. Aging* 23:719–735.
- Farnworth, E.R. Champagne, C.** (2010) Production of probiotic cultures and their incorporation into foods. Dans: *Bioactive foods in promoting health: probiotics and prebiotics*, R.R. Watson, V.R. Preedy, (eds), Academic Press, Oxford, pp. 3-17.
- Farooqui, A.A.** (2012) Beneficial effects of green tea catechins on neurological disorders. Dans: *Phytochemicals, signal transduction, and neurological disorders*, A.A. Farooqui (ed), Springer, New York, pp.117-149.
- Feo, J.C., Castro, M.A., Robles, L.C., Aller, A.J.** (2004) Fourier-transform infrared spectroscopic study of the interactions of selenium species with living bacterial cells. *Anal. Bioanal. Chem.* 378:1601-1607.
- Food and Agriculture Organization (FAO) - World Health Organization (WHO)** (2006) Probiotics in food health and nutritional properties and guidelines for evaluation (FAO/WHO working group report). Food and Agriculture Organization of the United Nations-World Health Organization, Rome, Italy.
- Fortin, M.-H., Champagne, C.P., St-Gelais, D., Britten, M., Fustier, P., Lacroix, M.** (2011) Effect of time of inoculation, starter addition, oxygen level and salting on the viability of probiotic cultures during Cheddar cheese production. *Int. Dairy J.* 21:75-82.
- Foster, L.M., Tompkins, T.A., Dahl, W.J.** (2011) A comprehensive post-market review of studies on a probiotic product containing *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Lactobacillus rhamnosus* R0011. *Benef. Microbes.* 2:319-334
- Frei, B., Higdon, J. V.** (2003) Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: Evidence from animal studies. *J. Nutr.* 133:3275S–3284S.
- Gardiner, G.E., O’Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M.A.E., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Ross, R.P., Stanton, C.** (2000) Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2605-2612.
- Gahlaut, A., Dabur, R.** (2014) Proteomic analysis of *Escherichia coli* in response to catechins rich fractions. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6:784-787.
- Gareau, M.G., Sherman, P.M., Walker, W.A.** (2010) Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7:503-514.
- Garip, S., Bozoglu, F., Severcan, F.** (2007) Differentiation of mesophilic and thermophilic bacteria with Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 61:186–192.

- Gaudreau, H., Champagne, C.P., Remondetto, G.E., Bazinet, L., Subirade, M.** (2013) Effect of catechins on the growth of oxygen-sensitive probiotic bacteria. *Food Res. Int.* 53:751-757.
- Gaussier, H., Lefèvre, T., Subirade, M.** (2003) Binding of pediocin PA-1 with anionic lipid induces model membrane destabilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6777-6784.
- Gbassi, G.K., Vandamme, T., Ennahar, S., Marchioni, E.** (2009) Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *Int. J. Food Microbiol.* 129:103-105.
- Gbassi, G.K., Vandamme, T., Yolou, F.S., Marchioni, E.** (2011) In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. *Int. Dairy J.* 21:97-102.
- Gbassi, G.K., Vandamme, T.** (2012) Probiotic encapsulation technology: From microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics* 4:149-163.
- Gebara, C., Chaves, K.S., Ribeiro, M.C.E., Souza, F.N., Grosso, C.R.F., Gigante, M.L.** (2013) Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Res. Int.* 51:872-878.
- Gedek, B.** (1993) Darmflora- Physiologie und Ökologie. *Chemother. J.* S1: 2-6.
- Geiger, O., González-Silva, N., López-Lara, I.M., Sohlemkamp, C.** (2010) Amino acid-containing membrane lipids in bacteria. *Progr. Lipid Res.* 49:46-60.
- Gentès, M.C., St-Gelais, D., Turgeon, S.L.** (2010) Stabilization of whey protein isolate-pectin complexes by heat. *J. Agric. Food Chem.* 58:7051-7058.
- Gerez, C.L., Font de Valdez, G., Gigante, M.L., Grosso, C.R.F.** (2012) Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. *Lett. Appl. Microbiol.* 54:552-556.
- Gezer, K., Duru, M.E., Kivrak, I., Turkoglu, A., Mercan, N., Turkoglu, H., Gulcan, S.** (2006) Free-radical scavenging capacity and antimicrobial activity of wild edible mushroom from Turkey. *Afr. J. Biotechnol.* 5:1924-1928.
- Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C.N.** (1999) Encapsulation in the food industry: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 50:213-224.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B.** (1995) Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125:1401-1412.
- Gibson, G.R., Wang, X.** (1994) Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 77:412-420.
- Gill, C.O.** (2006) Microbiology of frozen foods. Dans: *Handbook of frozen food processing and packaging*. D.W. Sun (ed), CRC Press, Florida pp.85-100.
- Gill, H.S.** (2003) Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastro-intestinal tract. *Best Pract. Res. Cl. Ga.* 17:755-773.
- Gilliland, S.E.** (1987) Importance of bile tolerance in lactobacilli used as dietary adjunct. Dans: *Biotechnology in the Feed Industry*, T.P Lyons (ed), Alltech Feed Co., Lexington, KY, pp. 149-155.
- Gilliland, S.E.** (1990) Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 7:175-188.
- Gilliland, S.E., Staley, T.E., Bush, L.J.** (1984) Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* 67:3045-3051.
- Giroux, H.J., De Grandpré, G., Fustier, P., Champagne, C.P., St-Gelais, D., Lacroix, M., Britten, M.** (2013) Production and characterization of Cheddar-type cheese enriched with green tea extract. *Dairy Sci. Technol.* 93:241-254.

- Goldin, B.R.** (1998) Health benefits of probiotics. *Br. J. Nutr.* 80:S203-207.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X.** (1999) *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 10:139–157.
- González, R.E., Salazar, J.A., Pérez, J.A.** (2013) Obtaining size-controlled microcapsules by ionic gelation with high and low acyl gellans containing *Lactococcus lactis*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 15:70-80.
- Graham, H.N.** (1992) Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev. Med.* 21:334-350.
- Grimoud, J., Durand, H., Courtin, C., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V., Roques, C.** (2010) In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe* 16:493-500.
- Guérin, D., Vuilleumard, J.C., Subirade, M.** (2003) Protection of bifidobacteria encapsulated in polysaccharide-protein gel beads against gastric juice and bile. *J. Food Prot.* 66:2076-2084.
- Guerzoni, M.E., Lanciotti, R., Cocconcelli, P.S.** (2001) Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology*, 147:2255-2264.
- Guidotti, G.** (1972) Membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 41:731-752.
- Gyawali, R., Ibrahim, S.A.** (2012) Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95:29-45.
- Halliwell, B., Gutteridge, M.C.** (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219:1–14.
- Hamilton-Miller, J.M.T.** (1995) Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:2375-2377.
- Hara, H., Orita, N., Hatano, S., Ichikawa, H., Hara, Y., Matsumoto, N., Kimura, Y., Terada, A., Mitsuoka, T.** (1995) Effect of tea polyphenols on fecal flora and fecal metabolic products of pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 57:45–49.
- Hara, Y.** (2001) Green tea: Health benefits and applications. CRC Press, 280 pages.
- Hart, A.L., Lammers, K., Brigidi, P., Vitali, B., Rizzello, F., Gionchetti, P., Campieri, M., Kamm, M.A., Knight, S.C., Stagg, A.J.** (2004) Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 53:1602–1609.
- Hasselwander, O.** (2008) Pectin – Health benefits as a dietary fiber and beyond. Dans: *Gums and stabilisers for the food industry*, P.A.Williams, G.O. Phyllips (eds). RSC Publishing, Cambridge, pp. 358–366.
- Hayashi, N., Ujihara, T., Kohata, K.** (2005) Reduction of catechin astringency by the complexation of gallate-type catechins with pectin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:1306-1310.
- He, F., Morita, H., Ouwehand, A.C., Hosoda, M., Hiramatsu, M., Kurisaki, J.-I., Isolauri, E., Benno, Y., Salminen, S.** (2002) Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by *Bifidobacterium* strains. *Microbiol. Immunol.* 46:781–785.
- Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G., Naumann, D.** (1991) Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J. Gen. Microbiol.* 137:69-79.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravikumar, R., Carvalho, I.S.** (2013) Mechanism of action of probiotics. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56:113-119.

