HAL open science

Développement de formulations alimentaires diététiques adaptées aux intolérants au lactose et présentant une meilleure digestibilité

Magda Corgneau

To cite this version:

Magda Corgneau. Développement de formulations alimentaires diététiques adaptées aux intolérants au lactose et présentant une meilleure digestibilité. Biotechnologies. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0217 . tel-02303723

HAL Id: tel-02303723

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02303723v1

Submitted on 2 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Par Magda CORGNEAU

Développement de formulations alimentaires diététiques adaptées aux intolérants au lactose et présentant une meilleure digestibilité

École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA)

École Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio)

Soutenance prévue le 13 décembre 2016

Devant le jury d'examen composé de :

Bernard Cuq	Professeur, Montpellier SupAgro	Rapporteur
Véronique Delcenserie	Professeur, Université de Liège	Rapporteur
Denis Poncelet	Professeur, ONIRIS Nantes	Examinateur
Joël Scher	Professeur, Université de Lorraine	Directeur de thèse
Claire Gaiani	Professeur, Université de Lorraine	Co-directrice de thèse
Léa Pertusa	Directrice R&D, Laboratoires SVM	Examinatrice
Jean-Marie Blanchet	Directeur, Laboratoires SVM	Invité

Avant-propos

Ce projet a été réalisé au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules dans le cadre d'un partenariat industriel avec la société Labo3A. Je remercie donc en premier lieu Monsieur Blanchet, qui m'a fait pleinement confiance en finançant ce projet. Un grand merci aussi à Léa et Lam pour nos discussions scientifiques régulières qui m'ont permis de mener à bien ce projet.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Joël Scher, qui a accepté de diriger ce travail et pour toute la confiance qu'il m'a accordée. Merci d'avoir pris le temps de démêler les soucis administratifs, même quand cela ressemblait à des causes perdues.

Un grand merci à Claire Gaiani, ma co-directrice de thèse, sans qui ce projet n'aurait pu voir le jour. Merci de t'être toujours rendue très disponible, même à plus de 16000 km, pour répondre à mes questions, orienter ce travail et corriger mes nombreux rapports d'avancement. Merci aussi pour ta bonne humeur quotidienne et ta réactivité, ce fut un vrai plaisir et une chance d'avoir pu travailler dans ces conditions.

Je remercie également Monsieur Cuq, Madame Delcenserie et Monsieur Poncelet qui ont accepté d'évaluer ce travail.

Merci beaucoup à Jeremy et son légendaire « œil de lynx » pour avoir pris le temps de relire ce manuscrit en détails. Merci aussi pour ton soutien moral lorsque l'HPLC était à l'agonie et pour avoir sorti tes bottes et tes talents de « Fred et Jamy » pour le calcul du débit d'air du Glatt.

Merci à Sylvie pour son aide sur la partie enzymologie de ce travail.

Un grand merci à tous les membres du LIBio qui m'ont permis de passer 3 années mémorables. Merci notamment à Carole, Carole, Myriam, Sylvie, Blandine et Aurélie qui se sont toujours montrées très disponibles et qui permettent au laboratoire de fonctionner. Un grand merci à Cédric, le roi de l'HPLC. Merci à Florentin et Jordane pour leur bonne humeur. Un merci tout particulier à Cécile, pour nos discussions régulières.

Je remercie également Clémence et Charlène qui ont aussi contribué à ces travaux.

J'ai aussi une pensée amicale pour mes collègues thésards d'hier et d'aujourd'hui : Citlalli, Ghazi, Mouna, Mahmoud, Adrien, Hassan, PH... Un merci tout particulier à Yoana, Marie-Céleste et Aya, pour les bons moments passés au bureau. Un grand merci à Justine, Jenny et Charlotte pour

nos rigolades, nos discussions, et leur soutien sans faille. Je n'oublierai pas tous les bons moments partagés avec vous trois.

Un grand merci aux copains d'Épinal pour les bons moments partagés durant les week-ends. Je pense notamment à Pierre-Marrant, Lise, Stéphane et Mathilde.

Merci aussi à Stéven, Nathalie et Ewen pour les agréables moments partagés.

Merci Agnès et Roland pour votre soutien et pour m'avoir fait profiter du soleil Montilien et de la plancha durant la dernière ligne droite de la rédaction.

Un grand merci à mes parents pour leur soutien sans faille, leur amour et leur bienveillance. C'est avec un immense plaisir que je vous dédie ce travail.

Enfin, Merci à Matthieu de partager ma vie. Merci pour ton amour et ton soutien, je sais que ça n'a pas été facile tous les jours. C'est pour cela que je te dédie, à toi aussi, ce travail.

Sommaire

Liste des figures 1

Liste des tableaux 7

Liste des équations 9

Liste des abréviations 11

Introduction générale 15

1. Contexte du projet 15

2. Problématique industrielle 17

3. Objectifs du projet et structure du manuscrit 19

Chapitre 1 : Matériel et méthodes 21

1. Caractéristiques et préparation de la formulation industrielle 23

1.1. Caractéristiques de la formulation industrielle 24

1.2. Étapes de réhydratation et de refroidissement 26

1.3. Traitement thermique en four à micro-ondes 26

1.4. Digestion 29

2. Caractérisation physico-chimique des échantillons 31

2.1. Caractérisation chimique des échantillons 32

2.2. Caractérisation physique des échantillons 36

3. Méthodes propres à l'étude des β-galactosidases 39

3.1. Matériel 40

3.2. Mesure directe et indirecte de l'activité enzymatique 40

3.3. Caractérisation enzymatique 44

3.4. Étude de l'hydrolyse du lactose durant l'étape de réhydratation et de refroidissement 47

3.5. Étude de l'influence d'un traitement thermique en four à micro-ondes sur l'activité de l'enzyme 48

3.6. Étude de l'hydrolyse du lactose durant la digestion gastro-intestinale 49

3.7. Enrobage de l'enzyme AO en lit fluidisé 53

4. Méthodes propres à l'étude des préparations amylacées 56

4.1. Matériel 57

4.2. Caractérisation rhéologique et thermique 57

4.3. Digestibilité *in vitro* 58

5. Méthodes propres à l'étude des préparations protéiques 61

5.1. Matériel 62

5.2. Évaluation de la qualité des préparations protéiques 62

5.3. Suivi de la digestion des préparations protéiques 63

6. Traitements statistiques 66

Chapitre 2 : Développement d'une formulation adaptée aux intolérants au lactose 67

1. Digestion du lactose : étude bibliographique 69

1.1. Le lactose 70

1.2. L'intolérance au lactose 72

1.3. Seuil de tolérance et sévérité de l'intolérance au lactose 79

1.4. Les solutions apportées 84

1.5. Conclusion 91

2. Étude de β-galactosidases 93

2.1. Les β-galactosidases : étude bibliographique 94

2.2. Résultats et discussion 102

2.3. Conclusion 122

3. Protection des β-galactosidases par encapsulation 125

3.1. Protection des β-galactosidases : étude bibliographique 126

3.2. Résultats et discussion 161

3.3. Conclusion 173

4. Conclusion du chapitre 175

Chapitre 3 : Amélioration de la digestibilité d'une formulation alimentaire 177

1. Sélection d'une source d'amidon adaptée aux produits 179

1.1. Digestion de l'amidon : étude bibliographique..... 180

1.2. Résultats et discussion 198

1.3. Conclusion..... 218

2. Sélection d'une source de protéine adaptée aux produits..... 220

2.1. Digestion des protéines : étude bibliographique..... 221

2.2. Résultats et discussion 244

2.3. Conclusion..... 258

3. Conclusion du chapitre 260

Conclusion générale et perspectives 261

Références 267

Résumé 303

Liste des figures

Figure 1 : Différents produits obtenus selon leur mode de préparation 25
Figure 2 : Représentation schématique d'un magnétron, adapté de Dean (2012) 27
Figure 3 : Différents cycles de traitement thermique étudiés 28
Figure 4 : Variation des paramètres de sphéricité et de convexité en fonction de la véritable morphologie des particules 37
Figure 5 : Principe de la chromatographie HILIC, adapté de Buszewski et Noga (2012) 43
Figure 6 : Vitesse de vidange gastrique de 395 ml de lait apportant 169 kcal 52
Figure 7 : Photographie du rhéomètre FT4 (gauche), principe de mesure de l'énergie de mélange du lit de poudre (milieu) et principe de mesure du programme « aération » (droite) 53
Figure 8 : Schéma du lit fluidisé Mini-Glatt, adapté de Chen *et al.* (2009) 54
Figure 9 : Structure du lactose 70
Figure 10 : Mécanisme permettant l'obtention de la LPH intestinale, adapté de Ouwendijk (1998) 72
Figure 11 : Différents types de déficits en lactase 73
Figure 12 : Répartition de la population intolérante au lactose à travers le monde, adapté de Grosvenor et Smolin (2009) 74
Figure 13 : Digestion du lactose en présence de LPH 76
Figure 14 : Digestion du lactose en absence de LPH 76
Figure 15 : Résultats du test à l'hydrogène selon le génotype du sujet, adapté de Matthews et al. (2005) 78
Figure 16 : Tolérance au lactose selon la quantité consommée et sa répartition sur la journée 81
Figure 17 : Objectif fixé pour le développement de formulations adaptées aux intolérants au lactose 91
Figure 18 : Structure de la β-galactosidase issue d'*Aspergillus Oryzae*, adapté de Maksimainen *et al.* (2013) 95
Figure 19 : Structure de la β-galactosidase issue de *Kluyveromyces Lactis*, adapté de Pereira-Rodríguez *et al.* (2012) 96
Figure 20 : Mécanisme d'hydrolyse du lactose par la β-galactosidase sécrétée par *Kluyveromyces Lactis*, adapté de Zhou et Chen (2001) 97
Figure 21 : Activité de certaines β-galactosidases commerciales en fonction du pH (données issues des fiches techniques des enzymes) 98

Figure 22 : Activité de certaines β-galactosidases commerciales en fonction de la température (données issues des fiches techniques des enzymes) 99
Figure 23 : Activité des enzymes KL et AO en fonction de la température et du pH, et comparaison aux conditions de vie du produit 101
Figure 24 : Activité des enzymes KL et AO en fonction de la température 102
Figure 25 : Activité des enzymes KL et AO en fonction du pH 103
Figure 26 : Activité de l'enzyme KL en fonction de la concentration en lactose 104
Figure 27 : Activité de l'enzyme AO en fonction de la concentration en lactose 105
Figure 28 : Cinétique d'hydrolyse du lactose en solution SMUF dans les conditions de l'étape de réhydratation 106
Figure 29 : Cinétique d'hydrolyse du lactose en solution SMUF dans les conditions de l'étape de refroidissement 108
Figure 30 : Cinétique d'hydrolyse du lactose dans le produit réhydraté dans les conditions de l'étape de refroidissement 109
Figure 31 : Évolution de la température au sein de l'échantillon selon le cycle de traitement thermique 111
Figure 32 : Activité enzymatique résiduelle selon les différents cycles de traitements thermiques en solution aqueuse ou tamponnée 112
Figure 33 : Activité enzymatique résiduelle selon les différents cycles de traitements thermiques en solution SMUF lactosée (48 $g.l^{-1}$) 113
Figure 34 : Activité enzymatique résiduelle selon les différents cycles de traitements thermiques dans du lait ½ écrémé 114
Figure 35 : Évolution de la température au sein d'un échantillon subissant un traitement thermique de 1 min 30 s à 750 W 115
Figure 36 : Cinétique d'hydrolyse du lactose en solution SMUF dans les conditions de température et de pH de l'étape de digestion gastrique 116
Figure 37 : Cinétique d'hydrolyse du lactose durant la digestion gastrique *in vitro* monocompartimentée 117
Figure 38 : Cinétique d'hydrolyse du lactose en solution SMUF dans les conditions de l'étape de digestion intestinale 119
Figure 39 : Cinétique d'hydrolyse du lactose durant la digestion intestinale *in vitro* monocompartimentée 120
Figure 40 : Cinétique d'hydrolyse du lactose durant la digestion gastrique et intestinale 121

Figure 41 : Bilan de l'incorporation des enzymes AO et KL aux différents produits et perspectives 123
Figure 42 : Exemple de matrices d'encapsulation ayant des structures différentes, adapté de McClements (2012) 129
Figure 43 : Différents mécanismes de libération d'un composé encapsulé, adapté de McClements (2012) 130
Figure 44 : Principe du procédé d'encapsulation par pulvérisation 132
Figure 45 : Différents types de particules encapsulantes 135
Figure 46 : Principe de la fluidisation 136
Figure 47 : Différents régimes de fluidisation, d'après Shakourzadeh (2002) 136
Figure 48 : Formation d'un enrobage 138
Figure 49 : Principe de l'enrobage en lit fluidisé « top spray » 138
Figure 50 : Principe de l'enrobage « tangential spray » 139
Figure 51 : Principe de l'enrobage « bottom spray » 140
Figure 52 : Comparaison des avantages et inconvénients des deux méthodes d'encapsulation utilisables à l'échelle industrielle 141
Figure 53 : Structure de la cellulose 143
Figure 54 : Structure des différents dérivés de la cellulose 145
Figure 55 : Structure de l'amylose et de l'amylopectine 145
Figure 56 : Structure des maltodextrines 146
Figure 57 : Structure des cyclodextrines 147
Figure 58 : Organisation possible des composants glucidiques de la gomme arabique, adapté de Williams et Phillips (2009) 148
Figure 59 : Structure des différents types de pectine, adapté de Nguyen *et al.* (2011) 149
Figure 60 : Structure de l'alginate de sodium, adapté de Tavassoli-Kafrani *et al.* (2016) 150
Figure 61 : Structure des différents types de carraghénanes, adapté de Abad *et al.* (2009) 151
Figure 62 : Structure du xanthane, adapté de Kool *et al.* (2014) 152
Figure 63 : Structure chimique de la gomme laque, adapté de Limmatvapirat *et al.* (2008) 153
Figure 64 : Structure de la gélatine, d'après Zaman et Beg (2015) 156
Figure 65 : Classification des particules selon le diagramme de Geldart (1973), d'après Shakourzadeh (2002) 161
Figure 66 : Répartition de taille (en volume) de l'enzyme AO 162
Figure 67 : Paramètres de fluidisation de l'enzyme AO 163

Figure 68 : Réactions de dégradation des aliments en fonction de leur a_w selon le graphique de Labuza *et al.*, 1972, d'après Faiveley (2012) ..... **Erreur ! Signet non défini.**
Figure 69 : Photographies de MEB des particules obtenues après enrobage (grossissement x 400) 165
Figure 70 : Distribution granulométrique (en volume) des différentes particules obtenues par enrobage 166
Figure 71 : Efficacité de l'enrobage de l'enzyme AO vis-à-vis des différents traitements thermiques 168
Figure 72 : Cinétique d'hydrolyse du lactose, par l'enzyme AO enrobée avec de la zéine (40 %) et traitée thermiquement, en solution SMUF dans les conditions de l'étape de digestion gastrique 170
Figure 73 : Cinétique d'hydrolyse du lactose par l'enzyme AO enrobée avec de la zéine (40 %) et traitée thermiquement durant la digestion gastrique *in vitro* monocompartimentée 171
Figure 74 : Bilan de l'encapsulation de l'enzyme AO et de son incorporation dans les produits 3 et 4 174
Figure 75 : Bilan de l'incorporation des enzymes AO et KL dans les 4 types de produits industriels 176
Figure 76 : Aspect microscopique d'un amidon de manioc (MEB grossissement x 280), d'après Boursier (2005) 180
Figure 77 : Structure de l'amylose, d'après Liu (2005) 181
Figure 78 : Structure de l'amylose, d'après Liu (2005) 181
Figure 79 : Structure semi-cristalline d'un granule d'amidon, adapté de Boursier (2005) 182
Figure 80 : Devenir intestinal d'un amidon non résistant 185
Figure 81 : Devenir digestif d'un amidon résistant 186
Figure 82 : Réticulation d'un granule d'amidon, adapté de Boursier (2005) 192
Figure 83 : Greffage de groupements acétate, phosphate ou hydroxypropyle sur un granule d'amidon, adapté de Boursier (2005) 192
Figure 84 : Greffage de groupements hydrophobes sur un granule d'amidon, adapté de Boursier (2005) 193
Figure 85 : Répartition de taille (en volume) des granules d'amidon 201
Figure 86 : Sphéricité des granules d'amidon en fonction de leur taille 202
Figure 87 : Convexité des granules d'amidon en fonction de leur taille 202
Figure 88 : MEB des granules d'amidon (grossissement x 1000) 203

