

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2017/191093 A1**

(43) Date de la publication internationale  
09 novembre 2017 (09.11.2017)

WIPO | PCT

(51) Classification internationale des brevets :

C12N 1/20 (2006.01) A23L 29/00 (2016.01)  
C12N 11/04 (2006.01) A61K 35/00 (2006.01)

to Research sprl, Rue Herman Meganck 21, B-5032 Gembloux-Les Isnes (BE).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/EP2017/060341

(74) Mandataire : PRONOVEM - OFFICE VAN MALDEREN ; Ave. Josse Goffin 158, B-1082 Bruxelles (BE).

(22) Date de dépôt international :

02 mai 2017 (02.05.2017)

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

2016/5316 02 mai 2016 (02.05.2016) BE

(71) Déposant : LACTO RESEARCH SPRL [BE/BE] ; Rue Herman Meganck 21, B-5032 Gembloux-Les Isnes (BE).

(72) Inventeurs : TIMMERMANS, Shannon ; c/o Lacto Research sprl, Rue Herman Meganck 21, B-5032 Gembloux-Les Isnes (BE). FONTEYN, Fabienne ; c/o Lacto Research sprl, Rue Herman Meganck 21, B-5032 Gembloux-Les Isnes (BE). THONART, Philippe ; c/o Lac-

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: METHOD FOR COATING MICROORGANISMS, POWDER OF SAID COATED MICROORGANISMS, AND PHARMACEUTICAL, NUTRACEUTICAL, COSMETIC, FOOD OR SANITARY COMPOSITION COMPRISING SAID POWDER

(54) Titre : PROCEDE D'ENROBAGE DE MICROORGANISMES, POUFRE DESDITS MICROORGANISMES ENROBES ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE, NUTRACEUTIQUE, COSMETIQUE, ALIMENTAIRE OU SANITAIRE LA COMPRENANT

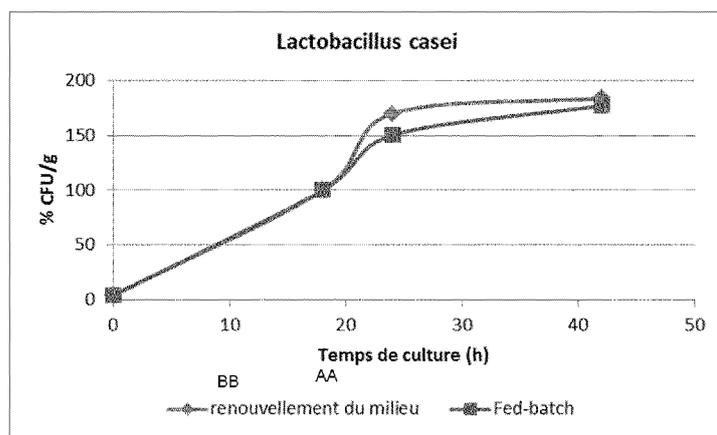


Fig. 3

AA Culture time (h)  
BB Medium renewal

(57) Abstract: The invention relates to a method for coating microorganisms, preferably probiotic microorganisms, and to a powder of said coated microorganisms, obtained using said method, as well as to compositions comprising said powder.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à un procédé d'enrobage de microorganismes, de préférence de microorganismes probiotiques et à une poudre desdits microorganismes enrobés obtenue par ce procédé, ainsi qu'aux compositions comprenant cette poudre.

[Suite sur la page suivante]



WO 2017/191093 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

**Déclarations en vertu de la règle 4.17 :**

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17(iv))*

**Publiée:**

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

5

Procédé d'enrobage de microorganismes, poudre desdits microorganismes enrobés et composition pharmaceutique, nutraceutique, cosmétique, alimentaire ou sanitaire la  
10 comprenant

Domaine de l'invention

[0001] La présente invention concerne un procédé  
15 d'enrobage ou d'encapsulation de microorganismes cellulaires, en particulier de bactéries et de champignons y compris de levures, la poudre desdits microorganismes enrobés ou encapsulés, ainsi qu'une composition pharmaceutique, nutraceutique, cosmétique, alimentaire ou  
20 sanitaire comprenant ladite poudre de microorganismes enrobés et les applications de ces compositions.

Arrière-plan technologique à la base de l'invention

25 [0002] Même si les probiotiques peuvent être définis de plusieurs façons, en fonction de la compréhension des mécanismes d'action de leurs effets sur la santé humaine, il est généralement admis qu'il s'agit de micro-organismes vivants, bactéries ou levures utilisés comme compléments  
30 alimentaires microbiens vivants qui confèrent un effet bénéfique spécifié et démontré pour la santé de l'hôte qui les ingère, par exemple en améliorant son équilibre microbien intestinal. En raison de leurs effets bénéfiques sur la santé, les microorganismes probiotiques ont été utilisés

dans le domaine pharmaceutique, cosmétique, nutraceutique et dans la transformation des aliments, en particulier pour la préparation d'aliments dits fonctionnels, c'est-à-dire ayant un effet bénéfique sur la santé ou ayant des vertus

**5** prophylactiques ou thérapeutiques contre certains désordres ou certaines maladies, affectant les animaux ou l'humain. Cette définition englobe aussi la composition nutraceutique ou complément alimentaire destiné à l'animal ou l'humain, ladite composition ou ledit complément étant aptes à générer

**10** un maintien de la santé de l'animal ou de l'humain, sans devoir prouver les vertus thérapeutiques bénéfiques du produit actif administré à l'animal ou l'humain.

**[0003]** A titre indicatif, la norme que tout produit, vendu avec des allégations santé provenant de l'ajout de

**15** probiotiques doit contenir au moins  $10^6$  -  $10^7$  bactéries probiotiques viables par gramme (FAO/OMS, 2001).

**[0004]** Cependant, le nombre de bactéries probiotiques viables capables de fournir un effet bénéfique ciblé est souvent trop faible.

**20** **[0005]** Différentes approches ont été utilisées pour améliorer la viabilité des probiotiques, y compris la sélection de souches résistantes à l'acidité et aux sels biliaires, l'adaptation au stress, l'utilisation de récipients imperméables à l'oxygène, une fermentation en

**25** continu-discontinu, l'incorporation d'oligo-éléments tels que les peptides et les acides aminés et la micro-encapsulation.

**[0006]** L'enrobage ou la micro-encapsulation des microorganismes probiotiques est un processus physico-

**30** chimique ou mécanique permettant de piéger une substance dans un matériau polymérique afin de produire des microcapsules, microsphères ou microbilles, d'un diamètre allant d'environ 1  $\mu\text{m}$  à environ 1000  $\mu\text{m}$ , qui peuvent libérer

leur contenu à des taux contrôlés sous l'influence de conditions spécifiques.

**[0007]** L'encapsulation des probiotiques est principalement utilisée pour protéger les cellules contre un environnement défavorable, plutôt que pour une libération  
5 contrôlée.

**[0008]** L'atomisation est un procédé de séchage bien connu caractérisé par des vitesses de production élevées et des coûts opérationnels relativement faibles. Cependant, les  
10 probiotiques soumis à une atomisation sont sensibles à la chaleur et un séchage entraîne une mort cellulaire à cause de la déshydratation et de l'inactivation thermique d'enzymes.

**[0009]** La lyophilisation est utilisée  
15 traditionnellement pour sécher et conserver les cultures d'initiation de la fermentation d'un procédé de préparation d'aliment et les probiotiques.

**[0010]** Il est connu un procédé d'obtention de bactéries lactiques, sous forme de poudre, comprenant les  
20 étapes consistant à cultiver les bactéries lactiques, à concentrer la culture et à lyophiliser celle-ci.

**[0011]** La lyophilisation permet d'obtenir une déshydratation poussée des microorganismes compatible avec des durées très longues de conservation des produits sous  
25 forme de poudre.

**[0012]** Cette méthode met en oeuvre des changements de température du produit assez agressifs pour les microorganismes, car elle nécessite une congélation, ce qui n'est pas sans conséquence pour les cellules. Dans certains cas,  
30 elle occasionne des altérations cellulaires (par une peroxydation des acides gras, mais également génétiques par une modification des protéines.