- Herigstad, B., Hamilton, M., Heersink, J.** (2001) How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 44:121-129.
- Hoesli, C.A., Raghuram, K., Kiang, R.L.J., Mocinecová, D., Hu, X., Johnson, J.D., Lacík, I., Kieffer, T.J., Piret, J.M.** (2011) Pancreatic cell immobilization in alginate beads produced by emulsion and internal gelation. *Biotechnol. Bioeng.* 108:424-434.
- Hofmann, A.F., Molino, G., Milanese, M., Belforte, G.** (1983) Description and simulation of a physiological pharmacokinetic model for the metabolism and enterohepatic circulation of bile acids in man. Cholic acid in healthy man. *J. Clin. Invest.* 71:1003–1022.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis In't Veld, J.H.J.** (1998) Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41:85-101.
- Huang, C.B., Alimova, Y., Myers, T.M., Ebersole, J.L.** (2011) Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch. Oral Biol.* 56:650-654.
- Hull, R.R., Roberts, A.V., Mayes, J.J.** (1984) Survival of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt. *Austr. J. Dairy Technol.* 39:164-166.
- Hungate, R.E.** (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. Dans: *Methods in Microbiology*, Vol. 3 part B, J.R. Norris, D.W. Ribbons (eds.), Academic Press, London: pp.117-132.
- Iftime, A., Popescu, A., Ganea, C.** (2010) Effects of epigallocatechin gallate on artificial lipid membranes. *Romanian J. Biophys.* 20:323-334.
- In't Veld, G., Driessen, A.J.M., Konings, W.N.** (1992) Effect of the unsaturation of phospholipid acyl chains on leucine transport of *Lactococcus lactis* and membrane permeability. *Biochim. Biophys. Acta.* 1108:31–39.
- Ishihara, N., Chu, D.C., Akachi, S., Juneja, L.R.** (2001) Improvement of intestinal microflora balance and prevention of digestive and respiratory organ diseases in calves by green tea extracts. *Livestock Prod. Sci.* 68:217–229.
- Ishimwe, N., Daliri, E.B., Lee, B.H., Fang, F., Du, G.** (2015) The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics. *Mol. Nutr. Food Res.* 59:94-105.
- ISO 14502-1** (2005) Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: Content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent.
- Ito, Y., Ichikawa, T., Iwai, T., Saegusa, Y., Ikezawa, T., Goso, Y., Ishihara, K.** (2008) Effects of tea catechins on the gastrointestinal mucosa in rats. *J. Agric. Food Chem.* 56:12122-12126.
- Jandu, N., Zeng, Z.J., Johnson-Henry, K.C., Sherman, P.M.** (2009) Probiotics prevent enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7-mediated inhibition of interferon- γ -induced tyrosine phosphorylation of STAT-1. *Microbiology* 155:531–540.
- Jasson, S.E.A., Edsman, C.J., Geede, U.W., Hedenqvist, M.S.** (2001) Packaging materials for fermented milk: Effect of material crystallinity and polarity on food quality. *Pack. Technol. Sci.* 18:119-127.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A.** (2005) *Modern Food Microbiology*, Springer, New York, 790 pages.
- Jayamanne, V.S., Adams, M.R.** (2009) Modeling the effects of pH, storage temperature and redox potential (*Eh*) on the survival of bifidobacteria in fermented milk. *Int. J. Food Sci. Tech.* 44:1131-1138.

- Jaziri, I., Slama, M.B., Mhadhbi, H., Urdaci, M.C., Hamdi, M.** (2009) Effect of green and black teas (*Camellia sinensis* L.) on the characteristic microflora of yogurt during fermentation and refrigerate storage. *Food Chem.* 112:614-620.
- Jenkins, D.J., Gassull, M.A., Leeds, A.R., Metz, G., Dilawari, J.B., Slavin, B., Blendis, L.M.** (1977) Effect of dietary fiber on complications of gastric surgery: prevention of postprandial hypoglycemia by pectin. *Gastroenterology* 73:215–217.
- Jiang, T., Mustapha, A., Savaiano, D.A.** (1996) Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sci.* 79:750-757.
- Jijon, H., Backer, J., Diaz, H., Yeung, H., Thiel, D., McKaigney, C., De Simone, C., Madsen, K.** (2004) DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 126:1358–1373.
- Jin, J.S., Touyama, M., Hisada, T., Benno, Y.** (2012) Effects of green tea consumption on human fecal microbiota with special reference to *Bifidobacterium* species. *Microbiol. Immunol.* 56:729–739.
- Johnson-Henry, K.C., Hagen, K.E., Gordonpour, M., Tompkins, T.A., Sherman, P.M.** (2007) Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 9:356-367.
- Johnsson, T., Nikkila, P., Toivonen, L., Rosenqvist, H., Laakso, S.** (1995) Cellular fatty acid profiles of *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains in relation to the oleic acid content of the cultivation medium. *Appl Environ Microbiol* 61:4497–4499.
- Jovanovic, S.V., Hara, Y., Steenken, S., Simic, M.G.** (1997) Antioxidant potential of theaflavins. A pulse radiolysis study. *J. Am. Chem. Soc.* 119:5337–5343.
- Jovanovic, S. V., Steenken, S., Hara, Y., Simic, M.G.** (1996) Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2:*2497–2503.
- Kailasapathy, K.** (2008) Encapsulation and controlled release of folic acid. Dans: Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals. N. Garti (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 331-343.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T., Arvilommi, H., Isolauri, E.** (2003). Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361:1869-1871.
- Kajiya, K., Kumazawa, S., Naito, A., Nakayama, T.** (2008) Solid-state NMR analysis of the orientation and dynamics of epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, incorporated into lipid bilayers. *Magn. Reson. Chem.* 46:174-177.
- Kajiya, K., Kumazawa, S., Nakayama, T.** (2001) Steric effects on interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:2638–2643.
- Kajiya, K., Kumazawa, S., Nakayama, T.** (2002) Effects of external factors on the interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:2330-2335.
- Kamnev, A.A.** (2008) FTIR spectroscopic studies of bacterial cellular responses to environmental factors, plant-bacterial interactions and signalling. *Spectroscopy* 22:83-95.
- Kandell, R.L., Bernstein, C.** (1991) Bile salt/acid induction of DNA damage in bacterial and mammalian cells: implications for colon cancer. *Nutr. Cancer* 16:227–238.