Figure 89 : Observation par MEB des granules d'amidon (grossissement x 10000) 204
Figure 90 : Digestibilité *in vitro* des différentes sources d'amidon à l'état natif 205
Figure 91 : Paramètres rhéologiques obtenus pour l'amidon de blé 210
Figure 92 : Thermogramme obtenu par calorimétrie différentielle à balayage pour l'amidon de pomme de terre 211
Figure 93 : Évolution de la température au cœur du produit (250 ml) durant un traitement de 2 min à 800 W 213
Figure 94 : Digestibilité *in vitro* des différentes sources d'amidon après traitement thermique.. 214
Figure 95 : Digestibilité *in vitro* des différentes sources d'amidon après traitement thermique et refroidissement 217
Figure 96 : Bilan de la sélection d'une source d'amidon particulièrement digestible..... 219
Figure 97 : Structure d'un acide L-α-aminé 221
Figure 98 : Structure des acides aminés préférentiellement clivés par la pepsine 222
Figure 99 : Structure des acides aminés préférentiellement clivés par la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase 225
Figure 100 : Schéma bilan de la digestion et de l'absorption des protéines chez l'homme 231
Figure 101 : Schéma simplifié de la réaction de Maillard, adapté de Wautier *et al.* (2014) 237
Figure 102 : Comparaison de la digestibilité des préparations protéiques..... 245
Figure 103 : Influence du traitement thermique « type » sur la digestibilité des préparations protéiques..... 248
Figure 104 : Influence de la présence de lactose pendant un traitement thermique sur la digestibilité des préparations protéiques..... 249
Figure 105 : Influence de l'ajout de bromélaïne sur la digestibilité des isolats protéiques 250
Figure 106 : Électrophorégramme SDS-PAGE des préparations protéiques..... 254
Figure 107 : Suivi de la libération des acides aminés des préparations protéiques durant la digestion gastrique et intestinale 255
Figure 108 : Bilan de l'évaluation de la qualité et de la digestibilité des préparations protéiques259

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition en macro- et micronutriments de la formulation sèche de référence 24
Tableau 2 : Composition en macro- et micronutriments de la formulation de référence après réhydratation 24
Tableau 3 : Composition des solutions salines gastriques et intestinales (modèle statique) 29
Tableau 4 : Composition de la solution SMUF selon Jenness et Koops (1962) 45
Tableau 5 : Évolution du pH intra-gastrique chez l'Homme après absorption de lait ½ écrémé d'après Minekus *et al.* (1995) 49
Tableau 6 : Composition des solutions salines gastriques et intestinales (modèle dynamique) 52
Tableau 7 : Composition des matrices d'enrobage 55
Tableau 8 : Contenu en lactose de certains produits alimentaires courants 82
Tableau 9 : Études menées visant à évaluer l'efficacité de préparations enzymatiques utilisées dans du lait au moment du repas 84
Tableau 10 : Études menées visant à évaluer l'efficacité de préparations enzymatiques utilisées comme compléments alimentaires 85
Tableau 11 : Sources de β-galactosidase hydrolysant le lactose, d'après Mahoney (2002) 94
Tableau 12 : Propriétés catalytiques des β-galactosidases commerciales 97
Tableau 13 : Paramètres cinétiques des enzymes AO et KL 104
Tableau 14 : Concentration en lactose du produit réhydraté avant et après action des enzymes KL et AO (13000 NLU ou ALU) 107
Tableau 15 : Lien entre l'activité enzymatique et la teneur en lactose du produit réhydraté après 3 min de réhydratation 107
Tableau 16 : Propriétés diélectriques de produits laitiers à une fréquence de 2450 MHz, d'après Kudra *et al.* (1992) 110
Tableau 17 : Bilan des propriétés des différentes matrices utilisables 159
Tableau 18 : Teneur en eau et activité de l'eau des poudres obtenues par enrobage 164
Tableau 19 : Activité résiduelle des préparations enzymatiques après enrobage 167
Tableau 20 : Composition chimique des différents types d'amidon 198
Tableau 21 : Teneur en amylose et en amylopectine des différents amidons 199
Tableau 22 : Teneur en amidon résistant des différents amidons 200
Tableau 23 : Température de gélatinisation des amidons déterminée par rhéologie 211

Tableau 24 : Propriétés thermiques des amidons déterminées par calorimétrie différentielle à balayage 212
Tableau 25 : Systèmes de transport des acides aminés au niveau du domaine apical de la cellule épithéliale, adapté de Ganapathy (2012) 227
Tableau 26 : Valeurs illustrant la digestibilité de protéines chez l'homme, d'après Bhutta et Sadiq (2013) 232
Tableau 27 : Teneur en inhibiteurs de la trypsine de différents produits, d'après Gilani et *al*. (2012) 233
Tableau 28 : Teneur en tanins de différents produits, d'après Gilani *et al.* (2012) 234
Tableau 29 : Teneur en acide phytique de différents produits, d'après Gilani *et al.* (2012) 235
Tableau 30 : Teneur en lysinoalanine de produits alimentaires communs, d'après Gilani *et al.* (2012) 239
Tableau 31 : Composition des protéines de référence, d'après la FAO (2013) 241
Tableau 32 : Composition chimique des différents isolats protéiques 244
Tableau 33 : Aminogramme des différentes préparations protéiques (exprimé en $mg.g^{-1}$ de protéines) 251
Tableau 34 : Indice chimique des préparations protéiques 252
Tableau 35 : Score chimique corrigé de la digestibilité des préparations protéiques 252

Liste des équations

Équation 1 : Calcul de la teneur en eau 32
Équation 2 : Calcul de la teneur en cendres 33
Équation 3 : Calcul de la teneur en protéines 34
Équation 4 : Calcul de la teneur en lipides 34
Équation 5 : Calcul de la vitesse initiale de réaction 46
Équation 6 : Équation de la vidange gastrique, d'après Elashoff *et al.* (1982) 51
Équation 7 : Calcul de la part d'amidon rapidement digestible 60
Équation 8 : Calcul de la part d'amidon lentement digestible 60
Équation 9 : Calcul de la part d'amidon résistant 60
Équation 10 : Calcul de la digestibilité des protéines 63

Liste des abréviations

α-LA	α-lactalbumine
β-LG	β-lactoglobuline
AAE	Acide aminé essentiel
AGCC	Acides gras à chaîne courte
AGU	Amyloglucosidase
ALD	Amidon lentement digestible
ALU	Acid lactase unit (unité de lactase acide)
APLV	Allergie aux protéines de lait de vache
AR	Amidon résistant
ARD	Amidon rapidement digestible
CCK	Cholécystokinine
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance
CM	Caséines micellaires
CVL	Conviciline
δ	Angle de perte
DAAO	D-aminoacide oxydase
DE	Dextrose équivalent
DEDL	Détecteur évaporatif à diffusion de lumière
DIAAS	Digestible Indispensable Amino Acid Score
DP	Degré de polymérisation
ε’	Constante diélectrique
ε’’	Perte diélectrique
EC	Éthyl-cellulose
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EFSA	European Food Safety Authority (Autorité européenne de sécurité des aliments)
Enzyme AO	β-galactosidase sécrétée par la moisissure *Aspergillus oryzae*
Enzyme KL	β-galactosidase sécrétée par la levure *Kluyveromyces lactis*
FAO	Food and Agriculture Organization (Organisation des Nations Unies pour l’alimentation et l’agriculture)
FCC	Food Chemicals Codex
γ-VL	γ-viciline

G20	Glucose libéré au bout de 20 min
G120	Glucose libéré au bout de 120 min
G’	Module de conservation
G’’	Module de perte
GH	Glycoside-hydrolase
GIP	Gastric inhibitory peptide
GL	Glucose libre
GLP-1	Glucakon-like peptide-1
GRAS	Generally Recognized As Safe
GT	Glucose total
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography (Chromatographie liquide à interaction hydrophile)
HPMC	Hydroxypropyl-méthyl-cellulose
IG	Indice glycémique
K_i	Constante d’inhibition
K_m	Constante de Michaëlis
LAL	Lysinoalanine
LPH	Lactase-phlorizine hydrolase
LYS	Lysozyme
MC	Méthyl-cellulose
MEB	Microscopie électronique à balayage
NaCMC	Carboxyméthyl-cellulose sodique
NLU	Neutral lactase unit (unite de lactase neutre)
NOAEL	No-observed-adverse-effect-level (Dose maximale sans effet néfaste observable)
OM	Ovomucoïde
ONPG	Ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside
OV	Ovalbumine
OVT	Ovotransferrine
PRM	Produits de réaction de Maillard
PYY	Peptide YY
SCCD	Score chimique corrigé de la digestibilité
SII	Syndrome de l’intestin irritable
SSG	Solution saline gastrique

SSI	Solution saline intestinale
SMUF	Simulated milk ultra-filtrate
TAME	ρ-toluène-sulfonyl-L-arginine méthyl ester
TCA	Acide trichloroacétique
Thr	Thréonine
U	Unité
UHT	Upérisation à haute température
VL	Viciline

Introduction générale

1. Contexte du projet

La recherche en nutrition humaine a connu une fantastique évolution ces trente dernières années. La première moitié du 20ème siècle a principalement été consacrée à la mise en évidence des nutriments essentiels à l'homme. Bien que l'approche scientifique soit restée essentiellement descriptive, de nombreux mécanismes d'action ont tout de même été mis en évidence : le rôle de certaines vitamines dans des activités enzymatiques clés (Purr, 1933) ou encore celui des acides aminés dans la construction et la décroissance progressive de la masse musculaire (Beard et Barnes, 1931). Par la suite, les recherches se sont orientées vers le mécanisme étroit liant l'alimentation à la santé et au bien-être. Les outils disponibles pour percer ces mécanismes étant alors encore rudimentaires, les études se sont là encore contentées d'une approche descriptive pendant longtemps. Des corrélations entre le risque d'apparition de pathologies considérées comme maladies de civilisation et des modes d'alimentation ou types d'aliments ont tout de même pu être mises en évidence. C'est notamment le cas pour la relation entre affections cardiovasculaires et consommation en excès de matières grasses saturées (Gertler *et al.*, 1950) ou celle entre la consommation de fruits et légumes et la diminution du risque d'apparition de certains cancers (Stocks et Karn, 1933). Mais les données épidémiologiques utilisées pour établir ces corrélations n'étaient alors basées que sur des études d'observation, qui ne permettent pas le passage de corrélations à des preuves de liens directs entre les facteurs étudiés. En outre, jusqu'au milieu des années 80, les recherches ont principalement été orientées vers l'établissement de liens entre l'alimentation et les risques de développement de pathologies mais très rarement vers les aspects bénéfiques que peut engendrer l'alimentation sur notre santé.

Depuis une vingtaine d'années, l'approche de ces relations a profondément changé : les aliments et leurs constituants sont maintenant considérés comme des « modulateurs » pouvant influencer positivement et/ou négativement le risque d'apparition de certaines pathologies. La nutrition préventive décrit les modes alimentaires permettant de satisfaire tous les besoins nutritionnels, d'assurer le bon fonctionnement de l'organisme et de prévenir ou de retarder un très grand nombre de pathologies. Les régimes les plus efficaces en termes de bien-être et de santé sont associés à un apport élevé en produits végétaux et à une utilisation modérée d'ingrédients

raffinés et de produits d'origine animale riches en acides gras saturés. Du point de vue énergétique, la proportion de glucides, de protéines et de lipides devrait respectivement être de l'ordre de 55, 15 et 30 %. Actuellement, la majorité de la population française, à l'instar d'autres populations occidentales, présente un apport énergétique de 45 % en glucides, 15 % en protéines et 40 % en lipides. D'après les nutritionnistes, cette répartition calorique est révélatrice de typologies alimentaires peu équilibrées. Des mesures plus complexes sur l'apport spécifique de certains nutriments ou micronutriments indiquent également que, dans l'ensemble, le statut nutritionnel d'une part importante de la population n'est pas optimal (Rémésy, 2008). Pourtant, de plus en plus conscient du lien étroit liant l'alimentation à la santé et au bien-être, le consommateur tend depuis quelques années à modifier ses habitudes alimentaires. Cela se traduit en partie par un intérêt grandissant pour les aliments « santé », qui englobent notamment les aliments fonctionnels, les compléments alimentaires, ainsi que les produits diététiques (Villela, 2008).

Les produits diététiques sont des denrées alimentaires formulées pour répondre aux besoins nutritionnels particuliers de certaines catégories de la population dans des domaines tels que la minceur, le sport et le bien-être. Mais la formulation de tels produits se heurte encore au manque de connaissances quant à la biodisponibilité de certains macro- et micronutriments. À partir des années 1975, des études se sont intéressées au devenir des nutriments après ingestion. Haber *et al.* ont par exemple démontré en 1977 que la réponse glycémique après consommation de pommes sous forme entière, de compote ou de jus était d'autant plus rapide que la matrice alimentaire était déstructurée. Par la suite, d'autres études ont permis de confirmer qu'à composition égale en glucides, la nature de la matrice alimentaire influençait significativement la réponse métabolique et donc *in fine* l'effet santé (Granfeldt *et al.*, 1991; Read *et al.*, 1986). Il ne suffit donc plus de modifier la composition d'un aliment pour modifier son effet santé, il faut aussi tenir compte de sa structure physique et des propriétés physicochimiques de sa matrice. Ainsi, on sait aujourd'hui que tous les éléments constitutifs d'un aliment ne sont pas totalement biodisponibles (une fraction arrive donc au niveau du côlon) et que leur cinétique de libération peut influencer grandement l'effet santé global de l'aliment. Depuis peu, l'objectif est donc de contrôler les caractéristiques physicochimiques de la matrice alimentaire (degré de gélatinisation de l'amidon, degré de solubilisation des fibres incorporées…) au travers du choix des ingrédients et des procédés technologiques de façon à contrôler et optimiser son effet santé (Fardet *et al.*, 2013).

Parallèlement à cela, le domaine alimentaire est confronté depuis quelques dizaines d'années à une augmentation saisissante des cas d'allergies et d'intolérances alimentaires. Les

intolérances alimentaires, réactions non-immunologiques, reproductibles et spécifiques à un composé alimentaire, toucheraient entre 15 et 20 % de la population mondiale (Zopf *et al.*, 2009). La présence d'agents pharmacologiques (caféine, glutamates, salicylates, amines vasoactives…) dans de nombreux aliments en serait l'une des deux principales causes. Ces réactions chimiques n'entrainent pas inéluctablement de symptômes gastro-intestinaux, mais lorsque c'est le cas, ces derniers sont probablement influencés par le système neuroendocrine gastro-intestinal (Lomer, 2015). Les intolérances alimentaires s'expliquent cependant majoritairement par des déficits enzymatiques, généralement héréditaires. Un déficit en fructose-biphosphate aldolase, dû à un héritage autosomique récessif, entraine par exemple une accumulation du fructose-1-phosphate au niveau des cellules hépatiques. Cette accumulation agit comme un inhibiteur compétitif de la phosphorylation, entrainant une sévère hypoglycémie, voire des convulsions et un coma chez les enfants (Fedewa et Rao, 2013). En cas de déficit en lactase, qui touche environ 70 % de la population mondiale, le lactose alimentaire n'est plus hydrolysé au niveau intestinal et rejoint le côlon au niveau duquel il est fermenté par le microbiote commensal. Cela entraine des symptômes variables en fonction de l'activité résiduelle de la lactase, de la durée du transit gastro-intestinal et principalement de la quantité de lactose ingérée. Mais de sévères troubles digestifs sont observés chez certains sujets (Corgneau *et al.*, 2015). Pour faire face, de plus en plus de produits « sans » sont développés. En 2015, le marché des produits destinés à la population présentant une hypersensibilité alimentaire a progressé de 8 % et représente actuellement 197 millions d'euros au niveau mondial. Dans cet ensemble, les produits sans lactose sont surreprésentés, notamment à travers le lait qui pèse à lui seul 103 millions d'euros (Harel, 2016).

2. Problématique industrielle

Ce projet est financé par une société spécialisée dans la formulation et le façonnage de solutions nutritionnelles santé et bien-être sous forme sèche. Ces dernières sont destinées à l'alimentation courante, mais aussi à l'alimentation diététique en apportant des bénéfices nutritionnels spécifiques dans les domaines de la minceur, du sport et du bien-être. Ces produits, notamment conditionnés en boites cylindriques métalliques, sont formulés en macro- et micronutriments pour répondre aux besoins spécifiques de certaines catégories de la population. Ils sont généralement réhydratés à l'aide de lait par le consommateur au moment du repas.

Mais actuellement, 70 % de la population mondiale est concernée par la baisse génétiquement programmée de l'activité de la lactase à l'âge adulte. Dans l'intestin grêle, cette enzyme est responsable de l'hydrolyse du lactose (le principal glucide du lait) en galactose et glucose, qui sont ensuite absorbés. Mais chez les sujets présentant une baisse significative de l'activité de la lactase (appelés intolérants au lactose), le lactose rejoint le côlon au niveau duquel il est fermenté par le microbiote commensal. Cette fermentation entraine principalement la production d'AGCC et de gaz pouvant mener à de sévères troubles digestifs. Pour bon nombre de consommateurs, la richesse en lactose des formulations industrielles peut donc être un réel frein à leur consommation. Le développement d'une solution permettant d'enrayer ces troubles est donc primordial. Habituellement, les produits industriels sans lactose (lait, yaourt, crème fraiche…) sont obtenus par incubation d'une β-galactosidase dans des conditions de température et de pH précises. Après hydrolyse plus ou moins avancée du lactose, cette dernière est inactivée par traitement thermique. Dans le cas des formulations industrielles étudiées, le produit sec commercialisé ne contient pas de lactose, seul le lait apporté par le consommateur lors de la réhydratation en contient. C'est ce qui constitue le réel challenge de ce projet : le principal objectif consiste donc à formuler un produit sec répondant aux exigences de la grande majorité des intolérants au lactose après sa réhydratation à l'aide de lait ½ écrémé.