**[0013]** Le niveau de la viabilité cellulaire après lyophilisation varie en fonction de nombreux facteurs, dont

la souche du micro-organisme et l'efficacité de l'agent protecteur utilisé pendant la lyophilisation (Morgan & al., 2006).

**[0014]** Les poudres obtenues sont cependant peu  
5 résistantes à l'air, à l'humidité et/ou à la température. Elles conservent difficilement une concentration cellulaire stable pendant un stockage. De plus, lorsque les microorganismes comme les bactéries lactiques passent par l'estomac après l'ingestion, une majorité des cellules sont  
10 tuées par le suc gastrique avant d'atteindre l'intestin.

**[0015]** Afin de surmonter ces problèmes, des procédés d'enrobage ou de micro-encapsulation des micro-organismes, en particulier des bactéries lactiques, utilisant des gélatines, des sucres, des gommes, etc. ont été proposés. Le  
15 procédé classique d'enrobage des micro-organismes, en particulier des bactéries lactiques, comprend habituellement l'étape consistant à introduire un enrobage spécifique sur les cellules séchées ou sur la culture concentrée de cellules comme indiqué à la Figure 1.

**[0016]** Les microorganismes, en particulier les bactéries lactiques sont cultivées dans un bioréacteur en aérobie ou anaérobie en utilisant un milieu de fermentation contenant des sources assimilables d'acides aminés, peptides, sucres, vitamines et minéraux. Ces nutriments  
25 contenus dans le milieu ne sont utilisés que pour la prolifération des cellules.

**[0017]** Les cultures concentrées sont obtenues au moyen d'une séparation par une centrifugation ou une ultrafiltration, dont le but est uniquement la séparation et  
30 la concentration des cellules contenues dans le milieu de culture.

**[0018]** Une composition d'enrobage peut être appliquée à la culture sèche de micro-organismes, en particulier des

bactéries lactiques ainsi obtenues, suivie d'un séchage, le plus souvent par lyophilisation.

**[0019]** De façon alternative, la culture de micro-organismes, en particulier de bactéries lactiques  
5 concentrées et formulées, peut être introduite dans une solution aqueuse de la composition d'enrobage, suivie d'un séchage, le plus souvent par lyophilisation.

**[0020]** Cet enrobage peut être de type micro-sphérique, et appliqué aux micro-organismes, en particulier  
10 aux bactéries lactiques par une buse d'injection dans un procédé de micro-encapsulation.

**[0021]** Pour la micro-encapsulation de cellules microbiennes, il est essentiel que le procédé d'encapsulation soit mis en oeuvre dans des conditions  
15 relativement douces pour assurer une viabilité élevée des cellules encapsulées.

**[0022]** Il existe de nombreuses techniques de micro-encapsulation. Cependant, les techniques appliquées aux probiotiques sont généralement limitées à l'encapsulation  
20 dans des particules en gel, l'enrobage en lit fluidisé, et le séchage par atomisation.

**[0023]** Les techniques d'encapsulation de microorganismes probiotiques dans des particules en gel peuvent être classées en 2 groupes, en fonction du procédé  
25 utilisé pour former les microcapsules: les techniques d'extrusion et d'émulsion.

**[0024]** L'extrusion est une technique physique qui utilise des hydro-colloïdes comme matériaux d'encapsulation. La solution de polymère est d'abord mélangée avec les  
30 cellules microbiennes. Ce mélange est ensuite extrudé, à travers une buse à haute pression, sous forme de gouttelettes dans une solution contenant un agent de solidification.

**[0025]** La gélification se produit par contact de la source polymérique avec l'agent de solidification, par

refroidissement ou par une combinaison des deux. Les facteurs qui influent la taille des microcapsules produites sont :

- le diamètre de la buse de dispersion,
- la viscosité et le débit de la source polymérique,
- 5 - la distance d'écoulement entre la buse et la solution de solidification,
- la concentration et la température de la source polymérique.

**[0026]** De nouvelles techniques ont été développées pour la formation de gouttelettes et donc des microcapsules par extrusion : (a) la formation de gouttelettes par une force électrostatique, (b) la formation de gouttelettes par le dispositif de jet coupé, (c) la formation de gouttelettes par la fréquence des vibrations, (d) la formation de gouttelettes par co-extrusion (flux coaxial).

**[0027]** Les principaux avantages de la méthode d'extrusion sont la simplicité de son fonctionnement, à moindre coût, et les conditions de fonctionnement assurant une viabilité cellulaire élevée. L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle est difficile à industrialiser et à automatiser en raison de la formation des microsphères.

**[0028]** La réalisation d'une émulsion est une technique chimique permettant d'encapsuler des cellules probiotiques, qui utilise également des hydro-colloïdes comme matériaux d'encapsulation. Cette technique implique la dispersion d'une suspension « cellule-polymère » (phase discontinue) dans une phase huileuse/organique (phase continue). Le mélange est ensuite homogénéisé pour former une émulsion eau-dans-huile à l'aide d'un agent tensioactif et d'une agitation. La gélification de la phase dispersée est déclenchée par refroidissement ou par l'addition d'un agent de solidification à l'émulsion. Les microcapsules

produites sont ensuite recueillies par filtration ou par centrifugation.

**[0029]** Cette technique présente l'avantage d'être facile à industrialiser et donne un taux de survie élevé des  
5 micro-organismes. L'inconvénient majeur de cette technique est que les microcapsules produites présentent un large éventail de taille et de forme.

**[0030]** Le séchage par atomisation est couramment utilisé pour la micro-encapsulation de microorganismes  
10 probiotiques. Il implique l'atomisation d'une solution contenant les cellules microbiennes et la matrice de polymère dans l'air chaud de séchage, suivie d'une évaporation rapide de l'eau.

**[0031]** Le produit micro-encapsulé est ensuite séparé,  
15 sous forme d'une poudre sèche, de l'air de transport dans un cyclone. Différents paramètres de séchage par pulvérisation tels que le taux d'alimentation en produits, le débit d'air, la température du produit, la température d'entrée d'air, et la température de sortie d'air doivent être optimisés afin  
20 de produire des microcapsules bien formées.

**[0032]** Cette technique présente l'avantage d'avoir des vitesses de production élevées, mais aussi des inconvénients comme les coûts de l'installation industrielle et de fonctionnement. L'inconvénient principal est  
25 l'utilisation de températures élevées et des stress osmotiques dus à la déshydratation qui entraînent des pertes de viabilité et d'activité relativement élevés immédiatement après pulvérisation, en particulier l'inactivation d'enzymes essentielles qui maintiennent l'équilibre cellulaire.

**[0033]** Lors d'un enrobage par pulvérisation, c'est à  
30 dire dans la technique du lit fluidisé, les cellules probiotiques doivent être sous forme solide, mais pas nécessairement complètement séchées. Elles sont ensuite mises en suspension dans l'air et un matériau d'enrobage

liquide est appliqué par pulvérisation sur les cellules probiotiques. Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet facilement l'ajout d'une couche supplémentaire de molécules spécifiques pour une libération  
5 dans l'intestin, par exemple.

**[0034]** Un problème dans l'approche de l'enrobage des cellules probiotiques est que ces technologies stabilisent les bactéries le plus souvent sous forme liquide. Pour améliorer le stockage, il est pratique de convertir ces  
10 microsphères en poudre sèche en utilisant des techniques telles que l'atomisation, la lyophilisation ou le lit fluidisé. Néanmoins, il est également connu que la lyophilisation induit une mortalité significative des cellules bactériennes à cause de la perte d'intégrité  
15 membranaire et de la dénaturation des macromolécules. Les composants du milieu dans lequel les bactéries sont séchées peuvent avoir un effet plus important sur la stabilité des cellules probiotiques que la micro-encapsulation elle-même.

**[0035]** La multiplication des microorganismes probiotiques à l'intérieur de microcapsules composées d'un  
20 matériau polymère est déjà connue dans l'art. En effet, il a été démontré que la production de populations élevées de cellules probiotiques était possible à l'intérieur de microcapsules d'alginate.