- Kappus, H., Köster-Albrecht, D., Remmer, H.** (1979) 2- Hydroxyoestradiol and (+)-cyanidanol-3 prevent lipid peroxidation of isolated rat hepatocytes. *Arch. Toxicol. Suppl.* 2:321-326.
- Kim, S.-J., Cho, S.Y., Kim, S.H., Song, O.-J., Shin, I.-S., Cha, D.S., Park, H.J.** (2008) Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121, *LWT* 41: 493–500.
- Kim, Y.-W., Chun, H.J., Kim, I.-W., Liu, H.-B., Ahn, W.S.** (2013) Antimicrobial and antifungal effects of green tea extracts against microorganisms causing vaginitis. *Food Sci. Biotechnol.* 22:713-719.
- Klaver, F.A.M., Kingma, F., Weerkamp, A.H.** (1993) Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Neth. Milk Dairy J.* 47:151–164.
- Korbekandi, H., Mortazavian, A.M., Irvani, S.** (2011) Technology and stability of probiotic in fermented milks. Dans: Probiotic and prebiotic foods: Technology, stability and benefits to the human health, N., Shah, N., A.G. Cruz, J.A.F Faria (eds.) Nova Science Publishers, New York, pp. 131-169.
- Kosaraju, S.L.** (2005) Colon targeted delivery systems: Review of polysaccharides for encapsulation and delivery. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:251-258.
- Kottol, K., Sudha, P., Reni, A.** (2014) Studies on growth effects of catechin on probiotic bacteria. *Engineering* 3:1-3 ISSN: 2277-8179.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H.** (2004) The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 14:737-743.
- Kumazawa, S., Kajiya, K., Naito, A., Saitô, H., Tuzi, S., Tanio, M., Suzuki, M., Nanjo, F., Suzuki, E., Nakayama, T.** (2004) Direct evidence of interaction of a green tea polyphenol, epigallocatechin gallate, with lipid bilayers by solid-state nuclear magnetic resonance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68:1743–1747.
- Kuzuhara, T., Suganuma, M., Fujiki, H.** (2008) Green tea catechin as a chemical chaperone in cancer prevention. *Cancer Lett.* 261:12-20.
- Laparra, J.M., Sanz, Y.** (2010) Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol. Res.* 61:219–225.
- Larisch, B.C., Poncelet, D., Champagne, C.P., Neufeld, R.J.** (1994) Microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *J. Microencapsul.* 11:189-195.
- Lee, H.C., Jenner, A.M., Low, C.H., Lee, Y.K.** (2006) Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res. Microbiol.* 157:876-884.
- Lee, J.-S., Chung, D., Lee, H.G.** (2008) Preparation and characterization of calcium pectinate gel beads entrapping catechin-loaded liposomes. *Int. J. Biol. Macromol.* 42:178-184.
- Lee, J.-S., Kim, E.-J., Chung, D., Lee, H.G.** (2009) Characteristics and antioxidant activity of catechin-loaded calcium pectinate gel beads prepared by internal gelation. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 74:17-22.
- Lee, K.Y., Heo, T.R.** (2000) Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:869–873.
- Lee, Y.K., Puong, K.Y., Ouwehand, A.C., Salminen, S.** (2003) Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J. Med. Microbiol.* 52:925-930.

- Lee Y.K., Salminen S.** (1995) The coming age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 6:241-245.
- Lee, Y.K., Salminen, S.** (2009) Handbook of probiotics and prebiotics, Y.K. Lee, S. Salminen (eds), John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, p. 596.
- Lefèvre, T., Subirade, M.** (2000) Interaction of β -lactoglobulin with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy. *Int. J. Biol. Macromol.* 28:59-67.
- Lefèvre, T., Subirade, M.** (2001) Conformational rearrangement of β -lactoglobulin upon interaction with an anionic membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1549:37-50.
- Lencki, R.W.J., Neufeld, R.J., Spinney, T.** (1989) Method of producing microspheres. U.S. patent 4.822.534.
- Lesmes, U., McClements, D.J.** (2009) Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.* 20:448-457.
- Lewis, T., Nichols, P.D., McMeekin, T.A.** (2000) Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. *J. Microbiol. Meth.* 43:107-116.
- Lewis, R.N.A.H., McElhaney, R.N.** (1996) FTIR spectroscopy in the study of hydrated lipids and lipid bilayer membranes, Dans: *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, H.H. Mantsch, D. Chapman (eds) Wiley, New York, pp. 159–202.
- Lewis, R.N.A.H., McElhaney, R.N.** (1998) The structure and organization of phospholipid bilayers as revealed by infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids.* 96:9-21.
- Ley, R.E., Lozupone, C.A., Hamady, M., Knight, R., Gordon, J.I.** (2008) Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:776–788.
- Li, X.Y., Chen, X.G., Cha, D.S., Park, H.J., Liu, C.S.** (2009) Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate-gelatin and its properties, *J. Microencapsul.* 26:315–324.
- Liao, S., Kao, Y.-H., Hiipakka, R.A.** (2001) Green tea: Biochemical and biological basis for health benefits. *Vitam. Horm.* 62:1-94.
- Lin, M., Al-Holy, M., Al-Qadiri, H., Kang, D.-H., Cavinato, A.G., Huang, Y., Rasco, B.A.** (2004) Discrimination of intact and injured *Listeria monocytogenes* by Fourier transform infrared spectroscopy and principal component analysis. *J. Agric. Food Chem.* 52:5769-5772.
- Lin, M.-Y., Yen, C.L.** (1999) Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 47:1460-1466.
- Lin, M.-Y., Chang, F.-J.** (2000) Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Dig. Dis. Sci.* 45:1617-1622.
- Liu, L., Fishman, M.L., Kost, J., Hicks, K.B.** (2003) Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials.* 24:3333-3343.
- Liu, Q., Rauth, A.M., Wu, X.Y.** (2007) Immobilization and bioactivity of glucose oxidase in hydrogel microspheres formulated by an emulsification-internal gelation-adsorption-polyelectrolyte coating method. *Int. J. Pharm.* 339: 148-156.
- Liu, X.D., Yu, W.Y., Zhang, Y., Xue, W.M., Yu, W.T., Xiong, Y., Ma, X.J., Chen, Y., Yuan, Q.** (2002) Characterization of structure and diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources. *J. Microencapsul.* 19:775-782.
- Liu, X., Ma, Z., Xing, J., Liu, H.** (2004) Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres. *J. Magn. Mater.* 270:1–6.