D'autre part, parmi les formulations industrielles distribuées, certaines remplacent l'intégralité de la ration journalière : pour le consommateur, elles sont donc l'unique vecteur de nutriments. Or, il a déjà été largement mis en évidence que la digestibilité des micro- et macronutriments d'un aliment n'était pas totale. Les glucides complexes (amidon) et les protéines de ces formulations industrielles, qui représentent respectivement environ 13 et 40 % de la totalité de la ration, ne font pas exception. Mais il existe tout de même une grande variabilité dans la digestibilité et donc, *in fine*, la biodisponibilité des différentes sources de protéines et d'amidon. Pour l'amidon, cela s'explique notamment par une variabilité de la composition chimique des granules d'amidon (ratio amylose/amylopectine, présence ou non de composés limitant l'accès des α-amylases salivaires…), ainsi que par une différence dans leur structure physique (compacité, taille, forme…). Pour les protéines, la différence de digestibilité s'explique principalement par la présence de facteurs antinutritionnels et par la structure de la protéine. Ainsi, le second objectif de ce projet consiste à mettre en évidence les sources d'amidon et de protéines idéales à la formulation des produits industriels.

3. Objectifs du projet et structure du manuscrit

Le premier chapitre de ce manuscrit s'attache à détailler le matériel et les méthodes utilisés tout au long de ce projet. Plus précisément, les caractéristiques de la formulation industrielle, ainsi que sa préparation, sont détaillées dans un premier temps. Les techniques de caractérisation physico-chimiques appliquées aux différents échantillons étudiés sont explicitées dans un second temps. Par la suite, les méthodes propres à l'étude respective des β-galactosidases, des préparations amylacées et des préparations protéiques sont détaillées.

Le **second chapitre** de ce manuscrit permet de répondre au principal objectif de ce projet : la formulation d'un produit répondant aux exigences de la population intolérante au lactose. La démarche suivie et les résultats obtenus sont par conséquent présentés.

Dans le **premier paragraphe** de ce chapitre, une étude bibliographique permettant de mieux cerner les causes et les manifestations de l'intolérance au lactose précède les travaux. Elle a notamment permis de mettre en évidence le seuil de tolérance au lactose de la majorité des sujets intolérants, ainsi que les différents moyens industriels actuellement employés pour lutter contre l'intolérance au lactose. Cela a permis, *in fine*, de sélectionner le plus adapté à notre produit, à savoir le recours à une β-galactosidase.

Dans un **second paragraphe**, une rapide étude bibliographique des caractéristiques des β-galactosidases commerciales a permis d'en sélectionner deux pour le reste de l'étude. Dans un second temps, les résultats de la caractérisation générale des β-galactosidases, ainsi que l'étude de leur activité durant la réhydratation du produit et le transit gastro-intestinal sont présentés dans la partie « Résultats ». Dans cette même partie, l'influence de différents traitements thermiques en four à micro-ondes sur l'activité des deux enzymes sont détaillés. Une conclusion intermédiaire clôt ce second paragraphe.

Les deux enzymes nécessitant une protection contre le traitement thermique voire le passage gastrique, un **troisième paragraphe** développe cet aspect. Dans un premier temps, une étude bibliographique a permis de mettre en évidence le procédé optimal et les matrices idéales pour répondre à la problématique. Dans un second temps, le résultat de la caractérisation des particules obtenues et de l'évaluation de leur protection est détaillé. Une brève conclusion referme ce troisième paragraphe.

Enfin, une conclusion générale permet de faire le bilan sur les formulations industrielles développées et d'ouvrir sur les perspectives de cette partie de l'étude.

Le second objectif de ce projet consistait à mettre en évidence les sources d'amidon et de protéines permettant une digestibilité idéale des différentes formulations industrielles. La démarche suivie et les résultats obtenus sont présentés dans le **troisième chapitre** de ce manuscrit.

Le **premier paragraphe** de ce troisième chapitre se propose d'exposer la démarche et les résultats ayant permis la sélection d'une source d'amidon adaptée aux différentes formulations. Dans un premier temps, une étude bibliographique permettant de cerner le processus de digestion de l'amidon et les facteurs le modulant est proposée. Par la suite, les résultats quant à la source d'amidon idéale pour la formulation des produits sans cuisson, de produits avec cuisson et de produit avec cuisson et refroidissement sont détaillés. Une conclusion permet de clore cette partie.

Le **second paragraphe** de ce chapitre est consacré à la sélection de la source protéique idéale et suit la même logique que le précédent paragraphe. Une étude bibliographique permettra de présenter le mécanisme de digestion des protéines chez l'homme et de mettre en évidence les facteurs la modulant. Dans un second temps, les résultats expérimentaux seront présentés et suivis d'une conclusion.

Une conclusion générale du chapitre permet de faire le bilan sur les sources d'amidon et de protéines sélectionnées.

Enfin, une **conclusion générale du projet et ses perspectives** clôtureront ce manuscrit.

Chapitre 1 : Matériel et méthodes

1. Caractéristiques et préparation de la formulation industrielle 23

2. Caractérisation physico-chimique des échantillons 31

3. Méthodes propres à l'étude des β-galactosidases 39

4. Méthodes propres à l'étude des préparations amylacées 56

5. Méthodes propres à l'étude des préparations protéiques 61

6. Traitements statistiques 66

1. Caractéristiques et préparation de la formulation industrielle

La société finançant ce projet commercialise de nombreuses formulations sèches qui présentent des compositions et des méthodes de préparation variées. Ce paragraphe se propose donc de détailler la composition en macro- et micronutriments de la formulation retenue pour cette étude, ainsi que ses quatre différents modes de préparation.

1.1. Caractéristiques de la formulation industrielle

Une multitude de formulations sèches sont proposées par la société finançant ce projet : elles diffèrent largement dans leur composition (macro- et micronutriments, arômes, texturants…), leur mode de préparation (durée, température de réhydratation…) et de cuisson (durée, paramètres, type de cuisson…). Cela permet l'obtention d'une grande diversité de produits présentant des caractéristiques physico-chimiques, gustatives et nutritionnelles très différentes. Pour faciliter la démarche expérimentale, une formulation sèche de référence, exempte de texturants, d'arômes et dont la composition en macro- et micronutriments est connue, sera utilisée tout au long de ce projet. Sa composition, donnée par l'industriel, figure en Tableau 1

Tableau 1 : Composition en macro- et micronutriments de la formulation sèche de référence

		Pour 100 g de poudre
Valeur énergétique	(kcal)	356
Protéines	(g)	38,8
Glucides	(g)	30,2
- dont sucres	(g)	5,0
Lipides	(g)	7,5
Fibres alimentaires	(g)	5,7
Vitamines	(g)	0,1
Minéraux	(g)	5,6

Cette formulation hypocalorique et hyperprotéinée sous forme de poudre (25 g) est par la suite réhydratée par le consommateur à l'aide de lait ½ écrémé (250 ml). La composition du produit ainsi obtenu est donnée en Tableau 2.

Tableau 2 : Composition en macro- et micronutriments de la formulation de référence après réhydratation

	g pour 25 g de poudre	g pour 250 ml de lait ½ écrémé	Par portion* (g)	Par portion* (%)
Protéines	9,7	9,8	19,5	40,5
Glucides	7,6	11,4	19,0	39,5
- dont sucres	1,3	11,4	12,8	26,6
Lipides	1,9	3,9	5,8	12
Fibres alimentaires	1,4	0,0	1,4	2,9
Vitamines	0,03	0,005	0,035	0,1
Minéraux	1,4	1,0	2,4	5

* Soit 250 ml de lait ½ écrémé et 25 g de formulation sèche

Après la réhydratation de la formulation et en fonction du type de produit attendu (boisson chaude, mousse, pancake, crêpe, soupe, muffin…), ce dernier peut ensuite subir des étapes de cuisson et/ou de refroidissement. Ainsi, les différents modes de préparation des produits permettent d'aboutir à quatre types de produits (Figure 1).

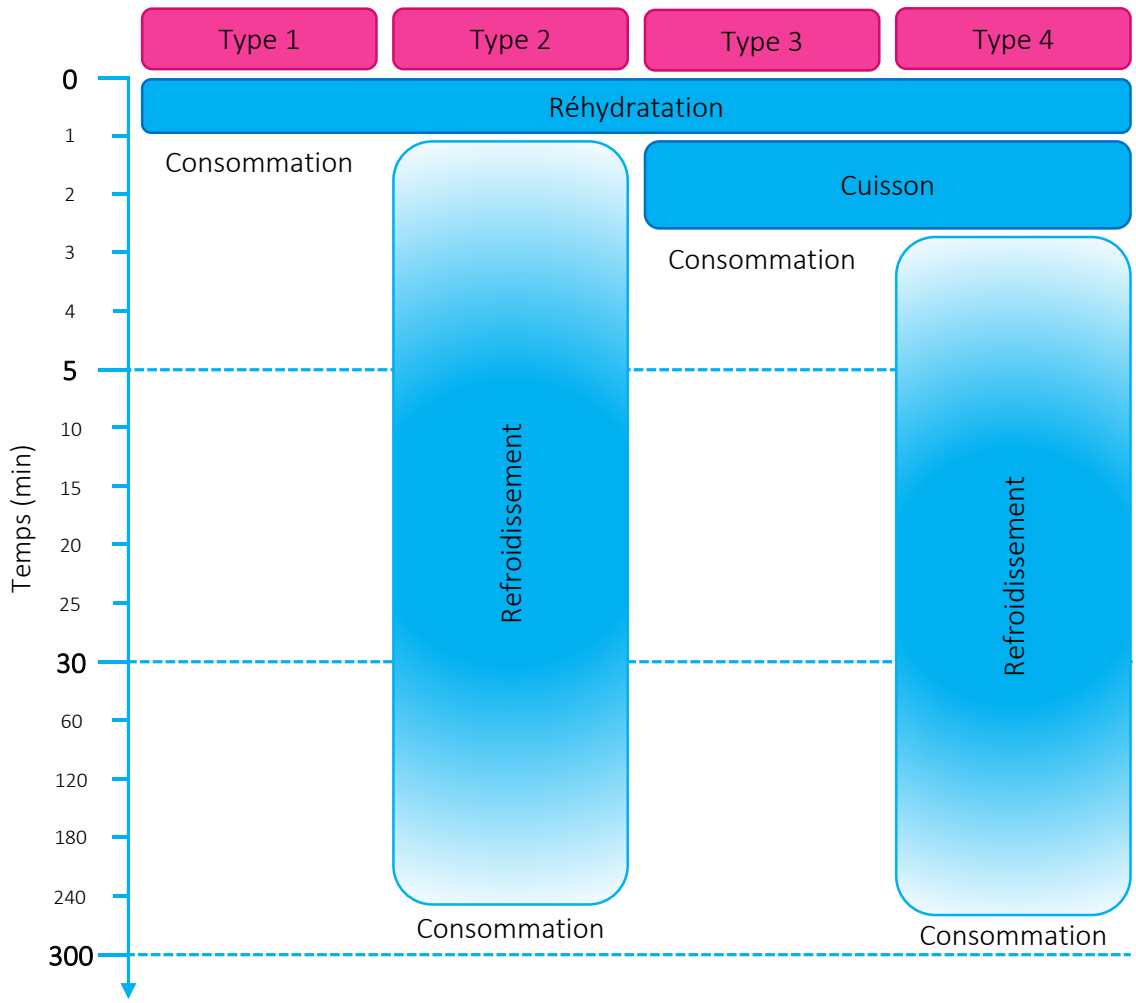


Figure 1 : Différents produits obtenus selon leur mode de préparation

D'après la Figure 1, après sa réhydratation, le produit de type 1 est directement consommé. Ce type de préparation permet par exemple l'obtention de milk-shakes, de mousse ou encore de boissons froides. Le produit de type 2 est quant à lui placé, après réhydratation, à une température réfrigérée pour une durée qui varie généralement de 30 à 240 min. Il est ensuite consommé. Ce type de préparation permet notamment l'obtention de mousses, de puddings ou encore de crèmes dessert. Le produit de type 3 subit quant à lui un traitement thermique après sa réhydratation. Il peut s'agir d'une cuisson à la poêle, au four traditionnel, mais plus généralement au four à micro-ondes. Après refroidissement à température de consommation (environ 50 °C), le produit est dégusté immédiatement. Ce type de préparation et de cuisson aboutissent à l'obtention de

produits très divers : crêpes, moelleux au chocolat, boissons chaudes, muffins, pancakes, soupes, veloutés… Enfin, le dernier type de produit est traité thermiquement après réhydratation puis refroidi à une température de 4 °C durant 30 à 240 min. Ce type de traitement permet l'obtention de flans, de riz au lait ou encore de crèmes brûlées.

1.2. Étapes de réhydratation et de refroidissement

Pour le consommateur, l'étape de réhydratation consiste à placer la poudre (25 g) dans un shaker et d'y ajouter 250 ml de lait ½ écrémé. Le shaker est ensuite agité manuellement, durant quelques secondes à température ambiante (20 °C environ). Le produit ainsi obtenu présente un pH de 7,0. La durée totale de cette étape (avant consommation) est raisonnablement comprise entre 30 s et 5 min. La durée moyenne est fixée à 3 min.

Le refroidissement du produit consiste à le placer, directement après réhydratation (produit de type 2) ou après réhydratation et traitement thermique (produit de type 4), à une température réfrigérée proche de 4 °C. La durée de cette étape est généralement comprise entre 30 et 240 min.

1.3. Traitement thermique en four à micro-ondes

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques ayant une fréquence comprise entre 300 MHz et 300 GHz. Pour éviter le risque d'interférence avec la radiocommunication et les radars, qui sont les principales utilisations des micro-ondes, les fréquences utilisables pour les fours à micro-ondes sont règlementées. La fréquence de 2450 MHz est principalement utilisée (Regier et Schubert, 2005). Les fours à micro-ondes, ménagers ou industriels, sont composés d'un générateur qui transforme l'énergie électrique en rayonnements micro-ondes. Le générateur le plus habituel est un magnétron, constitué d'un tube sous vide contenant deux électrodes entre lesquelles est appliquée une différence de potentiel élevée. Un aimant produit un champ magnétique continu et perpendiculaire au champ électrique appliqué par les deux électrodes. Contrairement à ceux utilisés en industrie, les magnétrons utilisés dans les fours ménagers ne permettent pas de faire varier la puissance émise. Les différents niveaux de puissance sont par conséquent obtenus en alternant des périodes à puissance maximale et à puissance nulle. Les magnétrons de 2450 MHz peuvent présenter une puissance comprise entre 600 et 6000 W. Un guide d'ondes assure ensuite le transfert de l'énergie micro-ondes du générateur vers l'enceinte d'application. Il s'agit d'un conduit métallique de section rectangulaire. L'enceinte d'application, aussi appelée applicateur, est

une cavité fermée qui assure le transfert de l'énergie micro-ondes vers le produit à traiter (Anizon *et al.*, 2003 ; Perino et Chemat, 2015 ; Regier et Schubert, 2005) (Figure 2).

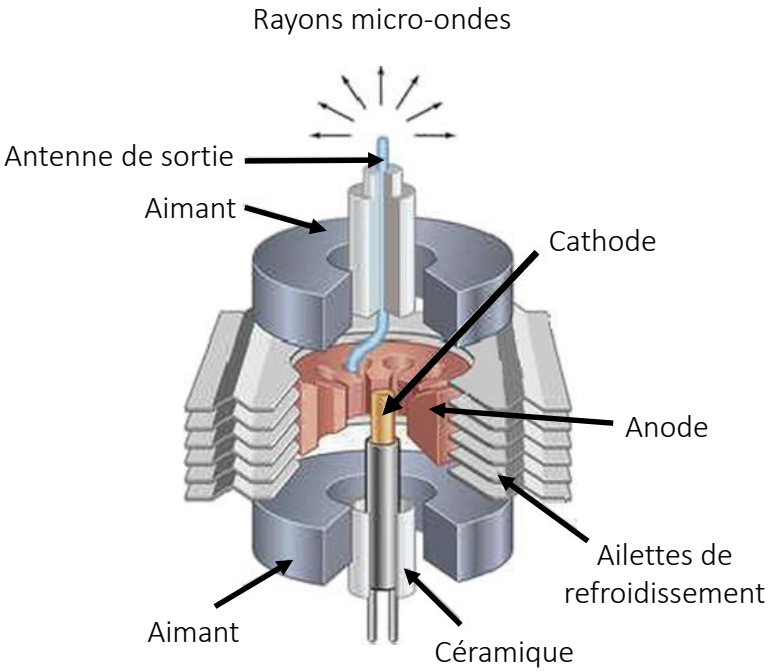


Figure 2 : Représentation schématique d'un magnétron, adapté de Dean (2012)

Le mécanisme du chauffage par micro-ondes repose sur le fait que les molécules polaires possèdent des extrémités négatives et positives (dipôles). En l'absence de champ électrique, les dipôles d'un milieu se trouvent orientés de façon aléatoire sous l'effet de l'agitation thermique du milieu. Sous l'action d'un champ électrique alternatif, l'orientation de chaque dipôle change à chaque alternance du champ électrique. Dans un champ micro-ondes, à fréquence élevée, l'énergie électrique est convertie en énergie cinétique par la rotation des dipôles. L'alignement des dipôles par rapport au champ électrique est contrarié par des liaisons hydrogène et des liaisons de van der Waals intermoléculaires. Ces forces, assimilées à des forces de frottement, s'opposent à la libre rotation des molécules et entrainent alors un dégagement de chaleur. La dissipation d'énergie par le produit peut être maximale si la fréquence du champ électrique est égale à la fréquence à laquelle apparaît un déphasage entre l'oscillation du champ électrique et celui des dipôles (phénomène de relaxation). Dans ce cas, une grande partie des molécules soumise à l'action du champ micro-ondes ne tourne pas avec le changement alternatif du champ, mais frissonne (Anizon *et al.*, 2003 ; Perino et Chemat, 2015 ; Tang, 2005).