**[0036]** Cependant de manière générale, de tels procédés classiques pour l'enrobage des bactéries lactiques qui comprennent les étapes d'introduction de la composition d'enrobage après concentration et éventuellement séchage des cultures, conduisent lors de l'étape de lyophilisation, à  
25 des rendements de survie cellulaire qui restent faibles pour de nombreux probiotiques.

**[0037]** En outre, il est connu que les microorganismes probiotiques montrent une perte de viabilité cellulaire au

cours des étapes du procédé de la micro-encapsulation lui-même et lors de leur séchage.

### Etat de la technique

5

[0038] Champagne et al. (2000 & 2007) décrivent une production de microorganismes probiotiques à l'intérieur d'une microsphère composée d'un matériau polymérique, en particulier de microcapsules d'alginate. Cependant ce document ne décrit ni ne suggère de traiter ces microcapsules d'alginate obtenues par une étape supplémentaire de séchage, en particulier par lyophilisation.

[0039] La demande internationale de brevet WO2015/000972 divulgue une méthode améliorée de lyophilisation de cellules encapsulées comprenant des étapes successives de brèves incubations insuffisantes pour assurer une multiplication cellulaire dans un milieu comprenant des molécules protectrices, suivie d'une étape de séchage de ces cellules encapsulées et traitées.

20

### Buts de l'invention

[0040] La présente invention a pour but de fournir un nouveau procédé d'enrobage ou d'encapsulation de microorganismes, en particulier des microorganismes probiotiques choisis parmi le groupe constitué par les bactéries, telles que les bactéries lactiques et les bifidobactéries, ainsi que les champignons, en particulier les levures, et qui ne présente pas les inconvénients de l'état de la technique.

[0041] Un but particulier de l'invention est d'obtenir un procédé industrialisable et qui génère des poudres de ces micro-organismes, en particulier des probiotiques enrobés ou encapsulés avec une faible mortalité des cellules.

[0042] Un dernier but de l'invention est d'obtenir de telles poudres de microorganismes lyophilisées qui comprennent une concentration élevée en microorganismes vivants enrobés ou encapsulés aptes à présenter une  
5 efficacité probiotique ou non probiotique dans des compositions de type pharmaceutiques, cosmétiques, agroalimentaires, nutraceutiques ou sanitaires, en particulier dans des compositions sanitaires utilisables dans l'épuration des canalisations ou des fosses septiques,  
10 mais aussi d'obtenir des poudres ayant de préférence des tailles de particules solides constituées de ces microcapsules qui soient les plus uniformes possibles ; les dites poudres étant aptes à être conservées, manipulées et stockées pendant des durées prolongées.

15

#### **Éléments caractéristiques de l'invention**

[0043] La présente invention concerne un procédé d'enrobage ou d'encapsulation de microorganismes de  
20 préférence des microorganismes probiotiques, le dit procédé comprenant les étapes, de préférence consécutives suivantes:

- éventuellement une première étape de culture et de multiplication desdits microorganismes, suivie éventuellement d'une étape de collecte desdits  
25 microorganismes,
- une étape d'enrobage desdits microorganismes dans des capsules polymériques,
- une étape de culture et de multiplication des dits microorganismes encapsulés dans une première solution  
30 nutritive adéquate pendant une durée comprise entre environ 2 heures et environ 7 jours, de préférence pendant une durée supérieure à 24 heures ou 48 heures,

- une étape de collecte des microorganismes multipliés et encapsulés et
  - une étape de séchage par lyophilisation des microorganismes multipliés et encapsulés pour former
- 5 une poudre de microorganismes encapsulés.

**[0044]** De préférence, dans le procédé de l'invention, on effectue une seconde étape de culture et de multiplication des microorganismes encapsulés pendant une durée adéquate pour atteindre un maximum de cellules encapsulées, de

10 préférence une durée comprise entre environ 2 heures et environ 7 jours, plus particulièrement supérieure à 4 heures, à 6 heures, à 12 heures, à 24 heures ou à 48 heures, de préférence une durée comprise entre environ 6 heures et environ 4 jours ou entre environ 12 heures et environ 48

15 heures, soit après une adjonction ou procédure « fed-batch » d'une seconde solution nutritive adéquate ou soit après un remplacement de la première solution nutritive par une seconde solution nutritive adéquate et dans lequel ladite première et ladite seconde solution nutritive adéquate sont

20 différentes ou identiques.

**[0045]** Selon l'invention, le remplacement total de la première solution nutritive par une seconde solution nutritive est de manière inattendue particulièrement efficace pour augmenter à nouveau la croissance des cellules

25 encapsulées et augmenter encore leur concentration et la conservation au sein des capsules polymériques, probablement suite à l'élimination des composants ou contaminants éventuellement présents dans le milieu de culture desdites cellules, éventuellement synthétisés par les dites cellules,

30 et limitant la croissance et la conservation laminaire pour générer une poudre de microcapsules essentiellement de forme essentiellement sphérique, la dite buse vibrante ayant une

fréquence de vibration comprise entre environ 1 Hz et environ 20.000 Hz et une amplitude supérieure à environ 0,5 µm.

**[0046]** Avantageusement, dans le procédé et la poudre de l'invention, deux liquides sont extrudés en écoulement  
5 laminaire avec un ou plusieurs systèmes à plusieurs, de préférence à deux buses, de préférence vibrantes, comprenant au moins une buse intérieure et une buse extérieure.

**[0047]** De préférence, dans le procédé et la poudre de l'invention, les microorganismes, sont choisis parmi les  
10 bactéries probiotiques et les champignons, en particulier les levures.

**[0048]** Avantageusement, les bactéries probiotiques sont choisies parmi le groupe constitué par les bactéries lactiques ou les bifidobactéries, plus particulièrement les  
15 bactéries lactiques sont choisies parmi le groupe constitué par *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, en particulier *Lactobacillus casei*  
20 *subsp. Casei* ou *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, en particulier *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* ou *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus*  
25 *fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus*  
30 *lactis*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus halophilus*, *Streptococcus thermophilus* ou leur mélange.

**[0049]** Dans le procédé et la poudre de l'invention, les bifidobactéries sont choisies parmi le groupe constitué

par *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis* y compris *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*,  
5 *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum* ou leur mélange. Les microorganismes peuvent aussi être choisis parmi le groupe constitué par *Micrococcus varians*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus* var. *toyoi*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli* souche nissle, *Paenibacillus alvei*, *Propionibacterium freudenreichii*  
15 *Escherichia coli* souche nissle, *Propionibacterium freudenreichii* et les levures, de préférence *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Yarrowia lipolytica*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida albicans* et *Kluyveromyces marxianus* .

20 [0050] Avantageusement dans le procédé et la poudre de l'invention, le matériau polymérique enrobant le ou les microorganisme(s) dans des microcapsules polymériques est constitué par un ou plusieurs hydro-colloïde(s) choisi(s) parmi le groupe constitué par l'alginate, l'agar, les  
25 carraghénanes, de préférence le κ-carraghénane, l'amidon, le chitosane, l'alginate, la pectine, le pullulane, la gélatine, les gommes, en particulier la gomme gellane ou la gomme xanthane, l'acétophtalate de cellulose, les protéines du lait, en particulier la caséine ou un mélange d'entre  
30 eux, tels que décrits par Burgain & al.(2011) ainsi que par Rathore & al.(2013); lesdits matériaux pouvant être combinés à d'autres éléments connus pour améliorer cet enrobage, en particulier des maltodextrines, de la cellulose, de l'hemicellulose, de l'ethylcellulose, de la carboxycellulose

et leur mélange. Avantageusement, le matériau polymérique préféré est de l'alginate, qui ne nécessite pas d'être combiné avec un autre matériau dit « entérique » pour obtenir une résistance au passage de la composition de l'invention dans l'estomac et à l'action du liquide biliaire, mais une libération spécifique des cellules probiotiques enrobées dans l'intestin.

**[0051]** Cependant, dans le procédé et les poudres de l'invention, le matériau polymérique peut être combiné avec un ou plusieurs matériaux, dits « entériques » ou être présents dans un véhicule dit « entérique », c'est-à-dire un produit offrant aux micro capsules et donc aux cellules enrobées, une résistance contre le milieu présent dans l'estomac, le duodenum et l'intestin grêle d'un mammifère, en particulier l'estomac, le duodénum ou l'intestin grêle d'un homme ; ce produit pouvant prendre la forme d'une capsule ou d'une tablette d'éthylcellulose, d'hydroxypropylcellulose, de caroxyméthylcellulose ou d'Eudragit®.