- LoCascio, R.G., Mills, D.A., Waterhouse, A.L.** (2006) Reduction of catechin, rutin, and quercetin levels by interaction with food-related microorganisms in a resting state. *J. Sci. Food Agr.* 86:2105-2112.
- López de Felipe, F., Curiel, J.A., Muñoz, R.** (2010) Improvement of the fermentation performance of *Lactobacillus plantarum* by the flavanol catechin is uncoupled from its degradation. *J. Appl. Microbiol.* 109:687-697.
- Louis, P., Duncan, S.H., McCrae, S.I., Millar, J., Jackson, M.S., Flint, H.J.** (2004) Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *J. Bacteriol.* 186:2099-2106.
- Lushchak, V.I.** (2001) Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochemistry (Mosc.)* 66:476-489.
- MacIntyre, A., Cymet, T.C.** (2005) Probiotics: the benefits of bacterial cultures. *Compr. Ther.* 31:181-185.
- Mandel, S.A., Weinreb, O., Amit, T., Youdim, M.B.H.** (2012) The importance of multiple target action of green tea polyphenols for neuroprotection. *Front. Biosci.* S4:581-598.
- Manojlović, V., Nedović, V.A., Kailasapathy, K., Zuidam, N.J.** (2010) Encapsulation of probiotics for use in food products. Dans: Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. N.J Zuidam, V.A. Nedović (eds). Springer, New York, pp. 269-302.
- Mantsch, H.H., McElhaney, R.N.** (1991) Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* 57:213-226.
- Marteau, P.** (2006) Factors controlling the bacterial microflora. Definitions and mechanisms of action of probiotics and prebiotics. Dans: Gut microflora: Digestive physiology and pathology, J.-C. Rambaud, J.P. Buts (eds), John Libbey Eurotext, Montrouge, pp.37-56.
- Marteau, P., Pochart, P., Bouhnik, Y., Rambaud, J.C.** (1993) Fate and effects of some transiting microorganisms in the human gastrointestinal tract. *World Rev. Nutr. Diet.* 74: 1-21.
- Martini, M.C., Bollweg, G.L., Levitt, M.D., Savaiano, D.A.** (1987) Lactose digestion by yogurt betagalactosidase: Influence of pH and microbial cell integrity. *Am. J. Clin. Nutr.* 45:432-436.
- Marty-Teyssset, C., De La Torre, F., Garel, J.-R.** (2000) Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* upon aeration: Involvement of an NADH oxidase in oxidative stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:262-267.
- Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P.M., Crittenden, R., Mogensen, G., Fonden, R., Saarela, M.** (2002) Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.* 12:173-182.
- Maxwell, E.G., Belshaw, N.J., Waldron, K.W., Morris, V.J.** (2012). Pectin-an emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends Food Sci. Technol.* 24:64-73.
- McCarthy, J., O'Mahony, L., O'Callaghan, L., Sheil, B., Vaughan, E.E., Fitzsimons, N., Fitzgibbon, J., O'Sullivan, G.C., Kiely, B., Collins, J.K., Shanahan, F.** (2003) Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut* 52:975-980.

- McMaster, L.D., Kokott, S.A., Slatter, P.** (2005) Micro-encapsulation of *Bifidobacterium lactis* for incorporation into soft foods. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21:723-728.
- Meiners, J.-A.** (2009) Micro-encapsulation of probiotics. Dans: *Prebiotics and probiotics. Science and Technology*, D. Charalampopoulos, R.A. Rastall, (eds), Springer, NewYork pp.805-823.
- Melin, A.-M., Perromat, A., Deleris, G.** (2001) Effect of radical attack on bacteria: An application of FT-IR spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 55:23-28.
- Mendoza-Wilson, A.M., Glossman-Mitnik, D.** (2006) Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+) - catechin and (-)- epicatechin related to their antioxidant ability. *J. Mol. Struct. TEOCHEM.* 761:97-106.
- Messaoudi, M., Violle, N., Bisson, J.-F., Desor, D., Javelot, H., Rougeot, C.** (2011) Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes* 2:256-261.
- Mills, S., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P.** (2011) Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again. *Microb. Cell Factories* 10:S19.
- Mohammadi, R., Mortazavian, A. M., Khosrokhavar, R., Cruz, A.G.** (2011). Probiotic ice cream: Viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Ann. Microbiol.* 61: 411–424.
- Mohan, H., Maheswari, K.U., Bera, A.K., Suraishkumar, G.K.** (2010) Reactive oxygen species mediated modifications in *Bacillus subtilis* lipid membrane to improve protein productivities. *Process Biochem.* 45:467-474.
- Mortazavian, A.M., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M., Reinheimer, J.A., Emamdjomeh, Z., Sohrabvandi, S., Rezaei, K.** (2006) Preliminary investigation of the combined effect of heat treatment and incubation temperature on the viability of the probiotic micro-organisms in freshly made yogurt. *Int. J. Dairy Technol.* 59:8-11.
- Mortazavian, A.M., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M., Rezaei, K., Sohrabvandi, S., Reinheimer, J.A.** (2007) Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in yogurt. *Int. J. Dairy Technol.* 60:123-127.
- Mortazavian, A.M., Khosrokhvar, R., Rastegar, H., Mortazaei, G.R.** (2010). Effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of freshly made probiotic Doogh (Iranian fermented milk drink). *Ital. J. Food Sci.* 22:98–102.
- Mortazavian, A.M., Mohammadi, R., Sohrabvandi, S.** (2012) Delivery of probiotic microorganisms into gastrointestinal tract by food products. Chap. 6 Dans: *New advances in the basic and clinical gastroenterology*, T. Brzozowski (ed.), In Tech, pp: 121-146.
- Mostertz, J., Hecker, M.** (2003) Patterns of protein carbonylation following oxidative stress in wild-type and sigB *Bacillus subtilis* cells. *Mol. Genet. Genomics*, 269:640–648.
- Mukhtar, H., Ahmad, N.** (2000) Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 1698S–1702S.
- Muthukumarasamy, P., Allan-Wojtas, P., Holley, R.A.** (2006) Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *J. Food Sci.* 71: M20-M24.
- Nadal, I., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., Sanz, Y.** (2007) Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J. Med. Microbiol.* 56:1669–1674.

- Najgebauer-Lejko, D.** (2014) Effect of green tea supplementation on the microbiological, antioxidant, and sensory properties of probiotic milks. *Dairy Sci. Technol.* 94:327-339.
- Najgebauer-Lejko, D., Żmudziński, D., Ptaszek, A., Socha, R.** (2014) Textural properties of yogurts with green tea and Pu-erh tea additive. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49:1149-1158.
- Nakayama, M., Shimatani, K., Ozawa, T., Shigemune, N., Tsugukuni, T., Tomiyama, D., Kurahachi, M., Nonaka, A., Miyamoto, T.** (2013) A study of the antibacterial mechanism of catechins: Isolation and identification of *Escherichia coli* cell surface proteins that interact with epigallocatechin gallate. *Food Control* 33:433-439.
- Nance, C.L., Shearer, W.T.** (2003) Is green tea good for HIV-1 infection? *J. Allergy Clin. Immunol.* 112:851-853.
- Naumann, D.** (2000) Infrared spectroscopy in microbiology. Dans: *Encyclopedia of analytical chemistry*, R.A. Meyers (ed.). John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp. 102-131.
- Nawar, W.W.** (1985) Lipids. Dans: *Food chemistry*. O.R. Fenema (ed) Marcel Dekker, New York, pp.140-244.
- Naser, S.M., Hagen, K.E., Vancanneyt, M., Cleenwerck, I., Swings, J., Tompkins, T.A.** (2006) *Lactobacillus suntoryeus* Cachat and Priest 2005 is a later synonym of *Lactobacillus helveticus* (Orla-Jensen 1919) Bergey *et al.* 1925 (Approved Lists 1980). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:355-360.
- Neeser, J.R., Chambaz, A., Golliard, M., Link-Amster, H., Fryder, V., Kolodziejczyk, E.** (1989) Adhesion of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains to human enterocytelike differentiated HT-29 cells: a basis for host-pathogen interactions in the gut. *Infect. Immun.* 57:3727-3734.
- Neish, A.S.** (2009) Reviews in basic and clinical gastroenterology. *Gastroenterology.* 136:65-80.
- Nikki, E.** (1991) Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 54:1119S-1124S.
- Oakenfull, D.G.** (1991). The chemistry of high-methoxyl pectins. Dans: *The chemistry and technology of pectin*, R.H. Walter (ed.), Academic Press, New York, pp. 87-108.
- Oberg, T.S., Steele, J.L., Ingham, S.C., Smeianov, V.V., Briczinski, E.P., Abdalla, A., Broadbent, J.R.** (2011) Intrinsic and inducible resistance to hydrogen peroxide in *Bifidobacterium* species. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38:1947-1953.
- Odakami, T., Xiao, J.Z., Yonezawa, S., Yaeshima, T., Iwatsuki, K.** (2011) Improved viability of bifidobacteria in fermented milk by cocultivation with *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*. *J. Dairy Sci.* 94:1112-1121.
- Oelschlaeger, T.A.** (2010) Mechanisms of probiotic actions- A review. *Int. J. Med. Microbiol.* 300:57-62.
- Ogończyk, D., Siek, M., Garstecki, P.** (2011) Microfluidic formulation of pectin microbeads for encapsulation and controlled release of nanoparticles. *Biomicrofluidics* 5, 013405.
- O'hara, A.M., Shanahan, F.** (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports* 7:688-693.
- Ohashi, Y., Ushida, K.** (2009) Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Anim. Sci. J.* 80:361-371.