L'équipement utilisé pour cette étude est un four micro-ondes de laboratoire Mars 6 (CEM Corporation, États-Unis) d'une fréquence de 2450 MHz. Il possède deux magnétrons séquentiels qui permettent de moduler la puissance émise en continu jusqu'à une valeur de 1800 W. Une sonde

de température infra-rouge permet quant à elle de suivre l'évolution de la température au cœur de l'échantillon durant le traitement. Le traitement de référence préconisé aux consommateurs est de 2 min à 800 W. Les fours ménagers ne fonctionnant qu'en « tout ou rien », 5 différents cycles de traitement thermique alternant entre une puissance de 0 W et de 800 W sont étudiés. Ainsi, des cycles présentant une émission de micro-ondes durant 20, 40, 60, 80 et 100 % du temps de traitement ont été étudiés.

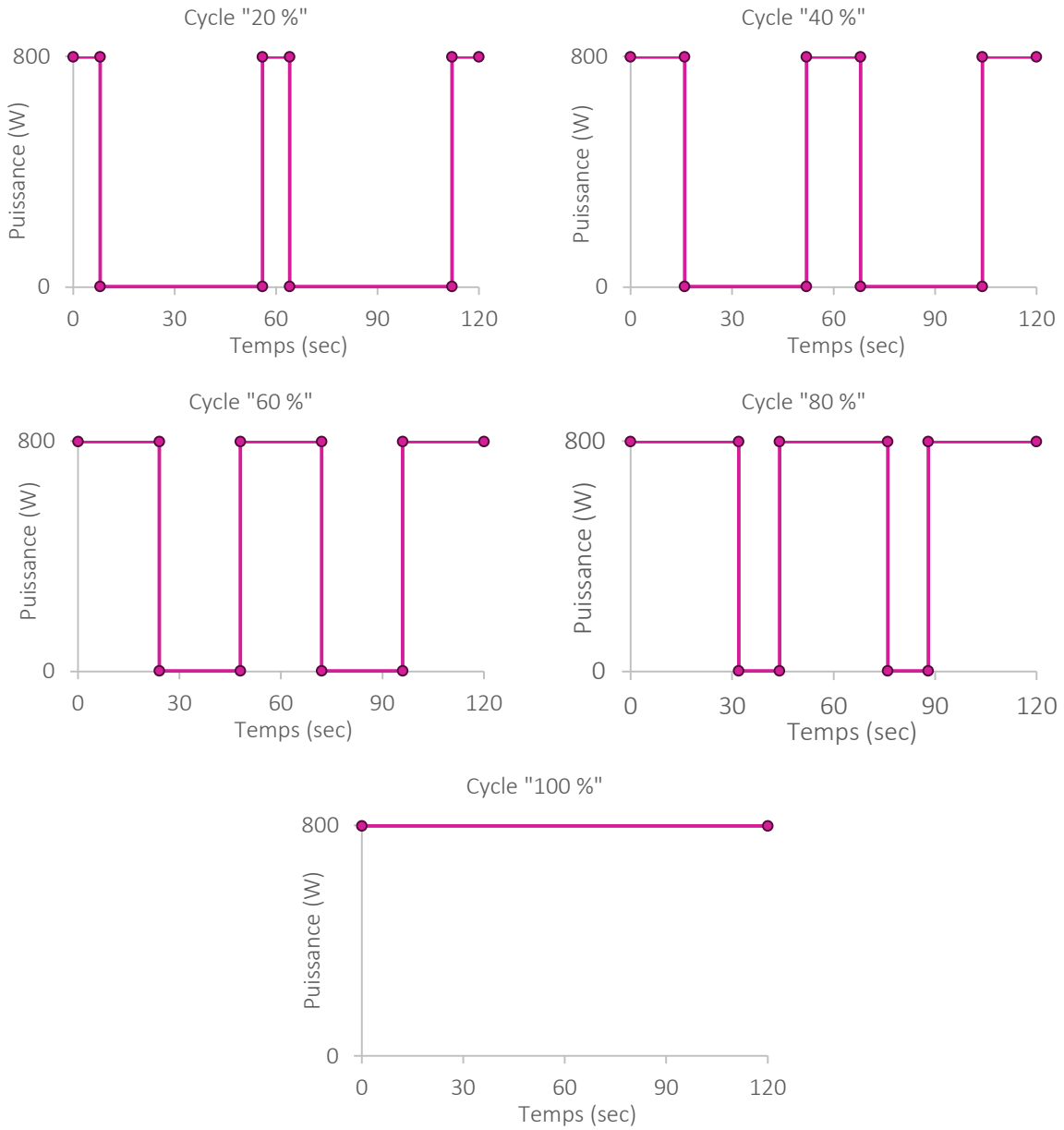


Figure 3 : Différents cycles de traitement thermique étudiés

L'alternance des cycles ON/OFF a été déterminée en sachant que le four de laboratoire permet de réaliser jusqu'à cinq étapes différentes durant un même traitement thermique. Les

détails sont donnés en Figure 3. Dans la suite du document, ces différents cycles de traitements thermiques seront abrégés en « 20 % », « 40 % », « 60 % », « 80 % » ou « 100 % ».

1.4. Digestion

Les modèles statiques monocompartimentés reproduisent, dans un unique réacteur, une phase gastrique, éventuellement précédée d'une étape de digestion buccale et suivie d'une phase intestinale. Ces modèles ont notamment été utilisés pour mettre en évidence la digestibilité et la bio accessibilité de produits pharmaceutiques, de mycotoxines et de macronutriments tels que les protéines, les glucides et les lipides. Bien que ces modèles soient loin de reproduire la complexité des processus de digestion, ils sont particulièrement bien adaptés à des approches préliminaires de pré-évaluation. Le modèle sélectionné pour ce projet est issu d'un consensus international récent (Minekus *et al.*, 2014).

1.4.1. Digestion gastrique

La durée de l'étape de digestion gastrique est fixée au temps moyen de demi-vie dans l'estomac d'un aliment semi solide et modérément nutritif, soit deux heures. Le pH est quant à lui maintenu à une valeur considérée comme moyenne, à savoir 3. La composition de la solution saline utilisée pour simuler celle des sécrétions gastriques est donnée en Tableau 3. Il est d'ailleurs recommandé d'utiliser un volume de solution saline gastrique (SSG) pour un volume de contenu oral (ou de produit alimentaire liquide).

Tableau 3 : Composition des solutions salines gastriques et intestinales (modèle statique)

	Concentration de la SSG (mmol.l^{-1})	Concentration de la SSI (mmol.l^{-1})
KCl	6,9	6,8
KH_2PO_4	0,9	0,8
$NaHCO_3$	25	85
NaCl	47,2	38,4
$MgCl_2$ ($6H_2O$)	0,1	0,33
$(NH_4)_2CO_3$	0,5	-

Du fait de sa forte homologie (84 %) avec la pepsine humaine et de son faible coût, la pepsine porcine est un produit de choix pour les études *in vitro*. L'activité recommandée est de 2000 unités (U) par millilitre de solution finale de digestion (soit 4000 U.ml^{-1} de sécrétion gastrique). L'activité donnée par le fournisseur est d'ailleurs vérifiée en mesurant la libération de tyrosine en présence d'hémoglobine (données non présentées).

1.4.2. Digestion intestinale

Dans le cas de la digestion intestinale, le chyme (obtenu après digestion gastrique) est dilué au demi à l'aide de la solution saline intestinale (SSI) (Tableau 3). D'après des données extraites de la littérature, la digestion intestinale est simulée durant 2 h, tandis que le pH est maintenu constant à une valeur médiane de 7. Concernant l'ajout des enzymes pancréatiques, deux options sont possibles : le recours à des enzymes individuelles (chymotrypsine, trypsine, lipase, amylase…) ou à de la pancréatine. Le produit étudié étant composé de protéines, de lipides et de glucides, le recours à la pancréatine parait l'option la plus adéquate. La pancréatine d'origine porcine, aisément disponible et contenant les enzymes indispensables, sera privilégiée. L'activité trypsique (principale activité enzymatique pancréatique) de cette dernière est mesurée à l'aide de la méthode au ρ-toluène-sulfonyl-L-arginine méthyl ester (TAME) (données non présentées) et l'équivalent de 100 $U.ml^{-1}$ seront ajoutées au contenu de la phase intestinale. L'ajout de l'extrait de bile nécessite auparavant l'analyse de son contenu en acides biliaires. Cette analyse est réalisée à l'aide d'un kit spécifique (Kit acides biliaires, DiagnosticSystems GmbH, Allemagne) (données non présentées). La quantité de bile ajoutée au SSI sera de 20 $mmol.l^{-1}$, ce qui correspond à une concentration finale de 10 $mmol.l^{-1}$.

2. Caractérisation physico-chimique des échantillons

Certaines méthodes de caractérisation physico-chimiques sont communes à l'étude des échantillons des différents chapitres (β-galactosidases, amidons et protéines notamment). Il s'agit principalement de méthodes classiques permettant de déterminer la composition chimique des échantillons (teneur en eau, en lipides, en glucides, en protéines…) et d'étudier leurs caractéristiques physiques (granulométrie, morphologie…).

2.1. Caractérisation chimique des échantillons

2.1.1. Activité de l'eau

L'activité de l'eau est mesurée à l'aide d'un a_w-mètre Thermoconstanter TH200 (Novasina, Suisse). L'appareillage possède une plage de mesure s'étendant de 0,05 à 1,00 ± 0,01 sur une gamme de température comprise entre 0 et 50 °C. Plus précisément, 1 g d'échantillon est introduit dans une coupelle en polypropylène déposée dans l'enceinte étanche de l'appareil. L'eau libre humidifie ou assèche l'air à l'intérieur de l'enceinte jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. L'humidité relative est mesurée à l'aide d'un capteur électrolytique puis convertie en activité de l'eau. L'étalonnage de l'appareil est effectué à l'aide de sels étalons d'humidités relatives calibrées à 11, 33, 53, 75, 90 et 98 % en fonction de l'échantillon étudié. Trois répétitions sont effectuées.

2.1.2. Teneur en eau

La teneur en eau a été déterminée par séchage à l'étuve selon la norme AOAC (1990). Après séchage à 105 °C et refroidissement dans un dessiccateur, la capsule et son couvercle sont pesés (m_0). Par la suite, 5 g (± 0,25 g) d'échantillon sont pesés puis transvasés dans la capsule en limitant leur exposition à l'atmosphère. Le couvercle est replacé et la masse de l'ensemble est déterminée (m_1). La prise d'essai est répartie en une couche mince uniforme sur le fond de la capsule. Cette dernière est placée, ouverte, dans l'étuve préchauffée à 105 °C ± 2 °C durant 5 h. La capsule est ensuite refermée et rapidement placée dans le dessiccateur durant 30 à 45 min pour refroidissement à température ambiante. Elle est ensuite pesée avec son couvercle (m_2) dans les 2 min suivant sa sortie du dessiccateur. Les pesées sont effectuées à 0,001 g près. Trois répétitions sont effectuées. L'humidité de l'échantillon, exprimée en pourcentage en masse, est donnée par l'Équation 1 :

$$\text{Teneur en eau (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Équation 1 : Calcul de la teneur en eau

Avec m_0 : la masse de la capsule vide et du couvercle séchés (g)

m_1 : la masse de la capsule, de la prise d'essai et du couvercle avant séchage (g)

m_2 : la masse de la capsule, de la prise d'essai et du couvercle après séchage (g)

2.1.3. Teneur en cendres

La teneur en cendres a été déterminée selon la norme AOAC (1990). Après séchage à 105 °C et refroidissement dans un dessiccateur, le creuset est pesé (m_0). Par la suite, 5 g (± 0,25 g) d'échantillon sont pesés puis transvasés dans le creuset en limitant leur exposition à l'atmosphère. La masse de l'ensemble est déterminé (m_1). Le creuset est ensuite placé dans l'étuve à 105 °C ± 2 °C durant 24 h puis dans un four à moufle à 550 °C durant 6 h. Le creuset est ensuite rapidement placé dans le dessiccateur pour refroidissement à température ambiante. Il est ensuite pesé (m_2) dans les 2 min suivant sa sortie du dessiccateur. Les pesées sont effectuées à 0,001 g près. Trois répétitions sont effectuées. La teneur en cendres de l'échantillon, exprimée en pourcentage en masse, est donnée par l'Équation 2 :

$$\text{Teneur en cendres } (\%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Équation 2 : Calcul de la teneur en cendres

Avec m_0 : la masse du creuset vide (g)

m_1 : la masse du creuset et de la prise d'essai avant minéralisation (g)

m_2 : la masse du creuset et de la prise d'essai après minéralisation (g)

2.1.4. Teneur en protéines

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Kjeldahl selon la norme AFNOR (1994). La prise d'essai est minéralisée par l'acide sulfurique concentré en présence d'un catalyseur. L'ammonium formé est distillé pour produire de l'ammoniac, lui-même recueilli dans une solution d'acide borique et titré par une solution d'acide sulfurique.

Plus précisément, 1 g d'échantillon, 2 ml d'acide sulfurique concentré et une pincée de catalyseur ($Na_2S_2O_8/CuSO_4$) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) sont introduits dans un matras. Ce dernier est maintenu durant 2 h à 400 °C grâce à une rampe électrique (étape de minéralisation). Au sein de l'appareil à distiller semi-automatique Gerhardt (Vapodest 4S, France), le contenu du matras est ensuite additionné d'une solution d'hydroxyde de sodium à 10 $mol.l^{-1}$. L'ammoniac dégagé se combine à la vapeur d'eau pour former de l'hydroxyde d'ammonium. Celui-ci, entrainé par la vapeur, se condense dans le réfrigérant avant d'être recueilli dans une solution d'acide borique contenant un indicateur coloré (vert de bromocrésol et rouge de méthyle (3 %)) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Le borate d'ammonium ainsi formé est

déplacé par un acide fort (H_2SO_4 à une concentration de 0,005 mol.l^{-1}) via un dosage semi-automatique. Un essai à blanc (sans échantillon) est effectué dans les mêmes conditions. Trois répétitions sont effectuées. Le pourcentage d'azote dans la matière sèche est déduit de l'Équation 3 :

$$\text{Teneur en azote (g pour 100 g)} = \frac{(V_1 - V_0) \times 0{,}14 \times 100}{m \times 1000}$$

Équation 3 : Calcul de la teneur en protéines

Avec V_1 : le volume d'H_2SO_4 (0,005 mol.l^{-1}) versé pour l'échantillon (ml)

V_0 : le volume d'H_2SO_4 (0,005 mol.l^{-1}) versé pour le blanc (ml)

m : la masse de la prise d'essai (g)

2.1.5. Teneur en lipides

La teneur en lipides a été déterminée selon la méthode de Folch *et al.* (1957). Il s'agit d'une méthode d'extraction à froid standardisée, basée sur l'utilisation du chloroforme et du méthanol. Trois répétitions sont effectuées. Expérimentalement, 50 g d'échantillon (m_1) sont placés dans un ballon préalablement pesé (m_0). Le ballon contenant l'échantillon est additionné de 200 ml d'un mélange chloroforme/méthanol (2 : 1) puis mis sous agitation sous azote pendant 20 min. La solution ainsi obtenue est alors filtrée sous vide. Après lavage du filtre avec 200 ml du mélange chloroforme/méthanol, le solvant est éliminé à l'aide d'un évaporateur sous vide à 50 °C. Le ballon est de nouveau pesé (m_2) et la teneur en lipides est calculée selon l'Équation 4 :

$$\text{Teneur en lipides (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1} \times 100$$

Équation 4 : Calcul de la teneur en lipides

Avec m_0 : la masse du ballon vide (g)

m_1 : la masse de la prise d'essai (g)

m_2 : la masse du ballon contenant les lipides (g)

2.1.6. Teneur en glucides

2.1.6.1. Teneur en glucides totaux

La teneur en glucides totaux est calculée par différence avec les autres constituants précédemment cités (eau, minéraux, protéines et lipides).

2.1.6.2. Teneur en amidon

Le dosage de l'amidon a été réalisé à l'aide du kit K-TSTA (Megazyme International, Irlande). Une α-amylase thermostable est incubée à 100 °C durant 6 min en présence de l'amidon à doser. Elle permet l'obtention de maltodextrines solubles branchées et non branchées.

$$\text{Amidon} + H_2O \xrightarrow{\alpha\text{-amylase}} \text{Maltodextrines}$$

Une amyloglucosidase hydrolyse par la suite quantitativement les maltodextrines en D-glucose. Cette réaction se déroule à 50 °C durant 30 min.

$$\text{Maltodextrines} \xrightarrow{\text{Amyloglucosidase}} \text{D-glucose}$$

Le D-glucose ainsi obtenu est ensuite oxydé en D-gluconate, ce qui permet la libération de peroxyde d'hydrogène.

$$\text{D-glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Glucose oxydase}} \text{D-gluconate} + H_2O_2$$

Enfin, le peroxyde d'hydrogène ainsi obtenu est converti en un complexe coloré à l'aide d'une peroxydase. Ces deux dernières étapes se déroulent simultanément à 50 °C durant 20 min.

$$2\ H_2O + \text{acide ρ-hydroxybenzoïque} + \text{4-aminoantipyrine} \xrightarrow{\text{Peroxydase}} \text{Quinonéimine} + 4\ H_2O$$

Le complexe coloré est ensuite quantifié par spectrophotométrie.