**[0052]** Dans le procédé et la poudre de l'invention, la source nutritive, présente éventuellement sous forme d'une solution nutritive, des microorganismes encapsulés comprend essentiellement des acides aminés, des saccharides, des huiles végétales, des minéraux, en particulier un sel halogéné d'un métal alcalin ou alcalino-terreux ou un sel de zinc, tel que de l'acétate de zinc, du chlorure de zinc ou du lactate de zinc, des anti-oxydants, des acides, tels que l'acide ascorbique ou l'acide citrique et éventuellement des vitamines. De préférence cette source nutritive est présente en une quantité comprise entre environ 0,1% et environ 10% en poids, plus particulièrement entre environ 1 % et environ 5% en poids par rapport au poids total de la poudre séchée égale à 100%.

[0053] De préférence dans le procédé et la poudre de l'invention, le microorganisme est soit *Lactobacillus rhamnosus* et comprend une concentration en *Lactobacillus rhamnosus* supérieure à  $1,5 \times 10^{11}$  (cfu/g), de préférence  
5 supérieure à  $2 \times 10^{11}$  (cfu/g) ou soit le microorganisme est choisi parmi le groupe constitué par *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus bulgaricus* et comprend une concentration en microorganismes par capsule supérieure à  $1 \times 10^9$  (cfu/g), de préférence  
10 comprise entre  $1 \times 10^9$  (cfu/g) et  $2 \times 10^{11}$  (cfu/g).

[0054] Un autre aspect de l'invention concerne soit une composition pharmaceutique comprenant un diluant ou véhicule pharmaceutique adéquat, soit une composition alimentaire comprenant un diluant ou un véhicule alimentaire  
15 adéquat ou soit une composition nutraceutique comprenant un diluant ou un véhicule adéquat et la poudre de l'invention.

[0055] Un dernier aspect de l'invention concerne une composition sanitaire, en particulier destinée à l'épuration des déchets présents dans des canalisations ou fosses  
20 septiques et comprenant la poudre de l'invention.

[0056] La présente invention sera décrite en détails ci-dessous dans la description d'une forme d'exécution préférée de l'invention, en référence aux figures et à l'exemple présenté à titre d'illustration non limitative de  
25 la portée de l'invention.

### **Brève description des figures**

[0057] La figure 1 représente les étapes d'un procédé  
30 de l'état de la technique pour un enrobage ou d'encapsulation de bactéries lactiques.

[0058] La figure 2 représente les étapes principales du procédé d'obtention d'une poudre lyophilisée des

bactéries lactiques enrobées ou encapsulées selon la présente invention.

**[0059]** La figure 3 représente l'évolution de la concentration cellulaire de la souche (*L. casei*) dans les billes d'alginate lorsque du milieu frais (dit « fed-batch ») sous forme d'une solution nutritive est ajouté ou lorsque le milieu est complètement renouvelé par remplacement de la solution nutritive après une culture d'une nuit (environ 18 heures) et une seconde fois après 24 heures de culture.

**[0060]** La figure 4 représente l'effet du renouvellement du milieu pendant la culture de 42 heures de la souche (*L. casei*) sur la concentration cellulaire de la poudre lyophilisée par rapport à la concentration de la poudre obtenue après lyophilisation des microcapsules mises en culture une nuit (environ 18 heures).

### **Définitions**

**[0061]** On entend par microcapsules, des microsphères ou des microbilles ayant des structures essentiellement sphériques et d'un diamètre compris entre environ 1 et environ 1000  $\mu\text{m}$ , de préférence entre environ 5  $\mu\text{m}$  et environ 800  $\mu\text{m}$ , plus particulièrement entre environ 10  $\mu\text{m}$  et environ 500  $\mu\text{m}$ , et constituées d'un matériau polymérique apte à enrober ou encapsuler des cellules d'un ou plusieurs microorganismes, ainsi que d'autres éléments comme une source nutritive pour les dites cellules.

### **Description détaillée de l'invention**

**[0062]** La présente invention concerne un procédé d'enrobage ou d'encapsulation, en particulier de microencapsulation d'un microorganisme, c'est-à-dire une cellule

vivante choisie parmi le groupe constitué par les bactéries, en particulier les bactéries lactiques ou les bifidobactéries et les champignons, de préférence un microorganisme probiotique encapsulé comprenant, tel que

5 représenté à la figure 2, les étapes, de préférence successives, suivantes:

- 10 - éventuellement une première culture 1, multiplication ou propagation préalable desdits microorganismes cellulaires, de préférence probiotiques, en particulier des microorganismes, en particulier des bactéries lactiques ou des levures, sur un milieu de croissance des microorganismes adéquat, en particulier une solution aqueuse comprenant de préférence comme
- 15 nutriments, au moins des acides aminés, des saccharides, des minéraux et éventuellement des vitamines ;
- 20 - éventuellement une étape de collecte des microorganismes multipliés dénommée étape de formulation 2 desdits microorganismes pour les mettre en conditions aptes à l'étape ultérieure d'enrobage ;
- un enrobage ou une encapsulation, en particulier une micro-encapsulation 3 desdits microorganismes ou cellules, de préférence probiotiques, multipliés dans des microcapsules polymériques ;
- 25 - une seconde culture 4, multiplication ou propagation desdits microorganismes dans une solution nutritive adéquate, de préférence une solution aqueuse comprenant comme nutriments au moins des saccharides, des acides aminés, des minéraux, et éventuellement des
- 30 vitamines et, pendant une phase de croissance cellulaire dans (à l'intérieur de) lesdites microcapsules polymériques, afin d'augmenter la concentration, de préférence d'un facteur 2, 4, 6, 10, 100 ou 1000 ou plus desdits micro-organismes, de

- préférence probiotiques, à l'intérieur des microcapsules polymériques, pendant une durée adéquate pour cette culture, multiplication ou propagation, de préférence pendant une durée de plus de 2 heures, de
- 5 préférence une durée de plus de 4 heures ou 6 heures, de plus de 12 heures, voire de plus de 24 heures ou 48 heures, en particulier pendant une durée comprise entre environ 2 heures et environ 7 jours, de préférence comprise entre environ 6 heures et environ
- 10 4 jours, plus particulièrement entre environ 12 heures et environ 48 heures ;
- une récolte 5, de préférence sur un tamis de taille adéquate, desdits micro-organismes de préférence probiotiques, encapsulés et
- 15 - un séchage 6, de préférence par lyophilisation des micro-organismes de préférence probiotiques, encapsulés pour former une poudre de micro-organismes de préférence probiotiques encapsulés.

**[0063]** Selon l'invention, le milieu de culture des

20 microorganismes encapsulés est une solution nutritive et de préférence aqueuse connue pour la croissance des microorganismes, en particulier les bactéries et les champignons, y compris les levures et comporte, de préférence des acides aminés ou des peptides source d'acides aminés,

25 des saccharides, c'est-à-dire des monosaccharides, tels que le glucose ou des polysaccharides, des minéraux en particulier sous forme de sels d'halogénures et de métaux alcalins ou alcalinoterreux, éventuellement des vitamines ayant de préférence des activités anti-oxydantes et

30 éventuellement des acides, tels que l'acide ascorbique ou l'acide citrique.

**[0064]** De préférence, la solution nutritive comporte les éléments suivants: peptone de caséine, extrait de levure, extrait de viande, du polyoxyéthylène sorbitan monooleate

(polysorbate 80 ou tween 80 ®), glucose, des minéraux (de préférence choisis parmi le groupe constitué par du potassium, du sodium, de l'ammonium, du magnésium et du manganèse et éventuellement du Zinc, du Cuivre, du fer, du Bore, du Cobalt, des sulfates, en particulier du sulfate de calcium et/ou du sulfate de magnésium, du phosphate de diammonium, de l'acide phosphorique, éventuellement du peptone de viande, du tryptone, du glucose ou d'autres saccharides et des vitamines.