- Okubo, T, Ishihara, N, Oura, A, Serit, M, Kim, M, Yamamoto, T, Mitsuoka, T.** (1992) *In vivo* effects of tea polyphenol intake on human intestinal microflora and metabolism. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:588–591.
- Olejniak, A., Lewandowska, M., Obarska, M., Grajek, W.** (2005) Tolerance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains to low pH, bile salts and digestive enzymes, *EJPAU* 8(1), #05. Disponible en ligne:<http://www.ejpau.media.pl/volume8/issue1/art-05.htm>, site consulté le 16-05-2011.
- Olivares, M., Díaz-Ropero, M.P., Gómez, N., Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Maldonado, J.A., Martín, R., López-Huertas, E., Rodríguez, J.M., Xaus, J.** (2006) Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, enhances the intestinal function of healthy adults. *Int. J. Food Microbiol.* 107:104-111.
- Oteiza, P.I., Erlejman, A.G., Verstraeten, S.V., Keen, C.L., Fraga, C.G.** (2005) Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clin. Dev. Immunol.* 12:19–25.
- O'Toole, P.W., Claesson, M.J.** (2010) Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *Int. Dairy J.* 20:281-291.
- Parkar, S.G., Stevenson, D.E., Skinner, M.A.** (2008) The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *Int. J. Food Microbiol.* 124:295-298.
- Partanen, L., Marttinen, N., Alatossava, T.** (2001) Fats and fatty acids as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii*. *Syst. Appl. Microbiol.* 24:500–506.
- Payne, A.N., Chassard, C., Zimmermann, M., Müller, P., Stinca, S., Lacroix, C.** (2011) The metabolic activity of gut microbiota in obese children is increased compared with normal-weight children and exhibits more exhaustive substrate utilization, *Nutr. Diabetes*, vol. 1, p. e12.
- Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., Matuchansky, C.** (2005) Review article: Bifidobacteria as probiotic agents-physiological effects and clinical benefits. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22:495-512.
- Picot, A., Lacroix, C.** (2004) Encapsulation of *Bifidobacteria* in whey protein-based microcapsules and survival in stimulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. Dairy J.* 14:505–515.
- Plank, D.W., Szpylka, J., Sapirstein, H., Woollard, D., Zapf, C.M. et al.** (2012) Determination of antioxidant activity in foods and beverages by reaction with 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH): Collaborative study First action 2012.04. *J. AOAC Int.* 95: 1562-1569.
- Podleśny, M., Jarocki, P., Komoń, E., Glibowska, A., Targoński, Z.** (2011) LC-MS/MS analysis of surface layer proteins as a useful method for the identification of Lactobacilli from *Lactobacillus acidophilus* group. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21:421-429.
- Poncelet, D.** (2001) Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. *Ann. N Y Acad. Sci.* 944:74–82.
- Poncelet, D., Lencki, R., Beaulieu, C., Halle, J.P., Neufeld, R.J., Fournier, A.** (1992) Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:39–45.
- Poncelet, D., Poncelet De Smet, B., Beaulieu, C., Huguet, M.L., Fournier, A., Neufeld, R.J.** (1995) Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. II. Physicochemistry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:644-650.

- Popova, A.V., Hinch, D.K.** (2003) Intermolecular interactions in dry and rehydrated pure and mixed bilayers of phosphatidylcholine and digalactosyldiacylglycerol: a Fourier-transform infrared spectroscopy study. *Biophys. J.* 85:1682–1690.
- Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B.** (2009) Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel.* 4:25-39.
- Porter, N.A., Caldwell, S.E., Mills, K.A.** (1995) Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30:277–290.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.** (2003) La cellule procaryote: structures et fonctions. Dans: *Microbiologie.* L. Prescott, J. Harley, D. Klein (eds), Édition de Boeck, Bruxelles, pp.41-73.
- Presser, K.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T.** (1997) Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2355–2360.
- Quigley, E.M.** (2010) Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacol. Res.* 61:213-218.
- Quong, D., Neufeld, R.J.** (1998) DNA Protection from extracapsular nucleases, within chitosan- or poly-L-lysine-coated alginate beads. *Biotechnol. Bioeng.* 60:124–134.
- Quong, D., Yeo, J.-N., Neufeld, R.J.** (1999) Stability of chitosan and poly-L-lysine membranes coating DNA-alginate beads when exposed to hydrolytic enzymes. *J. Microencapsul.* 16:73–82.
- Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., Raz, E.** (2004) Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology.* 126:520–528.
- Radji, M., Agustama, R.A., Elya, B., Tjampakasari, C.R.** (2013) Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3:663-667.
- Rastall, R.A., Gibson, G.R., Gill, H.S., Guarner, F., Klaenhammer, T.R., Pot, B., Reid, G., Rowland, I.R., Sanders, M.E.** (2005) Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microb. Ecol.* 52:145-152.
- Ratledge, C., Wilkinson, S.G.** (1988) Fatty acids, related and derived lipids. Dans: *Microbial lipids.* Vol. 1, C. Ratledge, S.G. Wilkinson (eds), Academic Press, London, pp.23-52.
- Ray, B.** (2004) Factors influencing microbial growth in food. Dans: *Fundamental of food microbiology,* CRC Press, Boca Raton, pp. 67-80.
- Renard, C.M.G.C., Baron, A., Guyot, S., Drilleau, J.-F.** (2001) Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *Int. J. Biol. Macromol.* 29:115-125.
- Renard, D., Reddy, T.** (2007) Polymères d'origine biologique pour la microencapsulation. Dans: *Microencapsulation.* T. Vandamme, D. Poncet, P. Subra-Paternault (eds.), Lavoisier, Paris, pp. 175-188.
- Riaz, Q.U.A., Masud, T.** (2013) Recent trends and applications of encapsulating materials for probiotic stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53:231-244.