2.1.6.3. Teneur en amylose/amylopectine

Le dosage de la teneur en amylose et en amylopectine a été réalisé à l'aide du kit K-AMYL (Megazyme International, Irlande). Les échantillons d'amidon sont complètement dispersés par traitement thermique dans du diméthylsulfoxyde. L'amylopectine est par la suite spécifiquement précipitée par addition de concanavaline A. Cette lectine, dans des conditions spécifiques de pH, de température et de force ionique, se complexe aux polyosides ramifiés et forme un précipité. L'échantillon est alors centrifugé et le culot éliminé. L'amylose, contenue dans le surnageant, est hydrolysée enzymatiquement en glucose par une amyloglucosidase et une α-amylase. Le glucose est ensuite dosé indirectement via l'utilisation d'une glucose-oxydase et d'une peroxydase. Parallèlement à cela, la teneur totale en glucose de l'échantillon de départ est déterminée de la même façon. Par différence, la teneur en amylose et en amylopectine est déterminée.

2.1.6.4. Teneur en amidon résistant

Le dosage de la teneur en amidon résistant a été réalisé à l'aide du kit K-RSTAR (Megazyme International, Irlande). Les échantillons sont incubés à 37 °C sous agitation durant 16 h en présence d'une α-amylase et d'une amyloglucosidase. Durant cette incubation, l'amidon non résistant est solubilisé et hydrolysé en D-glucose par l'action simultanée des deux enzymes. La réaction est stoppée par l'addition d'éthanol et, après centrifugation, l'amidon résistant est récupéré dans le culot. La teneur en D-glucose du surnageant est mesurée indirectement à l'aide d'une glucose-oxydase et d'une peroxydase. Le culot obtenu précédemment est ensuite dissous dans du KOH 2 $mol.l^{-1}$ sous agitation vigoureuse dans un bain de glace. La solution est neutralisée à l'aide d'un tampon acétate et l'amidon est quantitativement hydrolysé en glucose par une amyloglucosidase. Le D-glucose contenu dans cet échantillon est ainsi quantifié de la même façon que précédemment. En tenant compte de la concentration en D-glucose du surnageant, la teneur en amidon résistant peut ensuite être calculée.

2.2. Caractérisation physique des échantillons

2.2.1. Analyse granulométrique

La distribution de taille des particules est déterminée par diffusion statique de la lumière grâce à un granulomètre Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Limited, Works, UK). La diffraction laser mesure les distributions granulométriques des particules en mesurant la variation angulaire de l'intensité de lumière diffusée lorsqu'un faisceau laser traverse un échantillon de particules dispersées. Les grosses particules diffusent la lumière à de petits angles par rapport au faisceau laser et les petites particules diffusent la lumière à des angles supérieurs. Grâce à la théorie de Mie, les données relatives à l'intensité diffusée en fonction de l'angle sont analysées pour calculer la taille des particules qui ont créé l'image de diffraction.

L'appareil est équipé d'un laser de type He/Ne d'une puissance de 4 mW et opérant à une longueur d'onde de 632,8 nm. Un module de dispersion spécifique aux poudres est utilisé : il s'agit du module « Aero S ». La taille des particules détectées par ce système est comprise entre 0,1 à 3500 µm. Au moins trois répétitions sont réalisées.

2.2.2. Analyse granulo-morphométrique

Les échantillons ont été analysés grâce au granulo-morphomètre (Qicpic, Sympatec Inc., Clausthal-Zellerfeld, Allemagne) équipé du module de dispersion Lixell et du logiciel Windox 5.0 (Sympatec Inc., Clausthal-Zellerfeld, Allemagne). Trois répétitions sont effectuées. L'appareil utilise l'analyse d'images dynamique pour déterminer la taille et la forme des particules (Köhler *et al.*, 2008). Afin d'éviter le gonflement des granules, les mesures ont été réalisées dans de l'éthanol.

À partir d'une particule 3D complexe, l'analyseur d'image fournit une image 2D qui permet ensuite le calcul de paramètres de taille et de forme. Pour cela, le diamètre d'un cercle correspondant à la même surface que l'image 2D de la particule est calculé. Ce diamètre est appelé « Circle of Equal Projection Area ». Mais à lui seul, il ne permet pas de comparer efficacement des particules entre elles. À partir de ce diamètre, la sphéricité peut donc être déterminée : il s'agit du rapport du périmètre équivalent du cercle sur le périmètre réel. La valeur de la sphéricité varie entre 0 et 1 : plus la valeur est faible, plus la particule présente une forme irrégulière (Figure 4). La convexité est aussi un paramètre important puisqu'elle représente la compacité de la particule (Figure 4).

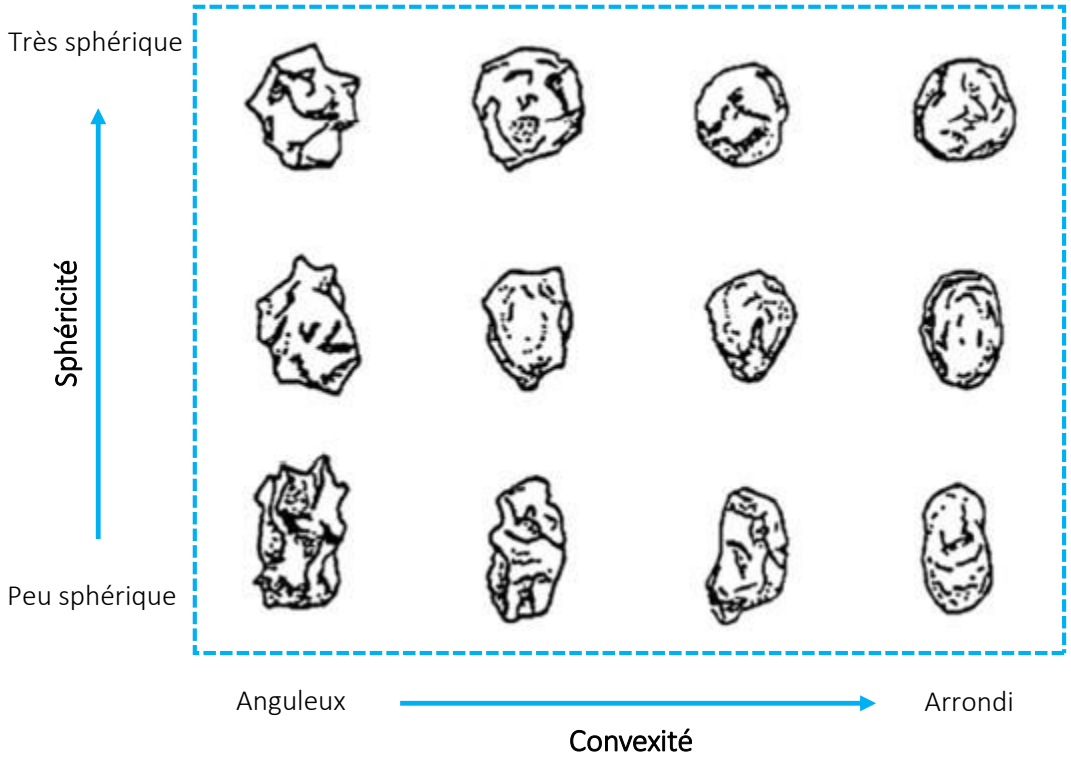


Figure 4 : Variation des paramètres de sphéricité et de convexité en fonction de la véritable morphologie des particules

Théoriquement, la convexité peut avoir une valeur maximale de 1 s'il n'existe aucune région concave. Toutefois, en raison de la conception du détecteur (pixels carrés), toutes les particules semblent présenter une petite région concave. Par conséquent, le maximum de convexité mesurée sera limité à 0,99.

2.2.3. Microscopie électronique à balayage (MEB)

En microscopie électronique à balayage, l'image est formée en balayant un faisceau d'électrons accéléré par une tension relativement faible (< 1 à 30 kV) et focalisé sur la surface de l'échantillon. Les électrons rétrodiffusés et/ou secondaires sont alors recueillis en synchronisant la détection du balayage du faisceau incident. Une image de surface est ainsi obtenue.

Une partie des observations a été réalisée au Service Commun de Microscopie de la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de Lorraine (Vandœuvre-lès-Nancy). Les poudres à analyser sont fixées sur un ruban adhésif double face monté sur un support. Une couche d'un mélange or/palladium est déposée à la surface des particules. Cette préparation permet de rendre l'échantillon conducteur. Les mesures sont réalisées sous vide secondaire (environ 10^{-5} torr) par rétrodiffusion des électrons secondaires avec un microscope électronique à balayage (Cambridge Stereoscan S240).

La seconde partie des observations a été réalisée à l'Université du Queensland (Brisbane, Australie). Une couche d'iridium est déposée à la surface des particules (Q150T Turbo-Pumped Sputter Coater, ProSciTech Pty Ltd, Queensland, Australie). Les mesures sont réalisées sous vide secondaire (environ 10^{-5} torr) par rétrodiffusion des électrons secondaires avec un microscope électronique à balayage JEOL JSM-7100F à canon à effet de champ (Schottky) (JEOL Ltd., Tokyo, Japon).

3. Méthodes propres à l'étude des β-galactosidases

L'étude des β-galactosidases implique le recours à des méthodes d'analyse spécifiques. Ainsi, ce paragraphe se propose de détailler les méthodes permettant de mesurer leur activité, ainsi que les paramètres choisis pour étudier leur action dans des conditions proches de celle de la vie du produit industriel (réhydratation, refroidissement et digestion gastro-intestinale). Dans le même temps, le matériel et la méthodologie ayant permis d'étudier l'influence du traitement thermique sur l'activité de ces enzymes sont détaillés. Enfin, la méthode ayant permis de les enrober est explicitée.

3.1. Matériel

Une β-galactosidases sécrétée par la moisissure *Aspergillus oryzae* (abrégé « enzyme AO » dans la suite du document) et une seconde sécrétée par la levure *Kluyveromyces lactis* (abrégé « enzyme KL » dans la suite du document) sont étudiées durant ce projet. L'enzyme AO est commercialisée par Amano Enzyme Inc. sous le nom commercial de « Lactase DS ». Cette préparation enzymatique se présente sous forme pulvérulente. Le lot étudié possède une activité déclarée par le fournisseur supérieure à 80000 unités par gramme. L'enzyme KL est quant à elle commercialisée par Novozymes sous le nom commercial « Lactozym® Pure ». Le lot étudié possède une activité déclarée supérieure à 2600 unités par gramme et la préparation enzymatique se présente sous forme liquide.

3.2. Mesure directe et indirecte de l'activité enzymatique

3.2.1. Mesure directe par la méthode ONPG

L'activité enzymatique des β-galactosidases est mesurée selon la norme du Food Chemical Codex (United States Pharmacopeial Convention, 2014). Outre le lactose, les β-galactosidases ont la capacité d'hydrolyser un certain nombre de substrats, dont l'ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG). Cette hydrolyse engendre la libération de galactose et d'un complexe coloré, l'ortho-nitrophénol, facilement quantifiable par spectrophotométrie à 420 nm. Il existe un protocole expérimental distinct pour les β-galactosidases neutres et acides. Trois répétitions sont effectuées.

Ainsi, un minimum de 1 g d'enzyme KL est dissous dans une solution tampon (notamment composée de $MgSO_4$, EDTA, KH_2PO_4 et K_2HPO_4) à pH 6,5 de façon à obtenir une solution présentant une activité comprise entre 0,027 et 0,095 unité de lactase neutre (NLU) par millilitre. Une fraction de cette solution (1 ml) est placée dans un tube en verre et équilibrée à 30,0 °C ± 0,1 °C durant 5 à 15 min. Au temps zéro, 5 ml d'une solution d'ONPG (substrat de réaction) préalablement équilibrée à la température d'incubation sont ajoutés. Au bout de 10 min, la réaction est stoppée par ajout de 2 ml d'une solution de carbonate de sodium. L'absorbance de la solution est mesurée à 420 nm contre un blanc (préparé de la même manière que l'échantillon mais en inversant l'ordre d'ajout du substrat ONPG et la solution de carbonate de sodium). Grâce à une gamme étalon en 2-nytrophénol, l'activité de l'enzyme KL est déterminée.

L'enzyme AO est quant à elle diluée dans de l'eau de façon à obtenir une solution ayant une activité comprise entre 0,15 et 0,65 unité de lactase acide (ALU) par millilitre. Une fraction (2 ml) d'une solution de substrat (composée d'ONPG dissous dans une solution tampon d'acétate) est placée dans un bain d'eau à 37,0 °C ± 0,1 °C durant 10 min. Au temps zéro, 0,5 ml de la solution d'enzyme AO y est ajoutée. Au bout de 15 min, la réaction est stoppée par ajout de 2,5 ml d'une solution de carbonate de sodium. L'échantillon est ensuite dilué dans 20 ml d'eau, puis son absorbance est mesurée à 420 nm. De la même façon que précédemment, grâce à une gamme étalon en 2-nytrophénol, l'activité de l'enzyme AO est déterminée.

3.2.2. Mesure indirecte par quantification du lactose (CLHP)

Le dosage de l'activité d'une β-galactosidase contenue dans les échantillons complexes (lait par exemple) est difficile par la méthode précédemment décrite. Cela nécessite l'extraction de l'enzyme par des moyens « doux », permettant de conserver sa structure et son activité. De plus, le lactose étant le substrat naturel des β-galactosidases, l'étude et le suivi de son hydrolyse sont indispensables. La quantification du lactose a par conséquent été mise au point.

3.2.2.1. Choix de la méthode de quantification

Un certain nombre de techniques permettant la quantification du lactose dans les produits laitiers sont développées depuis de nombreuses années. Les méthodes traditionnelles (gravimétriques, polarimétriques et colorimétriques) permettent rarement la séparation des différents glucides présents dans le produit et nécessitent généralement l'élimination préalable des protéines et de la matière grasse, ce qui les rend chronophages.

De nouvelles méthodes, plus rapides et sélectives, ont par conséquent été développées (Corzo *et al.*, 2009). Le lactose, tout comme la matière grasse et les protéines du lait, peuvent être quantifiés par spectroscopie infrarouge. Pour le lactose, cette méthode de quantification est basée sur le rayonnement infrarouge absorbé par ses groupements hydroxyles (Lynch *et al.*, 2006). Le lactose peut aussi être quantifié par une méthode enzymatique, qui consiste à hydrolyser le lactose en glucose et en galactose grâce à une β-galactosidase, puis à quantifier indirectement le glucose, en ayant recours à une glucose-oxydase ou à une glucose-6-phosphate déshydrogénase, ou le galactose, en ayant recours à une β-galactose déshydrogénase (Fox *et al.*, 2015). Pour notre application, au fur et à mesure de la réaction, le lactose est hydrolysé en glucose et galactose. Ces deux techniques, non spécifiques au lactose, ne peuvent par conséquent pas être utilisées.

La quantification simultanée des différents glucides présents dans des produits laitiers peut être réalisée par un nombre considérable de méthodes chromatographiques. Depuis son introduction, la chromatographie en phase gazeuse a été largement utilisée pour l'analyse des glucides du lait. Cette technique est rapide, facile à automatiser et modérément coûteuse. Cependant, les glucides doivent être convertis en dérivés volatils avant analyse (Rojas-Escudero *et al.*, 2004), ce qui la rend fastidieuse.

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est l'une des techniques les plus utilisées pour la séparation des glucides alimentaires. Elle est particulièrement rapide et la préparation des échantillons est simple. Il est en effet possible d'injecter l'échantillon sans dérivatisation et d'obtenir un chromatogramme à haute résolution en un cours laps de temps (Folkes et Crane, 1982). La CLHP permet la détection directe des glucides étant donné qu'ils peuvent absorber dans le domaine des faibles longueurs d'ondes (ultra-violet). Mais une détection inférieure à 200 nm nécessite l'utilisation de réactifs coûteux, et présente une faible sensibilité et sélectivité. Le détecteur le plus couramment utilisé pour la détection des glucides après séparation par CLHP est le détecteur à indice de réfraction. Mais la réponse de ce détecteur est très pauvre, non spécifique et l'élution des glucides doit être réalisée en régime isocratique. Un effort considérable a par conséquent été mené pour développer des détecteurs avec une meilleure sensibilité et spécificité. Les détecteurs électrochimiques ou évaporatifs à diffusion de lumière (DEDL) en font partie (Wei et Ding, 2000).

3.2.2.2. Préparation des échantillons

Bien que la technique de CLHP ne nécessite pas de dérivatisation des échantillons, ceux contenant une importante quantité de protéines doivent au préalable subir une précipitation de façon à ne pas endommager la colonne. Pour les échantillons « simples », composés d'une solution tampon contenant du lactose et/ou du glucose et du galactose, seule une filtration à travers un filtre de 0,22 µm est réalisée avant injection. Pour les échantillons « complexes » (composés de lait ½ écrémé, voire du produit réhydraté) l'ajout d'une quantité donnée d'acide trichloroacétique (TCA), suivi d'une centrifugation et d'une filtration sont nécessaires. L'influence de la concentration en TCA, ainsi que la vitesse et la température de centrifugation sur l'extraction du lactose ont été étudiées (données non présentées). Ainsi, un volume donné d'une solution de TCA à 20 % (m/v) est ajouté au même volume d'échantillon. Ce dernier est ensuite centrifugé à 5000 tours par minute durant 10 min et le culot (comprenant les protéines précipitées) est éliminé. Le surnageant est alors filtré à travers un filtre de 0,22 µm puis injecté.