- 5**
- 10** [0065] Dans les microcapsules le matériau (un hydro-colloïde) principal est choisi parmi le groupe constitué par l'alginate, l'agar, les carraghénanes, de préférence le κ-carraghénane, l'amidon, le chitosane, l'alginate, la pectine, le pullulane, la gélatine, les gommes, en particulier la gomme gellane ou la gomme xanthane,
- 15** l'acétophtalate de cellulose, la gélatine, les protéines du lait, en particulier la caséine ou un mélange d'entre eux, tels que décrits par Burgain & al.(2011) ainsi que par Rathore & al.(2013); lesdits matériaux pouvant être combinés
- 20** à d'autres éléments connus pour améliorer cet enrobage ou encapsulation, en particulier des maltodextrines, de la cellulose, de l'hemicellulose, de l'éthylcellulose, de la carboxycellulose et leur mélange. De préférence, les capsules polymériques sont constituées d'un matériau choisi
- 25** parmi le groupe constitué par l'alginate ou un mélange d'alginate et de maltodextrines.

- [0066] Les microcapsules sont presque exclusivement produites en utilisant des polymères solubles dans l'eau et qui fournissent un degré élevé de perméabilité aux nutriments
- 30** de faible poids moléculaire et aux métabolites, ainsi que des conditions optimales nécessaires au bon fonctionnement des cellules, de préférence probiotiques, encapsulées. En outre, de préférence, les matériaux des capsules, microsphères ou billes sont aussi sélectionnés pour assurer

une libération entérique des microorganismes, c'est-à-dire dans l'intestin du mammifère, y compris l'homme à qui elles sont administrées.

**[0067]** Aussi bien des polymères hydrosolubles  
5 naturels que des synthétiques ont été utilisés pour la micro-encapsulation de cellules microbiennes. Bien que les polymères synthétiques offrent une plus grande résistance mécanique et une meilleure stabilité chimique, les polymères naturels sont préférés à leurs homologues synthétiques, car  
10 ils sont moins nocifs pour l'intégrité et la viabilité cellulaire des microorganismes encapsulés.

**[0068]** Avantageusement, selon l'invention, les micro-organismes, de préférence probiotiques, en particulier des bactéries lactiques sont multipliées une première fois dans  
15 un bioréacteur en condition aérobie ou en condition anaérobie en utilisant un milieu de fermentation contenant des nutriments adéquats, en particulier une ou plusieurs source(s) assimilable(s) d'acides aminés, de peptides, de saccharides, de vitamines et de minéraux.

**[0069]** Cette culture de microorganismes probiotiques multipliés est ensuite introduite dans une composition d'enrobage, sans concentration préalable; la culture de micro-organismes, en particulier probiotiques, étant de préférence mélangée avec une solution comprise entre environ  
25 1% et environ 10% d'alginate de sodium stérile, de préférence à environ 5% d'alginate de sodium stérile.

**[0070]** Ledit mélange est ajouté goutte à goutte par extrusion dans une solution stérile contenant entre environ 3% et environ 1% de  $\text{CaCl}_2$ , de préférence environ 2%  $\text{CaCl}_2$  et  
30 entre environ 0.1 % et environ 5 % de glycérol, de préférence environ 1% de glycérol, à température ambiante tout en agitant continuellement et ces microcapsules obtenues sont ensuite durcies dans cette solution pendant une durée

comprise entre environ 30 minutes et environ 2 heures, de préférence pendant environ 1 heure.

**[0071]** La viabilité cellulaire de la poudre de cellules probiotiques enrobées ainsi obtenue est étonnamment  
5 supérieure à celle d'une poudre de cellules probiotiques enrobées obtenue à partir de microcapsules contenant une culture concentrée de ces microorganismes probiotiques.

**[0072]** De préférence, les microorganismes sont des bactéries gram-positives, en particulier des espèces de  
10 bactéries lactiques principalement utilisées comme probiotiques et traitées par les étapes du procédé de l'invention sont choisies parmi le groupe constitué par *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, en  
15 particulier *Lactobacillus casei* subsp. *Casei* ou *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, en particulier *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ou  
20 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*,  
25 *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus halophilus*, *Streptococcus thermophilus*, d'autres bactéries décrites par Anal & Singh, 2007 ou leurs mélanges.

30 **[0073]** Les bactéries lactiques, qui sont parmi les microorganismes probiotiques les plus importants généralement associés au tractus gastro-intestinal, ont de nombreux effets bénéfiques sur la flore intestinale humaine, y compris pour la stimulation immunitaire, pour la réduction

du taux de cholestérol, l'inhibition de la croissance des pathogènes, le maintien d'une microflore intestinale saine, la prévention du cancer, l'amélioration de l'utilisation du lactose, la prévention des maladies diarrhéiques ou de la constipation, l'absorption du calcium, la synthèse de vitamines et la prédigestion des protéines.

**[0074]** Ces bactéries Gram-positives, en forme de bâtonnet, non sporulées, catalase-négatives, généralement anaérobies, mais aérotoles, sont tolérantes à l'acidité et peuvent être fermentaires; l'acide lactique est le principal produit final de la fermentation des sucres.

**[0075]** En outre, d'autres microorganismes communément utilisés comme probiotiques sont les bifidobactéries, également traitées par les étapes du procédé de l'invention, de préférence choisies parmi le groupe constitué par *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, y compris *Bifidobacterium animalis subsp.animalis* et *Bifidobacterium animalis subsp.lactis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium pseudolongum*.

**[0076]** Les bifidobactéries sont également Gram-positives et sont en forme de bâtonnet, mais assurent leur croissance en anaérobiose. Ces bactéries peuvent se développer à un pH appartenant à la gamme 4.5-8.5. Les bifidobactéries fermentent les hydrates de carbone, produisant principalement de l'acide acétique et de l'acide lactique dans un rapport molaire de 3:2 (v/v), mais pas de dioxyde de carbone, d'acide butyrique ou d'acide propionique.

**[0077]** Outre les bactéries lactiques, d'autres bactéries telles que *Micrococcus varians*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus*

*licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus* var. *toyoi*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli* souche nissle, *Paenibacillus alvei*, *Propionibacterium freudenreichii*

5 *Escherichia coli* souche nissle, *Propionibacterium freudenreichii* ont également été identifiés comme ayant des effets probiotiques (Anal & Singh, 2007) et sont traités par les étapes de préférence successives du procédé de l'invention.

10 [0078] Outre des bactéries, d'autres microorganismes tel que des champignons peuvent être aussi enrobés par le procédé de l'invention et présents dans les poudres de l'invention. Parmi les champignons préférées, on peut mentionnes les levures, telles que *Saccharomyces cerevisiae*,  
15 *Saccharomyces boulardii*, *Yarrowia lipolytica*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida albicans* et *Kluyveromyces marxianus*.

[0079] L'invention concerne également la composition pharmaceutique, de préférence entérique c'est-à-dire  
20 libérant les microorganismes dans l'intestin du mammifère à qui elle est administrée, nutraceutique, alimentaire ou sanitaire comprenant éventuellement un diluant tel qu'un solvant ou véhicule pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire adéquat ainsi que la poudre de microorganismes,  
25 de préférence probiotiques, encapsulés et séchés de l'invention, ainsi que les applications, en particulier thérapeutiques (y compris pour le maintien ou le rétablissement de la santé d'un animal mammifère, y compris l'humain, mais aussi pour le traitement ou la prévention des  
30 pathologies infectieuses inflammatoires, comme la gastro-entérite, en particulier du nouveau-né, ou la maladie de Crohn) et cosmétiques de ces compositions. En particulier la présente invention concerne l'application de la composition

sanitaire de l'invention pour l'épuration de canalisations ou de fosses septiques.

**[0080]** Les compositions alimentaires, nutraceutiques ou pharmaceutiques de l'invention sont de préférence des compositions entériques présentes sous la forme d'une gélule dure ou gélule souple, de tablettes, de sachets ou de formulations adéquates contenant des matériaux tels que de l'amidon ou de la cellulose facilement administrables per os.