- Ribeiro, A.J., Silva, C., Ferreira, D., Veiga, F.** (2005) Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* 25:31-40.
- Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., Ouwehand, A.C.** (2003) Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization? *Vet. Microbiol.* 92:111-119.
- Rivera-Espinoza, Y., Gallardo-Navarro, Y.** (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiol.* 27:1-11.
- Roberfroid, M.** (1993) Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33:103–148.
- Rochat, T., Gratadoux, J.-J., Corthier, G., Coqueran, B., Nader-Macias, M.-E., Gruss, A., Langella, P.** (2005) *Lactococcus lactis* SpOx spontaneous mutants: a family of oxidative-stress-resistant dairy strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2782-2788.
- Rodes, L., Saha, S., Tomaro-Duchesneau, C., Prakash, S.** (2014) Microencapsulated *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 favorably modulates gut microbiota and reduces circulating endotoxins in F344 rats. *Biomed. Res. Int.* ID 602832.
- Rodríguez-Vaquero, M.J., Alberto, M.R., Manca de Nadra, M.C.** (2007) Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control.* 18:93-101.
- Roller, M., Femia, A.P., Caderni, G., Rechkemmer, G., Watzl, B.** (2004) Intestinal immunity of rats with colon cancer is modulated by oligofructose-enriched inulin combined with *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*. *Br. J. Nutr.* 92:931-938.
- Rozès, N., Peres, C.** (1998) Effects of phenolic compounds on the growth and the fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:108–111.
- Rozoy, E., Araya-Farias, M., Simard, S., Kitts, D., Lessard, J., Bazinet, L.** (2013a) Redox properties of catechins and enriched tea extracts effectively preserve L-5-methyltetrahydrofolate: Assesment using cyclic voltammetry analysis. *Food Chem.* 138:1982–1991.
- Rozoy, E., Bazinet, L., Araya-Farias, M., Guernec, A., Saucier, L.** (2013b) Inhibitory effects of commercial and enriched green tea extracts on the growth of *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *J. Food Res.* 2:1-7.
- Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A., Sánchez, B.** (2011) How do bifidobacteria counteract environmental challenges? Mechanisms involved and physiological consequences. *Genes Nutr.* 6:307-318.
- Russell, N.J.** (1989) Functions of lipids: structural roles and membrane functions. Dans: *Microbial Lipids*, vol. 2, C. Ratledge, S.C. Wilkinson (eds.), Academic Press, London, pp. 279– 365.
- Russel, N.J., Evans, R.I., ter Steeg, P.F., Hellemons, J., Verheul, A., Abee, T.** (1995) Membranes as a target for stress adaptation. *Int. J. Food Microbiol.* 28:255-261.
- Sadowska, B., Walencka, E., Więckowska-Szakiel, M., Różalska, B.** (2010) Bacteria competing with the adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol.* 55:497-501.
- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., Castelli, F.** (1995). Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biol. Med.* 19:481-486.

- Sakamoto, M., Komagata, K.** (1996) Aerobic growth of and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria. *J. Ferment. Bioeng.* 82:210-216.
- Salah, N., Miller, N.J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G.P., Rice-Evans, C.** (1995) Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 322:339-346.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., et al.** (1998) Demonstration of safety of probiotics- a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44:93-106.
- Sanders, M.E., Huis in't Veld, J.** (1999). Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Anton. van Leeuw.* 76:293-315.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H.S., Alvarez-Ramírez, J., Vernon-Carter, E.J.** (2010) Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt, *Food Res. Int.* 43:111-117.
- Sankar, S.A., Lagier, J.-C., Pontarotti, P., Raoult, D., Fournier, P.-E.** (2015) The human gut microbiome, a taxonomic conundrum. *Syst. Appl. Microbiol.* 38:276-286.
- Santacruz, A., Marcos, A., Wärnberg, J., Martí, A., Martín-Matillas, M., Campoy, C. et al.** (2009) Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity.* 17:1906-1915.
- Santivarangkna, C., Naumann, D., Kulozik, U., Foerst, P.** (2010) Protective effects of sorbitol during the vacuum drying of *Lactobacillus helveticus*: an FTIR study. *Ann. Microbiol.* 60:235-242.
- Scherber, C.M., Schottel, J.L., Aksan, A.** (2009) Membrane phase behavior of *Escherichia coli* during desiccation, rehydration, and growth recovery. *Biochim. Biophys. Acta* 1788:2427-2435.
- Senok, A.C., Ismael, A.Y., Botta, G.A.** (2005) Probiotics: facts and myths. *Clin. Microbiol. Infect.* 11:958-966.
- Serna-Cock, L., Vallejo-Castillo, V.** (2013) Probiotic encapsulation. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7:4743-4753.
- Serrazanetti, D.I., Guerzoni, M.E., Corsetti, A., Vogel, R.** (2009) Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiol.* 26:700-711.
- Shafiei, Y., Razavilar, V., Javadi, A., Mirzaei, H.** (2012) Survivability of free and microencapsulated *Lactobacillus plantarum* with alginate and resistant starch in simulated gastrointestinal conditions. *J. Food Agric. Environ.* 10:207-212.
- Shah, N. P.** (2000). Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.* 83:894-907.
- Shah, N.P., Ding, W.K., Fallourd, M.J., Leyer, G.** (2010) Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants. *J. Food Sci.* 75:M278-M282.
- Shahidi, F., Han, X.-Q.** (1993). Encapsulation of food ingredients. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33:501-547.
- Sharma, A., Gupta, S., Sarethy, I.P., Dang, S., Gabrani, R.** (2012) Green tea extract: Possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens. *Food Chem.* 135:672-675.
- Sharma, B.R., Naresh, L., Dhuldhoya, N.C., Merchant, S.U., Merchant, U.C.** (2006) An overview on pectins. *TFPJ.* June-July, pp.44-51.