3.2.2.3. Conditions expérimentales

Les molécules polaires, dont font partie les glucides, sont généralement difficiles à analyser en CLHP : elles présentent une faible solubilité dans les solvants (apolaires ou très peu polaires) utilisés en chromatographie de partage à polarité de phase normale et ne sont pas retenues sur les colonnes classiques (apolaires) de chromatographie de partage à polarité de phase inversée. La chromatographie liquide à interaction hydrophile (HILIC) est devenue une approche alternative de plus en plus utilisée pour séparer efficacement les composés polaires. La chromatographie HILIC est caractérisée par une phase stationnaire hydrophile (silice vierge ou silice greffée avec un groupement fonctionnel polaire tel qu'amine, amide ou diol) similaire à celle utilisée en chromatographie à polarité de phase normale. La phase mobile est composée d'un mélange hydro-organique proche du mélange utilisé en chromatographie à polarité de phase inversée : de 60 à 95 % de solvant aprotique (généralement de l'acétonitrile) et de 5 à 40 % d'eau ou de tampon aqueux. Le mécanisme de séparation est basé sur la distribution différentielle des molécules de soluté injecté entre la phase mobile riche en acétonitrile et une couche riche en eau, adsorbée à la surface de la phase stationnaire hydrophile (Buszewski et Noga, 2012 ; Guillarme, 2014) (Figure 5).

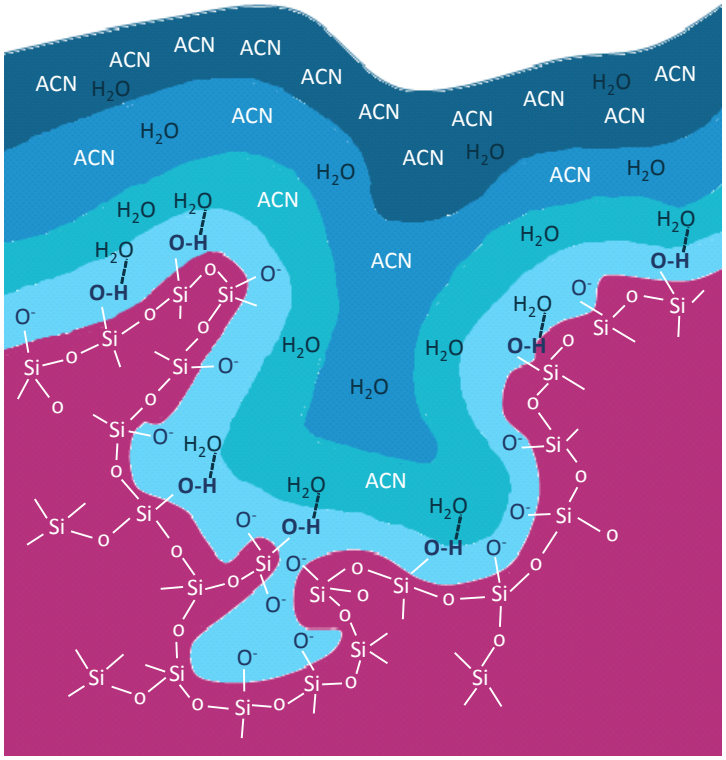


Figure 5 : Principe de la chromatographie HILIC, adapté de Buszewski et Noga (2012)

La phase stationnaire utilisée est une colonne YMC-Pack polyamine II (250 x 4,6 mm, 5 µm, 12 nm) (ImChem, France) équipée d'une pré-colonne YMC polyamine II (10 x 4,0 mm, 5 µm, 12 nm)

(Imchem, France). La fonctionnalisation de la colonne a été obtenue par greffage d'une couche polymérique contenant des amines secondaires et tertiaires. Ces groupements, faiblement nucléophiles, limitent la formation de bases de Schiff largement observée sur les silices aminées classiques. Cette colonne présente par ailleurs une sélectivité très élevée pour les oses et les diholosides (Claude et Jardy, 1994). Le chromatographe utilisé est un Surveyvor (Thermo Electron Corporation). L'élution est isocratique, avec une phase mobile constituée d'un mélange d'eau ultra-pure dégazée (25 %) et d'acétonitrile (75 %) pompée à un débit de 1 $ml.min^{-1}$. Le volume d'échantillon injecté est de 20 µl. Le détecteur utilisé est un DEDL ELSD-LTII (Shimadzu, Kyoto, Japon). Le principe de fonctionnement d'un DEDL est le suivant : le mélange de phase mobile et d'échantillon est nébulisé (production d'une brume homogène), la phase mobile est ensuite évaporée et les particules pénètrent une cellule incluant une source lumineuse. Les particules déviant la lumière selon leur taille, l'intensité de la lumière dispersée est donc directement proportionnelle à la masse du composé élué. La température de nébulisation est fixée à 35 °C et la température d'évaporation est fixée à 45 °C. La durée d'analyse est fixée à 30 min et la colonne est maintenue à 30 °C. Une courbe de calibration en α-lactose monohydrate (Sigma-Aldrich, France) représentant l'aire du pic en fonction de la concentration (de 0,5 à 5 $g.l^{-1}$) est réalisée avant chaque analyse. Trois répétitions sont effectuées.

3.3. Caractérisation enzymatique

3.3.1. Détermination de la température optimale

L'activité enzymatique des β-galactosidases dépend principalement de la température, du pH et de la composition ionique du milieu dans lequel elles évoluent. Pour étudier l'influence de la température sur l'activité des deux β-galactosidases sélectionnées, les deux autres paramètres, tout comme la concentration en substrat et la quantité d'enzyme ajoutée, sont maintenus constants.

Le pH est maintenu à la valeur optimale donnée par le fournisseur (pH 6 pour l'enzyme KL et pH 5 pour l'enzyme AO), tandis que la composition ionique du milieu simule celle du lait de vache. Un tel milieu, nommé « simulated milk ultra-filtrate » (SMUF), a été décrit par Jenness et Koops (1962). Sa composition est donnée en Tableau 4.

Ainsi, une solution SMUF est préparée à l'aide de réactifs fournis par Sigma-Aldrich. Cette solution est enrichie en lactose (48 $g.l^{-1}$) puis ajustée à un pH de 5 ou de 6 à l'aide de solutions de NaOH ou de HCl à une concentration de 1 $mol.l^{-1}$. Durant 10 min, 10 ml de cette solution sont mis

à incuber en bain d'eau à différentes températures (10 ; 20 ; 30 ; 35 ; 40 ; 45 ; 50 ou 60 °C pour l'enzyme KL et 10 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 70 ou 80 °C pour l'enzyme AO) en présence de 180 NLU ou ALU. La quantité d'enzyme ajoutée correspond à celle préconisée par l'EFSA (4500 NLU ou ALU par produit contenant du lactose), soit dans notre cas, 4500 NLU ou ALU pour 250 ml de produit. La réaction enzymatique est stoppée par ajout de 0,5 ml de TCA 20 % (m/v) à 0,5 ml d'échantillon. La concentration en lactose des différents échantillons est mesurée par CLHP. Cette expérience est réalisée en triple pour chaque température et chacune des deux enzymes. Les valeurs présentées correspondent aux moyennes des trois essais et sont exprimées en activité relative.

Tableau 4 : Composition de la solution SMUF selon Jenness et Koops (1962)

	Concentration (mmol.l^{-1})
KH_2PO_4	11,61
K_3 citrate	3,70
Na_3 citrate $2H_2O$	6,09
K_2SO_4	1,03
K_2CO_3	2,17
KCl	8,05
$CaCl_2$ $2H_2O$	8,98
$MgCl_2$ $6H_2O$	3,21

3.3.2. Détermination du pH optimal

L'influence du pH sur l'activité des deux enzymes sélectionnées a été étudiée à la température optimale donnée par le fournisseur (45 °C pour l'enzyme KL et 60 °C pour l'enzyme AO) en solution SMUF. Ainsi, une solution SMUF à laquelle sont rajoutés 48 g de lactose par litre est préparée. Des aliquotes de 10 ml sont ensuite ajustées aux différents pH étudiés (3 ; 4 ; 4,5 ; 5 ; 5,5 ; 6 ; 7 ou 8 pour l'enzyme AO et 4 ; 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 ou 8 pour l'enzyme KL) puis incubées à 45 °C (enzyme KL) ou 60 °C (enzyme AO) en bain d'eau en présence de 180 NLU ou ALU. La réaction enzymatique est stoppée par ajout de 0,5 ml de TCA 20 % (m/v) à 0,5 ml d'échantillon. La concentration en lactose des différents échantillons est mesurée par CLHP. Cette expérience est réalisée en triple pour chaque pH et chacune des deux enzymes. Les valeurs présentées correspondent aux moyennes des trois essais et sont exprimées en activité relative.

3.3.3. Détermination des paramètres cinétiques (K_m, V_{max})

Expérimentalement, pour déterminer la constante de Michaelis (K_m) et la vitesse initiale maximale de la réaction (V_{max}) d'une enzyme, il convient de faire varier la concentration en substrat,

tout en maintenant les autres paramètres (température, pH, force ionique…) constants. Idéalement, les concentrations en substrat étudiées doivent être comprises entre 0,2 et 10 fois le Km. Dans la littérature, le K_m de l'enzyme AO pour le lactose est généralement compris entre 0,04 et 0,2 mol.l^{-1} (Friend et Shahani, 1982 ; Huffman et Harper, 1985 ; Park *et al.*, 1979 ; Shukla et Chaplin, 1993), tandis que celui de l'enzyme KL est compris entre 0,01 mol.l^{-1} et 0,18 mol.l^{-1} (Dickson *et al.*, 1979 ; Zhou *et al.*, 2003).

Les concentrations en lactose étudiées pour les enzymes KL et AO sont respectivement de 0,004 ; 0,008 ; 0,03 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 mol.l^{-1} et de 0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 ; 0,1 ; 0,3 mol.l^{-1}. Les cinétiques ont été réalisées à la température et au pH optimal de chacune des deux enzymes (pH 7 et 45 °C pour l'enzyme KL et à pH 4,5 et 50 °C pour l'enzyme AO), en solution SMUF. La quantité d'enzyme ajoutée est de 18 NLU ou ALU par millilitre.

Plus précisément, 10 ml de solution SMUF (composition donnée en Tableau 4) contenant une des concentrations de lactose à étudier sont placés dans un bain-marie régulé à la température optimale de l'enzyme étudiée. L'enzyme (180 NLU ou ALU) est ajoutée au temps 0, et des prélèvements sont réalisés au bout de 10, 20, 30, 45, 60, 90 et 120 s. Ces prélèvements (0,5 ml) sont immédiatement additionnés de 0,5 ml de TCA à 20 % pour stopper la réaction d'hydrolyse enzymatique. Ils sont ensuite filtrés à travers un filtre de 0,22 µm puis analysés par CLHP. La concentration en lactose présente dans le milieu a été déterminée, et la concentration en glucose a ainsi pu être déduite. Cette expérience a été réalisée en triple pour chaque concentration en substrat et pour chacune des deux enzymes.

Les paramètres cinétiques sont déterminés en faisant l'hypothèse que les enzymes sont Michaeliennes, et qu'elles suivent donc la loi :

$$V = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S}$$

Équation 5 : Calcul de la vitesse initiale de réaction

Avec V : la vitesse initiale (mol.l^{-1}.s^{-1})

V_{max} : la vitesse maximale (mol.l^{-1}.s^{-1})

S : la concentration en substrat (mol.l^{-1})

K_m : la constante apparente de Michaelis-Menten (mol.l^{-1})

Les cinétiques réalisées ont permis de déterminer la vitesse initiale de la réaction pour chacune des concentrations en substrat. L'inverse des vitesses initiales exprimé en fonction de l'inverse des

concentrations en substrat (représentation de Lineweaver et Burk) permet de déterminer, par une fonction affine optimisée par la méthode des moindres carrés, les valeurs de K_m (y = 0) et de V_{max} (x = 0). Ces valeurs permettent ensuite de calculer les vitesses théoriques et de les comparer aux vitesses obtenues expérimentalement.

3.4. Étude de l'hydrolyse du lactose durant l'étape de réhydratation et de refroidissement

3.4.1. Étude de l'action de l'enzyme en solution SMUF

Une solution SMUF (composition donnée en Tableau 4) contenant 48 g de lactose par litre est préparée. Cette solution est ajustée à un pH de 7 par ajout d'une solution de NaOH ou de HCl à une concentration de 1 $mol.l^{-1}$ et 20 ml sont placés dans un bain d'eau maintenu à 20 °C (pour l'étape de réhydratation) ou dans une chambre froide maintenue à 4 °C (pour l'étape de refroidissement). L'enzyme (360 NLU ou ALU) est ajoutée au temps 0 et un prélèvement est réalisé au bout de 1, 2, 3, 4 et 5 min de réaction pour la simulation de l'étape de réhydratation, et au bout de 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 min de réaction lors de la simulation de l'étape de refroidissement. Chaque prélèvement (0,5 ml) est immédiatement placé dans 0,5 ml d'une solution de TCA 20 % (m/v) de façon à stopper la réaction enzymatique. La concentration en lactose contenue dans chacun des échantillons est ensuite mesurée par CLHP. Trois répétitions sont réalisées pour chacune des deux enzymes étudiées.

3.4.2. Étude de l'action de l'enzyme dans le produit réhydraté

Une masse de 20 g de formulation sèche est placée dans un shaker. Un volume de 200 ml de lait ½ écrémé (GrandLait, Candia) y est ajouté et le mélange est agité durant 10 s. Lors de la simulation de l'étape de réhydratation, différentes quantités d'enzyme KL sont ensuite ajoutées au mélange : 10400 ; 16000 ; 20000 ; 24000 ou 32000 NLU. L'enzyme AO est quant à elle ajoutée à hauteur de 10400 ALU. Le shaker est agité durant 30 s, puis laissé au repos durant 2 min et 30 s à température ambiante. À la fin des 3 min de réhydratation, un prélèvement (1 ml) est effectué et placé dans 1 ml de TCA 20 %. Lors de la simulation de l'étape de refroidissement, l'enzyme KL (3600 NLU) est ajoutée aux 200 ml de produit réhydraté et le mélange est placé en chambre froide à 4 °C. Un prélèvement est réalisé au bout de de 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 min de réaction. Après préparation des échantillons (paragraphe 3.2.2.2), la concentration en lactose est quantifiée par CLHP. Trois répétitions sont réalisées.

3.5. Étude de l'influence d'un traitement thermique en four à micro-ondes sur l'activité de l'enzyme

Pour statuer quant à l'effet du traitement thermique sur l'activité des enzymes AO et KL, leur activité résiduelle est quantifiée avant et après chaque traitement thermique. Dans un premier temps, leur activité est mesurée à l'aide de la méthode ONPG. Expérimentalement, l'enzyme est réhydratée à l'aide de 250 ml d'eau à pH 7 (pour l'enzyme AO) ou de tampon à pH 6,5 (pour l'enzyme KL). Le mélange est placé dans un bécher en verre d'une contenance de 250 ml, et subit ensuite l'un des cinq cycles de traitement thermique mentionné en Figure 3. Un échantillon est prélevé, avant et après le traitement thermique, et leur activité est quantifiée par la méthode ONPG. Trois répétitions sont réalisées pour chaque traitement thermique. Les résultats sont exprimés en activité résiduelle (%).

Le milieu réactionnel ayant un effet probable sur la dénaturation des enzymes, l'influence des différents traitements thermiques sera aussi étudiée dans une solution SMUF contenant 48 $g.l^{-1}$ de lactose, ainsi que dans du lait ½ écrémé. La présence de lactose, qui entrerait en compétition avec l'ONPG, rend impossible l'utilisation de la méthode par ONPG pour déterminer l'activité résiduelle de l'enzyme après traitement thermique. Ainsi, après traitement thermique, un échantillon (10 ml) du milieu ayant subi le traitement thermique est prélevé et placé dans un bain d'eau à la température optimale (déterminée précédemment) de l'enzyme étudiée (45 °C pour l'enzyme KL et 50 °C pour l'enzyme AO). Le pH est aussi ajusté au pH optimal de l'enzyme étudiée (pH 7 pour l'enzyme KL et pH 4,5 pour l'enzyme AO) par ajout de HCl ou de NaOH 0,1 $mol.l^{-1}$. La solution ainsi obtenue est incubée durant 10 min. À la fin de l'incubation, l'enzyme est dénaturée par ajout de TCA 20 %. Après préparation des échantillons (paragraphe 3.2.2.2), la concentration en lactose est quantifiée par CLHP. Parallèlement à cela, un témoin (enzyme AO ou KL réhydratée dans du SMUF lactosé ou du lait ½ écrémé) sans traitement thermique est incubé dans les mêmes conditions, et permettra par la suite de calculer l'activité résiduelle de l'enzyme en fonction des différents traitements thermiques.