10

**Exemple 1: Obtention de microcapsules d'alginate avec crème de *Lactobacillus (Lb.) rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* ou *Lactobacillus bulgaricus*.**

15 **[0081]** Des microcapsules de *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus* ou *Lb. bulgaricus* dans une matrice faite d'alginate ont été préparées selon le protocole suivant : 250 g ou 50 g d'une solution stérile d'alginate à 5% en poids ont été ajoutés à des quantités équivalentes de 250g de crème de *Lb. rhamnosus* ( $7 \times 10^9$  cfu), à 50 g de *Lb. helveticus* ( $8,73 \times 10^9$  cfu), à 250 g de *Lb. acidophilus* ( $1,14 \times 10^9$  cfu), ou à 50 g de *Lb. bulgaricus* ( $8,03 \times 10^8$  cfu).

25 **[0082]** Une coulée goutte à goutte avec un appareil de rupture des gouttes en régime d'écoulement laminaire a été réalisée pour produire des microcapsules par solidification dans une solution composée de  $\text{CaCl}_2$  à 2% en poids et de glycérol à 1% en poids sous agitation. La séparation des microcapsules a ensuite été réalisée à l'aide d'un tamis

30 stérile.

**[0083]** 250g ou 50g des microcapsules ainsi produites ont été mis en culture dans un bioréacteur afin d'augmenter la concentration cellulaire en *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus* ou *Lb. bulgaricus* à l'intérieur

des microcapsules avant lyophilisation. Une poudre fluide et sèche de microcapsules a été obtenue.

- [0084]** Dans les mêmes conditions, un témoin plus concentré en cellules de *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus* ou *Lb. bulgaricus* a été réalisé afin d'avoir une concentration dans les microcapsules équivalente à la concentration en *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus* ou *Lb. bulgaricus* obtenue après la phase de croissance cellulaire dans les microcapsules.
- 5**
- 10** **[0085]** Les teneurs en bactéries viables dans les microcapsules (cfu) ont été analysées avant et après la phase de croissance dans les microcapsules, ainsi qu'après la lyophilisation. Ces dernières ont été comparées aux teneurs en bactéries viables obtenues dans des microcapsules plus
- 15** concentrées avant et après lyophilisation (témoin). Des résultats similaires aussi inattendus ont été obtenus avec d'autres souches de microorganismes de bactéries lactiques, de bifidobactéries ou de levures. Par conséquent, ces différents types de microorganismes peuvent trouver à ces
- 20** concentrations plus élevées et plus viables des applications avantageuses dans l'alimentation, la nutraceutique, la cosmétique ou la pharmacie ainsi que dans le domaine sanitaire, en particulier pour le traitement des déchets dans les canalisations et les fosses septiques.
- 25** **[0086]** Les résultats pour les 4 souches décrites ci-dessus sont présentés dans le tableau 1 suivant :

Test	Cfu/ g dans la crème	Cfu/g dans les microcapsules fraiches avant	Cfu/g dans les microcapsules fraiches après	Cfu/g dans la poudre sèche	Rendement de lyophilisation (%)

		<b>croissance cellulaire</b>	<b>croissance cellulaire</b>		
<i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i> - test A -	4,25 x 10 <sup>9</sup>	4,03 x 10 <sup>9</sup>	3,44 x 10 <sup>10</sup>	2,03 x 10 <sup>11</sup>	43,68
<i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i> - test B -	7,00 x 10 <sup>9</sup>	7,89 x 10 <sup>9</sup>	4,91 x 10 <sup>10</sup>	2,45 x 10 <sup>11</sup>	42,74
<i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i> - Témoin -	3,33 x 10 <sup>10</sup>	3,41 x 10 <sup>10</sup>	Non applicable	1,48 x 10 <sup>11</sup>	26,47
<i>Lb.</i> <i>helveticus</i>	8,73 x 10 <sup>9</sup>	5,89 x 10 <sup>9</sup>	1,39 x 10 <sup>10</sup>	1,54 x 10 <sup>10</sup>	8,67
<i>Lb.</i> <i>helveticus</i> -Témoin	1,81 x 10 <sup>10</sup>	1,14 x 10 <sup>10</sup>	Non applicable	3,94 x 10 <sup>7</sup>	0,017
<i>Lb.</i> <i>acidophilus</i>	1,14 x 10 <sup>9</sup>	1,19 x 10 <sup>9</sup>	2,14 x 10 <sup>9</sup>	1,91 x 10 <sup>9</sup>	5,35
<i>Lb.</i> <i>acidophilus</i> -Témoin	2,20 x 10 <sup>9</sup>	2,44 x 10 <sup>9</sup>	Non applicable	1,19 x 10 <sup>6</sup>	0,0024

<i>Lb.</i> <i>bulgaricus</i>	8,03 x 10 <sup>8</sup>	7,26 x 10 <sup>8</sup>	5,70 x 10 <sup>9</sup>	1,33 x 10 <sup>9</sup>	1,39
<i>Lb.</i> <i>bulgaricus</i> -Témoin	8,58 x 10 <sup>9</sup>	1,53 x 10 <sup>9</sup>	Non applicable	< 10 <sup>6</sup>	< 0,003

**Exemple 2: Culture de bactéries lactiques dans des microcapsules d'alginate avec fed-batch ou renouvellement de milieu.**

- [0087]** Dans les figures 3 et 4 et les tableaux de l'exemple 2, on entend par :
- Le renouvellement du milieu, le fait que dans les cultures de souches encapsulées ou enrobées dans les microcapsules, le milieu nutritionnel a été complètement renouvelé (c'est-à-dire remplacé et non ajouté au milieu présent pouvant comporter des contaminants ou présentant un pH apte(s) à retarder la croissance des souches présentes) après 18 heures et après 24 heures de culture,
- Un « fed-batch » est un renouvellement de la culture de souches encapsulées ou enrobées dans les microcapsules par du milieu frais concentré ajouté après 18 heures et après 24 heures de culture et dans les deux cas, le témoin est constitué par une culture classique des bactéries enrobées ou encapsulées dans des microcapsules.
- [0088]** Le tableau 1 représente l'effet d'une prolongation du temps de culture par addition de milieu frais ou renouvellement du milieu de culture sur la concentration cellulaire d'une souche (*L. casei*) encapsulée ou enrobée à l'intérieur de microcapsules d'alginate.

Tableau 1

5

Temps (h)	0	18	24	42
renouvellement du milieu	1,45E+09	3,39E+10	5,76E+10	6,24E+10
Fed-batch	1,45E+09	3,54E+10	5,32E+10	6,27E+10

**[0089]** On constate très nettement une augmentation de la concentration cellulaire présente dans les microcapsules d'alginate après le 1<sup>er</sup> ajout de milieu ou le 1<sup>er</sup> renouvellement de milieu après 18 heures de culture. Un second ajout ou renouvellement à 24 heures permet encore une amélioration, mais le gain est moins élevé. Le tableau 2 représente l'effet du renouvellement du milieu pendant la culture de 42 heures de la souche (*L. casei*) encapsulée ou enrobée sur la concentration cellulaire de la poudre lyophilisée par rapport à la concentration de la poudre obtenue après lyophilisation des microcapsules de cette souche et mises en culture une nuit (environ 18 heures).

20

Tableau 2

Poudre lyophilisée	Concentration cellulaire
Témoin (culture de 18 h)	3,07E+11
renouvellement du milieu	4,35E+11

**[0090]** Le renouvellement du milieu de culture permet d'obtenir une poudre de microcapsules comprenant la souche

enrobée ou encapsulé lyophilisées avec une concentration cellulaire plus élevée (+ 42%). Des résultats similaires ont été obtenus avec les souches testées et revendiquées encapsulées ou enrobées dans les microcapsules d'alginate ou  
**5** dans un autre matériau polymérique de l'invention.