- Shen, S.R., Yang, X.Q., Yang, F.J., Zhao, B.L., Qi, W.J.** (1993) Synergic antioxidant effect of tea catechins. *J. Tea Sci.* 13:141-146.
- Sherman, P.M., Johnson-Henry, K.C., Yeung, H.P., Ngo, P.S., Goulet, J., Tompkins, T.A.** (2005) Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect. Immun.* 73:5183–5188.
- Sheu, T.Y., Marshall, R.T., Heymann, H.** (1993) Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *J. Dairy Sci.* 76:1902-1907.
- Shi, L.-E., Li, Z.-H., Li, D.-T., Xu, M., Chen, H.-Y., Zhang, Z.-L., Tang, Z.-X.** (2013). Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate–milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *J. Food Eng.* 117:99-104.
- Shin, H. S., Lee, J.H., Pestka, J.J., Ustunol, Z.** (2000) Viability of bifidobacteria in commercial dairy products during refrigerated storage. *J. Food Prot.* 63:327–331.
- Shinde, T., Sun-Waterhouse, D., Brooks, J.** (2014) Co-extrusion encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* alone or together with apple skin polyphenols: An aqueous and value-added delivery system using alginate. *Food Bioprocess. Technol.* 7:1581-1596.
- Shukla, S., Jain, D., Verma, K., Verma, S.** (2011) Pectin-based colon-specific drug delivery. *Chron. Young Sci.* 2:83-89.
- Si, W., Gong, J., Tsao, R., Kalab, M., Yang, R.; Yin, Y.** (2006) Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *J. Chromatogr. A* 1125:204–210.
- Sigler, K., Chaloupka, J., Brozmanová, J., Stadler, N., Höfer, M.** (1999) Oxidative stress in microorganisms- I Microbial vs higher cells- Damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia Microbiol.* 44:587-624.
- Simpson, P.J., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P.** (2005) Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *J. Appl. Microbiol.* 99:493-501.
- Singer, S.J., Nicolson, G.L.** (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Sciences* 175:720-731.
- Sinha, V.R., Kumria, R.** (2001) Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *Int. J. Pharm.* 224:19-38.
- Siripatrawan, U., Harte, B.R.** (2010) Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food hydrocolloid* 24:770-775.
- Sirk, T.W., Brown, E.F., Sum, A.K., Friedman, M.** (2008) Molecular dynamics study on the biophysical interactions of seven green tea catechins with lipid bilayers of cell membranes. *J. Agric. Food Chem.* 56:7750-7758.
- Sirk, T.W., Brown, E.F., Friedman, M., Sum, A.K.** (2009) Molecular binding of catechins to biomembranes: Relationship to biological activity. *J. Agric. Food Chem.* 57:6720-6728.
- Siuta-Cruce, P., Goulet, J.** (2001) Improving probiotic survival rates. *Food Technol.* 55:36-42.

- Sivam, A.S., Sun-Waterhouse, D., Perera, C.O., Waterhouse, G.I.N.** (2013) Application of FT-IR and Raman spectroscopy for the study of biopolymers in breads fortified with fibre and polyphenols. *Food Res. Int.* 50: 574-585.
- Smith, J.** (1976) The Molecular Weight of Pectin, Ph. D. Thesis, University of Leeds, England.
- Smith, S.** (2014) *Lactobacillus* Rosell-52. www.probacti.de, site consulté le 07-04-2015.
- Song, H., Yu, W., Gao, M., Liu, X., Ma, X.** (2013) Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydr. Polym.* 96:181– 189.
- Spanhaak, S., Havenaar, R., Schaafsma, G.** (1998) The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52:899-907.
- Spiller, G.A., Chernoff, M.C., Hill, R.A., Gates, J.E., Nassar, J.J., Shipley, E.A.** (1980) Effect of purified cellulose, pectin and a low residue diet on fecal volatile fatty acids, transit time, and fecal weight in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 33:754–759.
- Spizzirri, U.G., Altimari, I., Puoci, F., Parisi, O.I., Iemma, F., Picci, N.** (2011) Innovative antioxidant thermo-responsive hydrogels by radical grafting of catechin on inulin chain. *Carbohydr. Polym.* 84:517-523.
- Spizzirri, U.G., Iemma, F., Puoci, F., Cirillo, G., Curcio, M., Parisi, O.I., Picci, N.** (2009) Synthesis of antioxidant polymers by grafting of gallic acid and catechin on gelatin. *Biomacromolecules*, 10:1923-1930.
- Spizzirri, U.G., Parisi, O.I., Iemma, F., Cirillo, G., Puoci, F., Curcio, M., Picci, N.** (2010) Antioxidant-polysaccharide conjugates for food application by eco-friendly grafting procedure. *Carbohydr. Polym.* 79:333-340.
- Sriamornsak, P.** (1998) Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads. *Int. J. Pharm.* 169:213-220.
- Sriamornsak, P.** (2001) The role in health. *J. Silpak. Univ.* 21-22:60-77.
- Sriamornsak, P.** (2003) Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review. *SUIJ* 3:206–228.
- Sriamornsak, P.** (2011) Application of pectin in oral drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 8(8):1009- 1023.
- Storz, G., Tartaglia, A., Farr, S.B., Ames, B.N.** (1990) Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends Genet.* 6:363-368.
- Su, P., Henriksson, A., Nilsson, C., Mitchell, H.** (2008) Synergistic effect of green tea extract and probiotics on the pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Sreptococcus pyogenes*. *World J. Microb. Biotechnol.* 24:1837-1842.
- Sun, Y., Hung, W.-C., Chen, F.-Y., Lee, C.-C., Huang, H.W.** (2009) Interaction of tea catechin (-)-epigallocatechin gallate with lipid bilayers. *Biophys. J.* 96:1026–1035.
- Sun-Waterhouse, D.** (2011) The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46:899-920.
- Talwalkar, A., Kailasapathy, K.** (2003a). Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. *J. Dairy Sci.* 86:2537-2546.
- Talwalkar, A., Kailasapathy, K.** (2003b). Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *Aust. J. Dairy Technol.* 58:36-39.
- Talwalkar, A., Kailasapathy, K.** (2004a) The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 5:1–8.

- Talwalkar, T., Kailasapathy, A.** (2004b) A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: Influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*. 3:117-124.
- Talwalkar, A., Miller, C.W., Kailasapathy, K., Nguyen, M.H.** (2004). Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *Int. J. Food Sci. Technol.* 39:605-611.
- Tamime, A.Y., Saarela, M., Sondergaard, A.K., Mistry, V.V., Shah, N.P.** (2005) Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. Dans: *Probiotic Dairy Products*, A.Y. Tamime (ed), Blackwell Publishing Ltd, Uk, pp.39-72.
- Taylor, P.W., Hamilton-Miller, J.M.T., Stapleton, P.D.** (2005) Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Sci. Technol. Bull.* 2:71-81.
- Terao, J., Piskula, M., Yao, Q.** (1994) Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.* 308:278-284.
- Thakur, B.R., Singh, R.K., Handa, A.K.** (1997) Chemistry and uses of pectin-A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37:47-73.
- Theobald, S., Pfeiffer, P., Zuber, U., König, H.** (2008) Influence of epigallocatechin gallate and phenolic compounds from green tea on the growth of *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 104:566-572.
- Toedter Williams, N.** (2010) Probiotics. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 67:449-458.
- Tompkins, T.A., Barreau, G., Broadbent, J.R.** (2012) Complete genome sequence of *Lactobacillus helveticus* R0052, a commercial probiotic strain. *J. Bacteriol.* 194:6349.
- Tsuchiya, H.** (2001) Stereospecificity in membrane effects of catechins. *Chem.-Biol. Interact.* 134:41-54.
- Tsuchiya, H., Tanaka, T., Nagayama, M.** (2008) Antiproliferative effects associated with membrane lipid interaction of green tea catechins. *J. Health Sci.* 54:576-580.
- Uekusa, Y., Kamihira, M., Nakayama, T.** (2007) Dynamic behavior of tea catechins interacting with lipid membranes as determined by NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 55:9986-9992.
- Urias-Orona, V., Huerta-Oros, J., Carvajal-Millán, E., Lizardi-Mendoza, J., Rascón-Chu, A., Gardea, A.A.** (2010) Component analysis and free radicals scavenging activity of *Cicer arietinum* L. husk pectin. *Molecules* 15:6948-6955.
- USP.** (2007) US Pharmacopeia test solutions. www.USP.org, site consulté le 05-04-2013.
- Van de Gutche, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D., Maguin, E.** (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82:187-216.
- Vanderhoof, J.A., Young, R.J.** (2004) Current and potential uses of probiotics. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 93:S33-S37.
- Vanderhoof, J.A., Young, R.** (2008) Probiotics in the United States. *Clin Infect Dis.* 46:S67-S72.
- Vasiljevic, T., Shah, N.P.** (2008) Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy J.* 18:714-728.
- Vernhet, A., Pellerin, P., Prieur, C., Osmianski, J., Moutounet, M.** (1996) Charge properties of some grape and wine polysaccharide and polyphenolic fractions. *Am. J. Enol. Vitic.* 47:25-30.