3.6. Étude de l'hydrolyse du lactose durant la digestion gastro-intestinale

3.6.1. Modèle monocompartimenté statique

L''hydrolyse du lactose par les enzymes AO et KL a été suivie durant la digestion gastro-intestinale. Pour ce faire, le modèle monocompartimenté statique issu du consensus international récent (Minekus *et al.*, 2014) détaillé en paragraphe 1.4 a été utilisé avec quelques modifications.

3.6.1.1. Digestion gastrique

L'activité des β-galactosidases étant très dépendante du pH, ce dernier sera ajusté tout au long de la phase gastrique de façon à se rapprocher au mieux du pH observé *in vivo*. Dans la littérature, le pH gastrique moyen observé chez l'Homme après consommation de 300 ml de lait ½ écrémé est donné par Minekus *et al.* (1995). Cette évolution est présentée en Tableau 5.

Tableau 5 : Évolution du pH intra-gastrique chez l'Homme après absorption de lait ½ écrémé d'après Minekus *et al.* (1995)

Temps (min)	0	5	20	40	60	90	120
pH	4,8	4,5	4,2	2,8	2,1	1,8	1,7

Dans un premier temps, seule l'influence des paramètres de température et de pH de la phase gastrique sur l'activité des enzymes KL et AO a été étudiée. Pour cela, une solution SMUF (composition donnée en Tableau 4) contenant 48 g de lactose par litre est préparée. Cette solution est ajustée à un pH de 4,8 par ajout d'une solution de NaOH ou de HCl à une concentration de 1 $mol.l^{-1}$ et 20 ml sont placés dans un bain d'eau maintenu à 37 °C. L'enzyme (360 NLU ou ALU) est ajoutée au temps 0 et un prélèvement est réalisé au bout de 5, 10, 20, 40 et 60 et 120 min de réaction. Durant les 120 min de réaction, le pH est ajusté selon les valeurs données en Tableau 5. Chaque prélèvement (0,5 ml) est immédiatement placé dans 0,5 ml d'une solution de TCA 20 % (m/v) de façon à stopper la réaction enzymatique. La concentration en lactose contenue dans chacun des échantillons est ensuite mesurée par CLHP. Trois répétitions sont réalisées pour chacune des deux enzymes étudiées.

Par la suite, l'activité des deux enzymes a été étudiée durant la phase de digestion gastrique. Pour cela, 180 NLU sont réhydratés à l'aide de 10 ml de lait ½ écrémé (GrandLait, Candia). Ce mélange est placé sous agitation dans un bécher à double paroi maintenu à 37 °C à l'aide d'un bain d'eau circulant. Immédiatement, 7,5 ml de SSG (composition donnée en Tableau 3) sont ajoutés au

produit. Le mélange est additionné de 1,6 ml d'une solution de pepsine à 25000 $U.ml^{-1}$, obtenue par réhydratation de la pepsine (P6887, Sigma-Aldrich, Lyon, France) dans de la SSG. Enfin, 5 µl de $CaCl_2$ à une concentration de 0,3 $mol.l^{-1}$ sont ajoutés et le pH est ajusté à 4,8 par addition d'une solution de HCl à 1 $mol.l^{-1}$. Durant les deux heures de digestion gastrique, le pH est régulé selon les valeurs données en Tableau 5 par l'ajout de HCl 1 $mol.l^{-1}$. Des prélèvements (1 ml) réguliers sont effectués et additionnés de 1 ml de TCA 20 %. Après préparation des échantillons (paragraphe 3.2.2.2), ces derniers sont analysés par CLHP.

3.6.1.2. Digestion intestinale

Dans un premier temps, seule l'influence des paramètres de température et de pH de la phase intestinale sur l'activité des enzymes KL et AO a été étudiée. Pour cela, une solution SMUF (composition donnée en Tableau 4) contenant 48 g de lactose par litre est préparée. Cette solution est ajustée à un pH de 4,8 par ajout d'une solution de NaOH ou de HCl à une concentration de 1 $mol.l^{-1}$ et 20 ml sont placés dans un bain d'eau maintenu à 37 °C. L'enzyme (360 NLU ou ALU) est ajoutée au temps 0 et un prélèvement est réalisé au bout de 5, 10, 20, 40 et 60 et 120 min de réaction. Durant les 120 min de réaction, le pH est maintenu à une valeur de 7. Chaque prélèvement (0,5 ml) est immédiatement placé dans 0,5 ml d'une solution de TCA 20 % (m/v) de façon à stopper la réaction enzymatique. La concentration en lactose contenue dans chacun des échantillons est ensuite mesurée par CLHP. Trois répétitions sont réalisées pour chacune des deux enzymes étudiées.

Dans un second temps, expérimentalement, 11 ml de SSI (composition donnée en Tableau 4) sont ajoutés à 20 ml de chyme ou de produit réhydraté contenant 360 ALU. Le mélange est ajusté à un pH de 7 à l'aide de NaOH 1 $mol.l^{-1}$ et 5 ml d'une solution de pancréatine porcine (P1750, Sigma-Aldrich, Lyon, France) à 800 unités TAME par millilitre sont ajoutés. De l'eau distillée est éventuellement ajoutée pour atteindre une dilution au demi du chyme. Des prélèvements réguliers sont de nouveau réalisés durant les 2 h de digestion intestinale. Après préparation des échantillons (paragraphe 3.2.2.2), ces derniers sont analysés par CLHP.

3.6.2. Modèle bi compartimenté semi-dynamique

Contrairement aux modèles statiques, les modèles dynamiques prennent en compte l'évolution, au cours de la digestion, des principaux phénomènes physicochimiques et mécaniques se produisant dans la lumière digestive (évolution du pH, transit gastro-intestinal…). Ces outils sont notamment utilisés dans le cadre d'études nutritionnelles (digestibilité des macronutriments,

bioaccessibilité des micronutriments…), toxicologiques (bioaccessibilité de xénobiotiques…) ou encore microbiologiques (survie de probiotiques ou de pathogènes…). Il existe un certain nombre de systèmes gastro-intestinaux dynamiques mais le TIM 1 (TNO Gastrointestinal Model 1) est l'un des plus complets et présente une bonne corrélation *in vitro*/*in vivo*. Il permet de simuler, en fonction de données *in vivo*, les paramètres essentiels de la digestion chez l'Homme à savoir : la température, le brassage du chyme, le temps de transit intestinal, la vidange gastrique et intestinale, l'évolution du pH gastro-intestinal, l'addition séquentielle des différentes sécrétions digestives, ainsi que l'absorption passive de l'eau et des produits de digestion par un système de dialyse.

Dans le cadre de notre application, l'objectif est de se rapprocher au mieux des conditions *in vivo* lors de l'étude de l'activité gastrique de l'enzyme AO. Cependant, les outils disponibles ne permettant pas d'étudier cette activité via un modèle aussi complexe que le TIM-1, seuls les paramètres essentiels seront retenus. Ainsi, les digestions gastrique et intestinale seront réalisées dans deux réacteurs à double parois indépendants, tous deux maintenus à 37 °C et munis d'un pH-mètre permettant le suivi et la régulation manuelle du pH. L'évolution du pH de la partie gastrique est la même que celle donnée en Tableau 5, tandis que le pH de la partie intestinale est maintenu constant à pH 7. L'addition des différentes sécrétions gastriques et intestinales est réalisée de façon séquentielle, chaque minute et manuellement selon les données issues de l'étude de Villemejane *et al.* (2015). Le brassage du chyme est obtenu par agitation magnétique du contenu des deux réacteurs. La vidange gastrique est quant à elle généralement modélisée selon l'équation de Elashoff *et al.* (1982). Il s'agit d'une équation exponentielle, donnant la part de contenu gastrique restant dans l'estomac à un moment t, dont l'équation est la suivante :

$$F = 2^{\left(\frac{t}{t_{1/2}}\right)^{\beta}}$$

Équation 6 : Équation de la vidange gastrique, d'après Elashoff *et al.* (1982)

Avec F : la proportion de chyme restant dans l'estomac au temps t

t : temps (min)

$t_{1/2}$: le temps de demi-vie de l'aliment étudié (min)

β : le coefficient décrivant l'allure de la courbe

Le temps de demi-vie et le coefficient β ont été mis en évidence *in vivo* pour une consommation de 395 ml de lait apportant 169 kcal par Vesa *et al.* (1997). Ces données sont celles se rapprochant le plus du produit étudié (celui-ci a une valeur énergétique de 204 kcal pour 250 ml).

Respectivement, les valeurs du temps de demi-vie et du coefficient β sont de 64 min et 3,2. Ces valeurs permettent l'obtention de la courbe représentant le volume vidangé en fonction du temps (Figure 6).

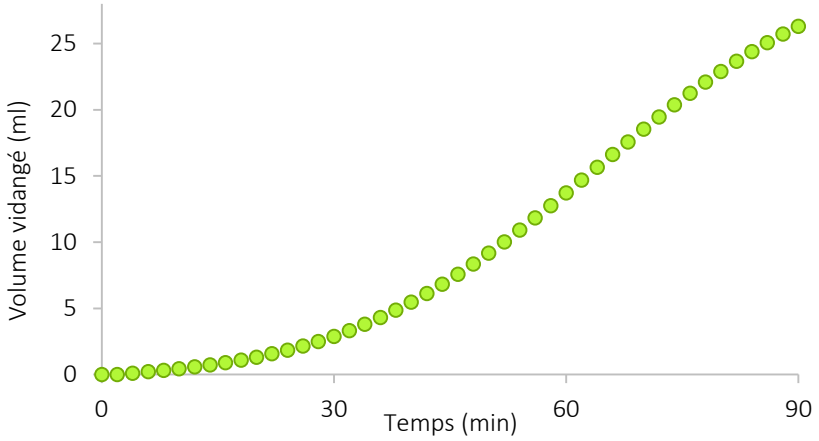


Figure 6 : Vitesse de vidange gastrique de 395 ml de lait apportant 169 kcal

Après absorption de 395 ml de lait, la vidange gastrique débute avec une phase de latence durant laquelle peu de produit est vidangé. Cette phase correspond à l'homogénéisation du contenu stomacal. Par la suite, une phase exponentielle est observée, suivie d'une phase stationnaire en fin de vidange gastrique.

Expérimentalement, 2,5 g de de formulation sèche contenant l'enzyme AO (450 ALU) sont réhydratés à l'aide de 25 ml de lait ½ écrémé et placés dans un réacteur à double paroi régulé à 37 °C. Immédiatement, 7,25 g de SSG (composition donnée en Tableau 6), ainsi que 1,25 g de solution de pepsine (pepsine porcine gastrique, Sigma) contenant 2080 $U.ml^{-1}$ et 1,25 g de solution de lipase (lipase, Amano) contenant 28 $U.ml^{-1}$ sont ajoutés au réacteur. Durant l'intégralité de la digestion gastrique, la solution de pepsine est ajoutée à un débit de 0,25 $ml.min^{-1}$. Selon le pH (donné en Tableau 5), la solution de lipase est apportée en alternance avec une solution d'HCl 0,6 $mol.l^{-1}$ à un débit de 0,25 $ml.min^{-1}$. En parallèle, le contenu du réacteur est vidangé manuellement chaque minute vers le réacteur intestinal selon la courbe donnée en Figure 6.

Tableau 6 : Composition des solutions salines gastriques et intestinales (modèle dynamique)

	Concentration de la SSG ($mmol.l^{-1}$)	Concentration de la SSI ($mmol.l^{-1}$)
KCl	14,8	8,0
$NaHCO_3$	2,0	-
NaCl	53,0	85,5
$CaCl_2$ ($2H_2O$)	1,0	2,0

Le chyme vidangé au niveau de l'estomac sera placé dans un second réacteur à double paroi régulé à 37 °C. En début de digestion, ce dernier contient 14,4 ml SSI (composition donnée en Tableau 6), 2 mg de trypsine (T9201, Sigma-Aldrich, Lyon, France) dissous dans 1 ml de SSI, 783 mg de pancréatine (P1750, Sigma-Aldrich, Lyon, France) dissous dans 2,2 ml de SSI et 616 mg de sels biliaires (B8756, Sigma-Aldrich, Lyon, France) dissous dans 15,4 ml de SSI. Au cours des 120 min de digestion intestinale, une solution biliaire (40 $mg.ml^{-1}$ durant les 30 premières minutes puis 20 $mg.ml^{-1}$ par la suite), une solution pancréatique (356 $mg.ml^{-1}$) et la SSI sont apportées à un débit respectif de 0,25, 0,50 et 0,25 $ml.min^{-1}$. Un prélèvement est effectué en fin de digestion intestinale et sa teneur en lactose est mesurée. Trois répétitions sont réalisées.

3.7. Enrobage de l'enzyme AO en lit fluidisé

3.7.1. Étude de la propension de l'enzyme à la fluidisation

Avant de débuter le procédé d'enrobage, la propension à la fluidisation de la poudre d'enzyme AO a été étudiée. Pour cela, un rhéomètre à poudres FT4 (Freeman Technology, Tewkesbury, Royaume-Uni) est utilisé (Figure 7).

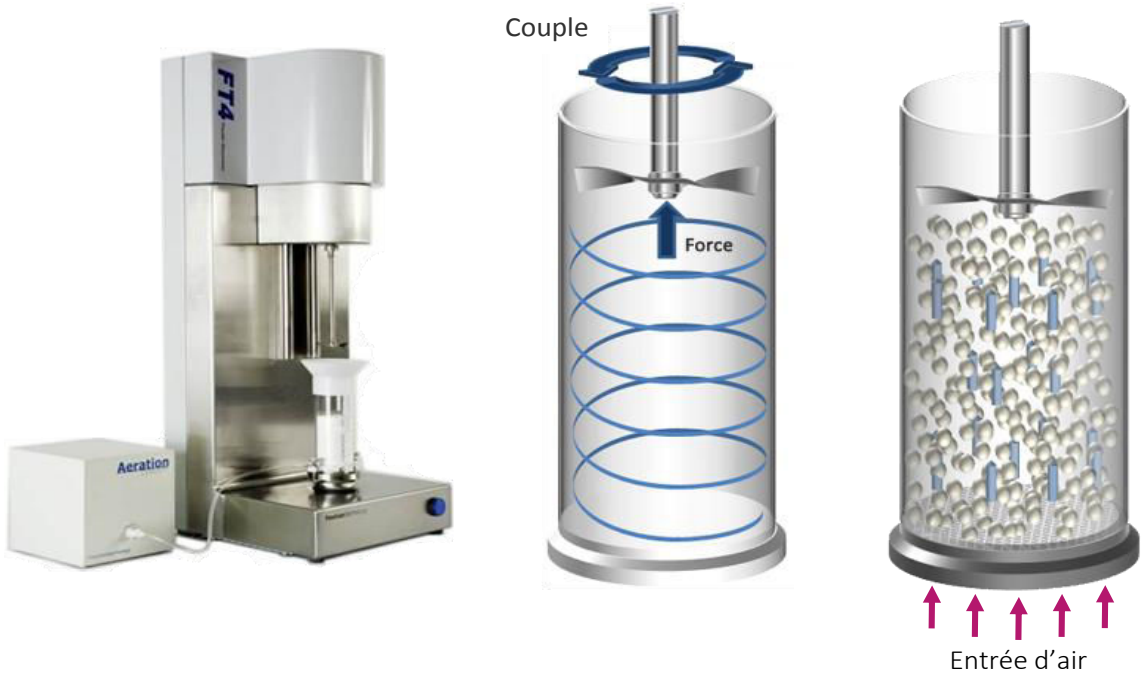


Figure 7 : Photographie du rhéomètre FT4 (gauche), principe de mesure de l'énergie de mélange du lit de poudre (milieu) et principe de mesure du programme « aération » (droite)

Globalement, cet appareil permet d'évaluer l'aptitude à l'écoulement des poudres dans différentes conditions (contraintes normales, flux d'air à différentes vitesses…) en déterminant

l'énergie nécessaire pour effectuer l'aller-retour d'une hélice dans le lit de poudre. Le calcul de l'énergie est effectué grâce à l'enregistrement de la force et du couple subis par l'hélice selon la hauteur du lit de poudre (Figure 7, milieu). Le rhéomètre FT4 possède un programme dédié à l'étude des caractéristiques de fluidisation. Il consiste à introduire de l'air à la base d'une colonne de poudre et à quantifier la perte de charge à travers le lit (Figure 7, droite). Pour notre application, environ 20 g de poudre sont placés dans le module dédié à l'aération et des vitesses d'air croissantes (comprises entre 0 et 160 $mm.s^{-1}$) sont appliquées. Entre chaque changement de vitesse d'air, l'appareil procède à une étape de conditionnement permettant de s'assurer de la stabilité de l'échantillon et de l'homogénéité de la distribution d'air de fluidisation. L'évolution de la perte de charge en fonction de la vitesse de fluidisation permettra de statuer quant à la capacité des enzymes à être fluidisées à l'aide du lit fluidisé Mini-Glatt.

3.7.2. Procédé d'enrobage

L'enrobage des enzymes est effectué à l'aide d'un lit fluidisé Mini-Glatt (Glatt GMbH, Allemagne) permettant le séchage, la granulation (procédé top-spray) et le pelliculage (procédé Würster) de molécules d'intérêt (Figure 8).