Bibliographie

- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). *Trends in Food Science & Technology*, 240-251.
- 5
- Burgain, J., & al. (2011). *Journal of Food Engineering* 104, 467-483.
- Champagne, C. P., & Kailasapathy, K. (2008). *Delivery and*  
10 *controlled release of bioactives in foods and*  
*nutraceuticals : 14. Encapsulation of probiotics.*
- LI & al (2009). *Journal of Microencapsulation*, 26(4), 315-324.
- 15 Morgan & al. (2006). *Journal of Microbiological Methods* 66, 183-193.
- Sweta Rathore, P. M. et al. (2013). *Journal of Food*  
*Engineering*, Volume 116, Issue 2, May 2013, Pages 369-  
20 381).

**REVENDICATIONS**

1. Procédé d'enrobage de microorganismes comprenant les étapes suivantes :

- éventuellement une première étape de culture (1) desdits microorganismes suivie éventuellement d'une étape de collecte (2) desdits microorganismes,
- une étape d'enrobage (3) desdits microorganismes dans des capsules polymériques,
- une seconde étape de culture et de multiplication (4) desdits microorganismes encapsulés dans une solution nutritive pendant une durée comprise entre 2 heures et 7 jours,
- une étape de collecte (5) des microorganismes multipliés et encapsulés et
- une étape de séchage (6) par lyophilisation des microorganismes multipliés et encapsulés pour former une poudre de microorganismes encapsulés.

2. Le procédé selon la revendication 1, dans lequel la seconde étape de culture et de multiplication (4) des microorganismes encapsulés s'effectue pendant une durée supérieure à 24 heures.

3. Le procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, dans lequel on effectue une seconde étape de culture et de multiplication des microorganismes encapsulés pendant une durée comprise entre 2 heures et 7 jour, soit après une adjonction d'une seconde solution nutritive ou soit après un remplacement de la première solution nutritive par une seconde solution nutritive.

4. Le procédé selon l'un quelconque des revendications précédentes 1 à 3, qui comprend une coulée goutte à goutte en écoulement laminaire.

5. Le procédé selon la revendication 4, comprenant une étape d'extrusion à une vitesse d'écoulement

d'un liquide d'enrobage comprise entre 0,2 m/s et 5 m/s traversant une buse orientée dans une direction essentiellement axiale ou latérale par rapport à l'écoulement et générant des gouttelettes selon une coulée  
5 goutte à goutte en écoulement laminaire pour recueillir une poudre de microcapsules comprenant les microorganismes.

6. Le procédé selon la revendication 5, dans lequel deux liquides d'enrobage sont extrudés en écoulement laminaire avec un système à deux buses et comprenant une  
10 buse intérieure et une buse extérieure.

7. Le procédé selon la revendication 5 ou la revendication 6, dans lequel la buse est vibrante avec une fréquence de vibration comprise entre 1 Hz et 20.000Hz et une amplitude supérieure à 5,5 µm.

8. Le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les microorganismes sont des microorganismes probiotiques.

9. Le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les microorganismes sont choisis parmi les bactéries et les champignons, en  
20 particulier les levures.

10. Le procédé selon la revendication 9 dans lequel les bactéries sont choisies parmi le groupe constitué par les bactéries lactiques ou les bifidobactéries.

11. Le procédé selon la revendication 10, dans lequel les bactéries lactiques sont choisies parmi le groupe constitué par *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, en particulier *Lactobacillus casei subsp. Casei* ou *Lactobacillus casei Shirota*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, en particulier *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* ou *Lactobacillus delbrueckii*  
25  
30

*subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosaceus*,  
**5** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus halophilus*, *Streptococcus thermophilus* ou leur  
**10** mélange.

**12.** Le procédé selon la revendication 10 dans lequel les bifidobactéries sont choisies parmi le groupe constitué par *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium angulatum*,  
**15** *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum* ou leur mélange.

**13.** Le procédé selon la revendication 9,  
**20** dans lequel le microorganisme est choisi parmi le groupe constitué par *Micrococcus varians*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus* var. *toyoi*, *Bacillus pumilus*,  
**25** *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli* souche nissle, *Paenibacillus alvei*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Escherichia coli* souche nissle, *Propionibacterium freudenreichii* et les levures, de préférence *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Yarrowia lipolytica*,  
**30** *Brettanomyces bruxellensis*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida albicans* et *Kluyveromyces marxianus* ou leur mélange.

**14.** Le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel le matériau

polymérique enrobant des capsules polymériques est un hydro-colloïde.

**15.** Le procédé selon la revendication 14, dans lequel l'hydro-colloïde est choisi parmi le groupe constitué par l'alginate, l'agar, les carraghénanes, de préférence le  $\kappa$ -carraghénane, l'amidon, le chitosane, l'alginate, la pectine, le pullulane, la gélatine, les gommes, en particulier la gomme gellane ou la gomme xanthane, l'acétophthalate de cellulose, la gélatine, les protéines du lait, en particulier la caséine ou un mélange d'entre eux, de préférence de l'alginate ou un mélange contenant de l'alginate et d'autres éléments connus pour améliorer cet enrobage, en particulier des maltodextrines, de la cellulose, de l'hemicellulose, de l'ethylcellulose, de la carboxycellulose et leur mélange, de préférence des maltodextrines.

**16.** Le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel la solution nutritive des microorganismes encapsulés comprend des acides aminés, des saccharides, des minéraux et éventuellement des acides et/ou des vitamines.

**17.** Poudre de microorganismes, de préférence probiotiques, incorporées dans des microcapsules polymériques et obtenue de préférence par le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes.

**18.** La poudre selon la revendication 17, dans laquelle le microorganisme est *Lactobacillus rhamnosus* et comprenant une concentration en *Lactobacillus rhamnosus* par microcapsule supérieure à  $1,5 \times 10^{11}$  (cfu/g), de préférence supérieure à  $2 \times 10^{11}$  (cfu/g).

**19.** La poudre selon la revendication 17, dans laquelle le microorganisme est choisi parmi le groupe constitué par *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus bulgaricus* et comprenant une

concentration en microorganismes par microcapsule supérieure à  $1 \times 10^9$  (cfu/g), de préférence comprise entre  $1 \times 10^9$  (cfu/g) et  $2 \times 10^{11}$  (cfu/g).

**20.** Composition pharmaceutique comprenant un diluant ou véhicule pharmaceutique adéquat et la poudre selon l'une quelconque des revendications précédentes 17 à 19.

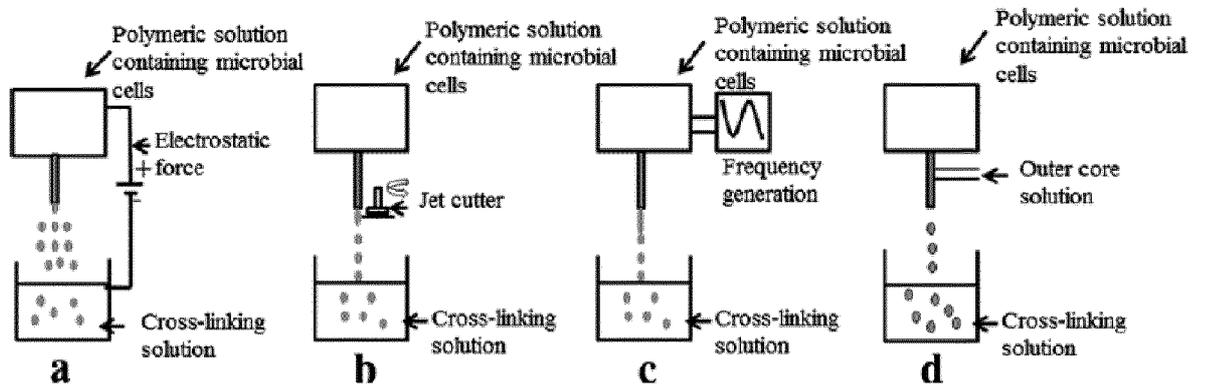
**21.** Composition alimentaire comprenant un diluant ou un véhicule alimentaire adéquat et la poudre selon l'une quelconque des revendications précédentes 17 à 19.

**22.** Composition nutraceutique comprenant un diluant ou un véhicule adéquat et la poudre selon l'une quelconque des revendications précédentes 17 à 19.

**23.** Composition sanitaire, en particulier destinée à l'épuration des déchets présents dans des canalisations ou fosses septiques et comprenant la poudre selon l'une quelconque des revendications précédentes 17 à 19.