- Verstraeten, S.V., Keen, C.L., Schmitz, H.H., Fraga, C.G., Oteiza, P.I.** (2003) Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radical Bio. Med.* 34:84-92.
- Vinderola, C.G., Costa, G.A., Regenhardt, S., Reinheimer, J.A.** (2002) Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 12:579-589.
- Vinderola, C. G., Reinheimer, J.A.** (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Res. Int.* 36:895–904.
- Vodnar, D.C., Paucean, A., Dulf, F.V., Socaciu, C.** (2010) HPLC characterization of lactic acid formation and FTIR fingerprint of probiotic bacteria during fermentation processes. *Not. Bot. Hort. Agrobi. Cluj.* 38:109-113.
- Vodnar, D.C., Ranga, F., Pop, O.L., Socaciu, C.** (2012) Catechin-rich tea extracts improve the *Lactobacillus casei* growth during lactic fermentation. *Bulletin UASVM Agriculture*, 69:447-453.
- Vodnar, D.C., Socaciu, C.** (2012) Green tea increases the survival yield of Bifidobacteria in simulated gastrointestinal environment and during refrigerated conditions. *Chem. Cent. J.* 6: 61.
- Vodnar, D.C., Socaciu, C.** (2014) Selenium enriched green tea increase stability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* in chitosan coated alginate microcapsules during exposure to simulated gastrointestinal and refrigerated conditions. *LWT-Food Sci. Technol.* 57:406-411.
- Voet, D., Voet, J.G.** (2005) Lipides et membranes. Dans: *Biochimie*, D. Voet, J.G. Voet (eds). Éditions de Boeck, Bruxelles, pp.382-455.
- Voo, W.-P., Ravindra, P., Tey, B.-T., Chan, E.-S.** (2011) Comparison of alginate and pectin based beads for production of poultry probiotic cells. *J. Biosci. Bioeng.* 111:294-299.
- Wallace, T.D., Bradley, S., Buckley, N.D., Green-Johnson, J.M.** (2003) Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: effects on cytokine production. *J. Food Prot.* 66:466-472.
- Wang, H., Provan, G.J., Helliwell, K.** (2000) Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends Food Sci. Tech.* 11:152-160.
- Wang, S., Marcone, M.F., Barbut, S., Lim, L.-T.** (2012) Fortification of dietary biopolymers-based packaging material with bioactive plant extracts. *Food Res. Int.* 49:80-91.
- Waterhouse, G.I.N., Wang, W., Sun-Waterhouse, D.** (2014) Stability of canola oil encapsulated by co-extrusion technology: Effect of quercetin addition to alginate shell or oil core. *Food Chem.* 142:27-38.
- Wehkamp, J., Harder, J., Wehkamp, K., Wehkamp-von Meissner, B., Schlee, M., Enders, C., Sonnenborn, U., Nuding, S., Bengmark, S., Fellermann, K., Schröder, M., Stange, E. F.** (2004) NF- κ B- and AP-1-Mediated induction in human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect. Immun.* 72:5750-5758.
- Wellner, N., Kačuráková, M., Malovíková, A., Wilson, R.H., Belton, P.S.** (1998) FT-IR study of pectate and pectinate gels formed by divalent cations. *Carbohydr. Res.* 308:123-131.

- Wiseman, S.A., Balentine, D.A., Frei, B.** (1997) Antioxidants in tea. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37:705-718.
- Wong-ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I.-M., Tieleman, D.P., Monticelli, L.** (2007) Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: A molecular dynamics study. *Biophys. J.* 93:4225-4236.
- Wratten, M.L., van Ginkel, G., van't Veld, A.A., Bekker, A., van Faassen, E.E., Sevanian, A.** (1992) Structural and dynamic effects of oxidatively modified phospholipids in unsaturated lipid membranes. *Biochem.* 31:10901-10907.
- Wu, C., Zhang, J., Wang, M., Du, G., Chen, J.** (2012) *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39:1031-1039.
- Yamamoto, Y., Gaudu, P., Gruss, A.** (2011) Oxidative stress and oxygen metabolism in lactic acid bacteria. Chap. 5. Dans: *Lactic acid bacteria and bifidobacteria: Current progress in advanced research*, K. Sonomoto, A. Yokota (eds) Caister Academic Press. Norfolk, pp. 91-102.
- Yan, F., Cao, H., Cover, T.L., Washington, M.K., Shi, Y., Liu, L., Chaturvedi, R., Peek Jr., R.M., Wilson, K.T., Polk, D.B.** (2011) Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 121:2242-2253.
- Yang, C.S, Maliakal, P., Meng, X.** (2002) Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42:25–54.
- Ye, M., Liu, D., Zhang, R., Yang, L., Wang, J.** (2012) Effect of hawk tea (*Litsea coreana* L.) on the numbers of lactic acid bacteria and flavour compounds of yoghurt. *Int. Dairy J.* 23:68-71.
- Ying, D., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Singh, T.K., Freimüller Leischtfeld, S., Gantenbein-Demarchi, C., Augustin, M.A.** (2011) Tocopherol and ascorbate have contrasting effects on the viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG. *J. Agric. Food Chem.* 59:10556–10563
- Zareie, M., Johnson-Henry, K., Jury, J., Yang, P.-C., Ngan, B.-Y., McKay, D.M., Soderholm, J.D., Perdue, M.H., Sherman, P.M.** (2006) Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut* 55:1553-1560.
- Zaveri, N.T.** (2006) Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci.* 78:2073–2080.
- Zhang, Y.-M., Rock, C.O.** (2008) Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat. Rev. Micro.* 6:222-233.
- Zhao, D., Shah, N.P.** (2014a) Effect of tea extract on lactic acid bacterial growth, their cell surface characteristics and isoflavone bioconversion during soymilk fermentation. *Food Res. Int.* 62:877-885.
- Zhao, D., Shah, N.P.** (2014b) Influence of tea extract supplementation on bifidobacteria during soymilk fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 188: 36-44.
- Zou, Q., Zhao, J., Liu, X., Tian, F., Zhang, H.-P., Zhang, H., Chen, W.** (2011) Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46:1672-1678.
- Zoumpopoulou, G., Papadimitriou, K., Polissiou, M.G., Tarantilis, P.A., Tsakalidou, E.** (2010) Detection of changes in the cellular composition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the presence of antimicrobial compound(s) of *Lactobacillus*

strains using Fourier transform infrared spectroscopy. *Int. J. Food Microbiol.* 144:202-207.

Zuidam, N.J., Shimoni, E. (2010) Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to take them. Dans: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, N.J. Zuidam, V. Nedovic (eds.), Springer-Verlag, New York Inc., pp.3–29.