20

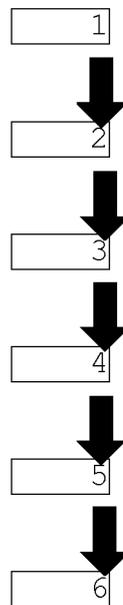
**Fig. 1**

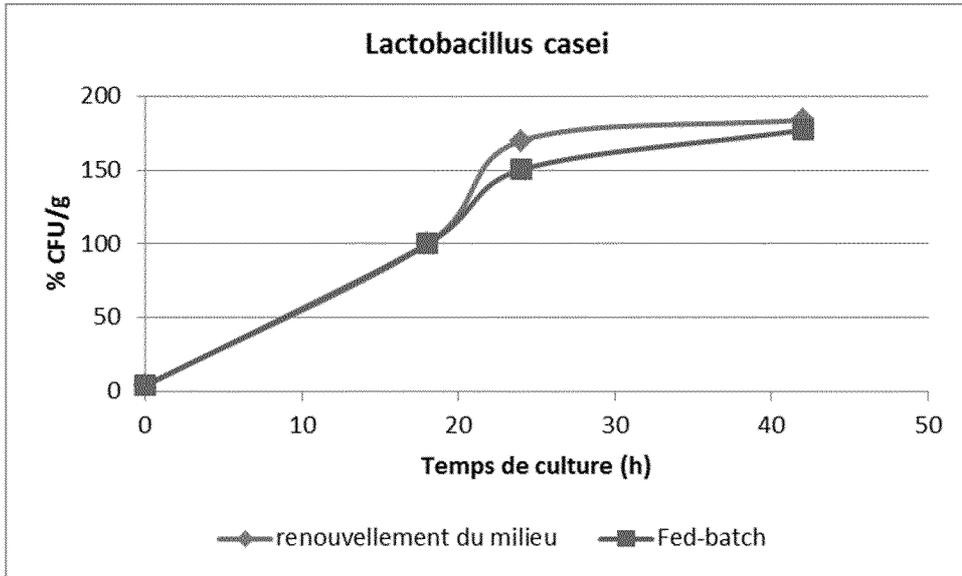


LEGENDE Fig. 1

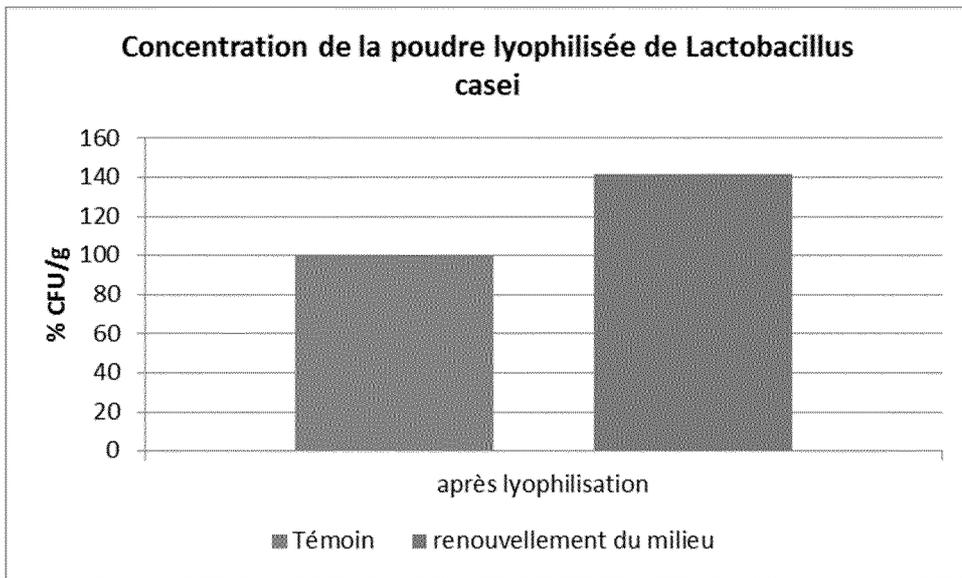
Polymeric solution containing microbial cells	Solution polymérique contenant les cellules microbiennes
Electrostatic force	Force électrostatique
Jet cutter	Jet d'eau
Frequency generation	Générateur de fréquence
Outer core solution	Solution de noyau externe
Cross-linking solution	Solution réticulée

**Fig. 2**





**Fig. 3**



**Fig. 4**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2017/060341

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 INV. C12N1/20 C12N11/04 A23L29/00 A61K35/00  
 ADD.  
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 C12N A61K A23L  
 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/000972 A1 (SG AUSTRIA PTE LTD [SG]; GUENZBURG WALTER H [SG]) 8 January 2015 (2015-01-08) cited in the application the whole document ----- -/--	1-23

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search <b>16 June 2017</b>	Date of mailing of the international search report <b>27/06/2017</b>
--	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  <b>Devijver, Kristof</b>
--	--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2017/060341

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DE PRISCO ANNACHIARA ET AL: "Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain Lactobacillus reuteri DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment", LWT- FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, vol. 61, no. 2, 6 December 2014 (2014-12-06), pages 452-462, XP029188668, ISSN: 0023-6438, DOI: 10.1016/J.LWT.2014.12.011 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	4-7
A	<p>TANVI SHINDE ET AL: "Co-extrusion Encapsulation of Probiotic Lactobacillus acidophilus Alone or Together with Apple Skin Polyphenols: An Aqueous and Value-Added Delivery System Using Alginate", FOOD AND BIOPROCESS TECHNOLOGY ; AN INTERNATIONAL JOURNAL, vol. 7, no. 6, 1 June 2014 (2014-06-01), pages 1581-1596, XP055382327, New York ISSN: 1935-5130, DOI: 10.1007/s11947-013-1129-1 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	4-7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/060341

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015000972	A1	08-01-2015	
		AU 2014286177 A1	18-02-2016
		CA 2917109 A1	08-01-2015
		CN 105517434 A	20-04-2016
		EP 3016511 A1	11-05-2016
		JP 2016524900 A	22-08-2016
		KR 20160033129 A	25-03-2016
		PH 12015502860 A1	28-03-2016
		SG 11201510671S A	28-01-2016
		US 2016298077 A1	13-10-2016
		WO 2015000972 A1	08-01-2015
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2017/060341

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N1/20 C12N11/04 A23L29/00 A61K35/00 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N A61K A23L		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2015/000972 A1 (SG AUSTRIA PTE LTD [SG]; GUENZBURG WALTER H [SG]) 8 janvier 2015 (2015-01-08) cité dans la demande le document en entier ----- -/--	1-23
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 16 juin 2017		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 27/06/2017
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Devijver, Kristof

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DE PRISCO ANNACHIARA ET AL:                      "Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain Lactobacillus reuteri DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment",                      LWT- FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY,                      vol. 61, no. 2,                      6 décembre 2014 (2014-12-06), pages 452-462, XP029188668,                      ISSN: 0023-6438, DOI: 10.1016/J.LWT.2014.12.011                      le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	4-7
A	<p>TANVI SHINDE ET AL: "Co-extrusion Encapsulation of Probiotic Lactobacillus acidophilus Alone or Together with Apple Skin Polyphenols: An Aqueous and Value-Added Delivery System Using Alginate",                      FOOD AND BIOPROCESS TECHNOLOGY ; AN INTERNATIONAL JOURNAL,                      vol. 7, no. 6, 1 juin 2014 (2014-06-01), pages 1581-1596, XP055382327,                      New York                      ISSN: 1935-5130, DOI: 10.1007/s11947-013-1129-1                      le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	4-7

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2017/060341

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2015000972 A1	08-01-2015	AU 2014286177 A1	18-02-2016
		CA 2917109 A1	08-01-2015
		CN 105517434 A	20-04-2016
		EP 3016511 A1	11-05-2016
		JP 2016524900 A	22-08-2016
		KR 20160033129 A	25-03-2016
		PH 12015502860 A1	28-03-2016
		SG 11201510671S A	28-01-2016
		US 2016298077 A1	13-10-2016
		WO 2015000972 A1	08-01-2015
-----			