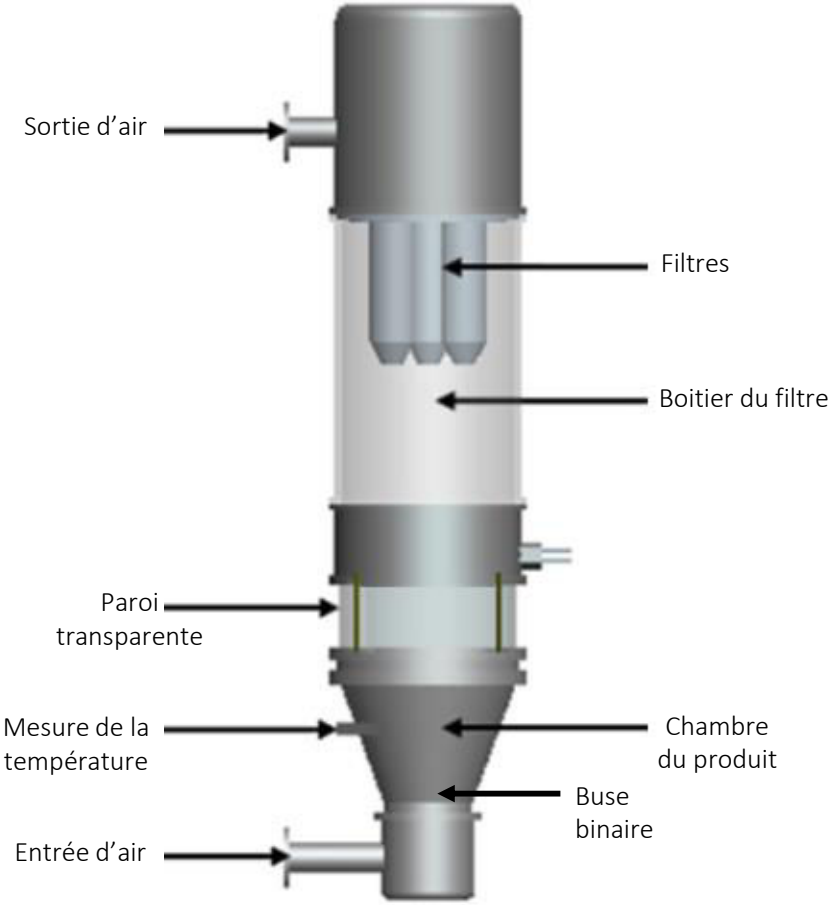


Figure 8 : Schéma du lit fluidisé Mini-Glatt, adapté de Chen *et al.* (2009)

Le procédé Würster, utilisé pour cette étude, présente un réservoir à matière particulier : ce dernier est muni d'un tube central permettant une montée rapide de la poudre à enrober sous forme de tourbillon et une retombée lente à l'extérieur.

Expérimentalement, 25 g de la poudre à enrober (enzyme AO) sont placés dans la chambre. Le flux d'air de fluidisation est maintenu au minimum de fluidisation du lit, à savoir 0,1 $m.s^{-1}$ (mesure réalisée grâce à un compteur gaz G4 (Dupont-Est, Maxéville, France) branché en sortie de lit). Un thermostat maintient la température de l'air à la valeur de consigne, à savoir 60 °C dans le cas des solutions d'enrobage aqueuses et 50 °C dans le cas des solutions à base d'éthanol. Durant la période de chauffe, l'air est directement conduit par une dérivation vers le système d'évacuation. Lorsque la température de consigne est atteinte, le flux d'air est rétabli dans le lit et la poudre est fluidisée. La solution d'enrobage est acheminée jusqu'à la buse binaire à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit de 1 $ml.min^{-1}$. La pression de l'air de pulvérisation, réglée par un manostat, est quant à elle maintenue à 2 bars.

La composition des différentes matrices utilisées est présentée dans le Tableau 7. Pour les matrices à base de caséines micellaires (CM), la solution est mise sous agitation durant 2 h à température ambiante puis durant 12 h à 4 °C. Pour les matrices à base de zéine, la solution est placée sous agitation, à température ambiante, 30 min avant le début de l'enrobage. Les matrices utilisées présentent toutes un taux de matière sèche de 10 %. Seuls la durée d'enrobage, et donc le ratio préparation enzymatique/matrice d'enrobage, diffèrent. Ainsi, après enrobage des 25 g d'enzyme AO avec une matrice composée de 5 g de poudre (zéine ou CM) et de 50 ml de solvant, Il y a un accroissement de 20 % de la masse sèche de la préparation finale. Dans le cas de l'enrobage avec une solution contenant 10 g de poudre et 100 ml de solvant, l'accroissement de la masse sèche de la préparation est de 40 %. Les différentes poudres obtenues après enrobage seront donc nommées sur cette base telle que détaillée dans la première colonne du Tableau 7.

Tableau 7 : Composition des matrices d'enrobage

	Composé principal		Solvant		Composé secondaire	
	Nature	Masse (g)	Nature	Volume (ml)	Nature	Masse (g)
CM 20 %	CM	5	Eau	50	-	-
CM 40 %	CM	10	Eau	100	-	-
Zéine 20 %	Zéine	5	Ethanol	50	-	-
Zéine 40 %	Zéine	10	Ethanol	100	-	-
Zéine 40 % + glycérol	Zéine	10	Ethanol	100	Glycérol	1

4. Méthodes propres à l'étude des préparations amylacées

L'étude des préparations amylacées a impliqué le recours à des techniques d'analyse rhéologique et thermique spécifiques. Le principe de ces dernières, ainsi que les conditions d'essai, sont par conséquent détaillés dans ce paragraphe. Dans le même temps, la méthode permettant d'évaluer leur digestibilité *in vitro* est décrite.

4.1. Matériel

Sept types d'amidon utilisés habituellement par l'industriel finançant ce projet sont étudiés. L'amidon de pomme de terre, de blé, de maïs, de maïs cireux et de riz proviennent de Sigma-Aldrich (Lyon, France). L'amidon de manioc (C CreamGel, Cargill) a été gracieusement fourni par Arlès Agroalimentaire (Rognac, France). Enfin, l'amidon de riz cireux (Remyline XS, Beneo) a été gracieusement fourni par Beneo (Tienen, Belgique).

4.2. Caractérisation rhéologique et thermique

4.2.1. Analyses rhéologiques

Le test viscoélastique le plus puissant et le plus fréquemment utilisé est l'analyse oscillatoire, aussi appelée dynamique. Il consiste à imposer à l'échantillon un cisaillement oscillatoire durant lequel la contrainte et la vitesse de cisaillement évoluent sinusoïdalement avec la même pulsation mais en présentant un certain déphasage l'une par rapport à l'autre. L'analyse de ces signaux sinusoïdaux permet de définir un certain nombre de grandeurs viscoélastiques dynamiques caractéristiques de l'échantillon. Le déphasage δ correspond au déphasage entre la contrainte et la déformation de cisaillement. Dans la pratique, le module de conservation G' et le module de perte G'' sont les deux principales grandeurs fondamentales utilisées en rhéologie dynamique. Ces deux grandeurs sont exprimées en Pascal et décrivent respectivement les propriétés élastiques et visqueuses d'un échantillon. Le déphasage δ est relié à ces deux modules par la relation : $\tan \delta = G''/G'$. Il peut ainsi varier de 0° (solide élastique, G''= 0) à 90° (liquide visqueux, G'= 0). La valeur de δ (aussi appelé angle de perte) indique ainsi le partage entre les propriétés élastiques et visqueuses de l'échantillon : pour $0° < \delta < 45°$ l'échantillon a un comportement plus élastique que visqueux alors que c'est l'inverse pour $45° < \delta < 90°$ (Grossiord et Quemada, 2002).

Les mesures ont été réalisées grâce au rhéomètre rotationnel Kinexus Pro (Malvern Instruments, Worcestershire, Royaume-Uni). L'appareil est équipé d'un système cône-plan d'un diamètre de 4 cm et formant un angle de 2°. Il est utilisé en mode oscillatoire à une fréquence de 1 Hertz et à une contrainte de 0,5 %. Des suspensions aqueuses d'amidon concentrées à 2,5 % (m/v) sont soumises à une rampe de température de 30 à 90 °C à une vitesse de 3 $°C.min^{-1}$. Grâce à l'effet Peltier, la montée et la descente en température sont particulièrement rapides et précises

(± 0,01 °C). Les modules d'élasticité (G') et de viscosité (G'') ont été enregistrés en fonction du temps et de la température. Trois répétitions sont effectuées.

4.2.2. Calorimétrie différentielle à balayage

Lorsqu'un système subit une réaction de transformation sous l'effet d'un programme de chauffage ou de refroidissement, sa température évolue différemment de celle d'un matériau inerte à la chaleur. La calorimétrie différentielle permet de mesurer la différence de température (ΔT) qui s'établit entre le matériau qui réagit (l'échantillon e) et le matériau inerte (la référence r). Cela permet notamment la mise en évidence de phénomènes endothermiques (comme la fusion) et de phénomènes exothermiques (tels que la cristallisation) (Relkin, 2006).

Expérimentalement, une suspension aqueuse d'amidon (25 %) est placée dans une capsule d'aluminium hermétiquement scellée. Cette dernière est introduite dans un calorimètre à balayage différentiel 204 F1 (Netzsch, Phoenix, États-Unis). Les échantillons sont chauffés de 30 à 90 °C à une vitesse de 3 °C.min^{-1}. Directement après la fin de l'analyse, les capsules sont stockées durant 24 h à 4 °C. À la fin des 24 h, une nouvelle montée en température, identique à la précédente, est réalisée. La température et la mesure d'enthalpie sont calibrées avec de l'indium (ΔH = 28,43 J.g^{-1}) et une capsule vide est utilisée comme référence. Le logiciel Proteus (Netzsch, Phoenix, États-Unis) est utilisé pour déterminer les températures de début, de pic et de fin de gélatinisation, ainsi que l'enthalpie de gélatinisation.

4.3. Digestibilité *in vitro*

La vitesse de digestion, et donc d'absorption, des glucides est connue pour influencer la santé des consommateurs. Un certain nombre de travaux suggèrent en effet que les glucides lentement digestibles présentent un effet protecteur vis-à-vis de certaines maladies occidentales non transmissibles (FAO/WHO, 1998 ; Willett, 1998). Ainsi, la procédure d'analyse décrite dans ce paragraphe vise à quantifier les différentes fractions d'amidon (rapidement digestible, lentement digestible et résistante à la digestion) par hydrolyse enzymatique et quantification du glucose (Englyst *et al.*, 1992). Les échantillons sont d'abord incubés en présence de pepsine de façon à cliver les liaisons amidon-protéines. Ils sont ensuite placés en présence d'un cocktail d'enzymes amylolytiques dans des conditions de pH, de température, de viscosité et d'agitation contrôlées. Des prélèvements sont effectués au bout de 20 et 120 min et permettent de déterminer respectivement les fractions d'amidon rapidement et lentement digestibles. L'amidon résistant

restant est ensuite dispersé avant hydrolyse enzymatique de façon à déterminer la teneur totale en glucose de l'échantillon. En parallèle, le glucose libre de l'échantillon est quantifié.

Plus précisément, pour simuler la digestibilité des produits de type 1 et 2, 0,6 g d'amidon sont pesés. Pour simuler la digestibilité des produits de type 3 et 4, 6,25 g d'amidon sont placés dans 250 ml d'eau. Le mélange est mis sous agitation durant 30 s, puis traité thermiquement en four à micro-ondes de laboratoire (Mars 6, CEM Corporation, États-Unis) selon le traitement de référence (800 W - 2 min). Un prélèvement de 4,8 ml est réalisé. Pour simuler la digestibilité des produits de type 3, la digestibilité du prélèvement est directement mesurée. Pour simuler la digestibilité des produits de type 4, le prélèvement est placé durant 24 h à 4 °C puis analysé. La dilution effectuée pour la digestibilité des produits de type 3 et 4 est prise en compte ultérieurement dans les calculs. Ainsi, 0,6 g d'amidon ou le prélèvement de 4,8 ml sont additionnés à 10 ml d'une solution d'HCl à 0,05 $mol.l^{-1}$ contenant 23700 unités de pepsine (EC 3.4.23.1) (P7000, Sigma-Aldrich, Lyon, France) et 0,05 g de gomme de guar (G4129, Sigma-Aldrich, Lyon, France). Cette suspension est incubée à 37 °C durant 30 min. 5 ml d'un mélange enzymatique aqueux contenant 187500 unités d'amylase apportées par la pancréatine (P7545, Sigma-Aldrich, Lyon, France), 65,6 unités d'amyloglucosidase (AGU) (EC 3.2.1.3) (A7095, Sigma-Aldrich, Lyon, France) et 937,5 unités d'invertase (EC 3.2.1.26) (I4504, Sigma-Aldrich, Lyon, France), ainsi que 10 ml d'une solution d'acétate de sodium à 0,25 $mol.l^{-1}$ sont ensuite ajoutés. La solution ainsi obtenue est placée à 37 °C dans un bain-marie agité à 200 tours par minute avec un barreau aimanté. Au bout de 20 min (G20) et 120 min (G120), un échantillon de 0,5 ml est prélevé et placé dans 20 ml d'éthanol à 66 %. La solution restante est incubée durant 30 min à 100 °C puis placée dans un bain d'eau glacée sous agitation en présence de 10 ml d'une solution de KOH 7 $mol.l^{-1}$ durant 30 min. Un échantillon (1 ml) est alors transféré dans 10 ml d'une solution d'acide acétique à 0,5 $mol.l^{-1}$ et 0,2 ml d'une solution d'amyloglucosidase à 50 $U.ml^{-1}$. Le mélange est incubé durant 30 min à 70 °C puis durant 10 min à 100 °C. Après refroidissement, 40 ml d'eau sont ajoutés au mélange. Ce mélange correspond à l'échantillon de glucose total (GT). Parallèlement à cela, le glucose libre (GL) dans l'échantillon de départ (amidon) est quantifié. Ainsi, 0,6 g d'amidon est placé dans 25 ml d'une solution d'acétate de sodium à 0,1 $mol.l^{-1}$. La suspension est incubée à 100 °C durant 30 min. Après refroidissement, 0,2 ml de la solution d'invertase à 3000 $U.ml^{-1}$ est ajouté et le mélange est incubé à 37 °C durant 30 min dans un bain d'eau sous agitation. Après ajout d'éthanol à 66 % pour stopper la réaction enzymatique, la solution est centrifugée puis diluée à l'aide d'eau. Elle correspond à la fraction de GL.

Les différents échantillons obtenus précédemment (G20, G120, GT et GL) sont centrifugés à 500 *g* durant 5 min. Par la suite, 100 µl sont prélevés et placés dans 2 ml d'une solution de glucose oxydase/peroxydase préparée selon les instructions du fournisseur du kit de détermination du D-glucose (GOPOD Format, Megazyme International, Irlande). Le mélange est placé durant 20 min à 37 °C. L'absorbance des différents échantillons est lue contre le blanc réactif à 510 nm. En prenant en compte les différentes dilutions, la concentration en glucose (g pour 100 g de produit) peut ensuite être déterminée. Un facteur de 0,9 est appliqué de façon à convertir la concentration de glucose en concentration d'amidon. Par la suite, les différentes fractions d'amidon sont déterminées selon les équations suivantes :

$$\text{Amidon rapidement digestible} = 0{,}9 \times (G20 - GL)$$

Équation 7 : Calcul de la part d'amidon rapidement digestible

$$\text{Amidon lentement digestible} = 0{,}9 \times (G120 - G20)$$

Équation 8 : Calcul de la part d'amidon lentement digestible

$$\text{Amidon résistant} = 0{,}9 \times (GT - G120)$$

Équation 9 : Calcul de la part d'amidon résistant

5. Méthodes propres à l'étude des préparations protéiques

Ce paragraphe se propose d'expliciter les méthodes d'analyse propres à l'étude des préparations protéiques. Ainsi, les méthodes permettant le calcul de l'indice chimique et du score chimique corrigé de la digestibilité sont détaillées. Par la suite, les techniques utilisées pour suivre la digestion des préparations protéiques (SDS-PAGE notamment) sont décrites.

5.1. Matériel

Les préparations protéiques étudiées ont été fournies par la société finançant ce projet. Il s'agit des préparations les plus couramment employées pour la formulation de leurs produits. Ainsi, une poudre de caséinate de calcium, un concentrat de protéines de lait, une poudre de blanc d'œuf pasteurisé, un isolat de protéines de pois, un concentrat de protéines sériques et un isolat de protéines de soja seront étudiés.

5.2. Évaluation de la qualité des préparations protéiques

5.2.1. Composition en acides aminés

La composition en acides aminés des différentes préparations protéiques a été donnée par le fournisseur.

5.2.2. Évaluation de la digestibilité par une méthode multienzymatique

Il existe un certain nombre de méthodes *in vitro* permettant d'évaluer la digestibilité des protéines. La méthode utilisée dans ce travail consiste à additionner une préparation enzymatique contenant de la trypsine, de la chymotrypsine et une peptidase à une solution protéique à pH 8 (Hsu *et al.*, 1977). La diminution du pH du milieu, liée à la libération de protons, est suivie durant 10 min quel que soit l'échantillon. Une corrélation permet par la suite de relier la valeur de pH obtenue à la fin de la réaction à la valeur de digestibilité de la protéine.

Plus précisément, pour simuler la digestibilité des produits de type 1 et 2, une solution protéique est préparée en plaçant 0,3125 g de la protéine native à étudier dans 50 ml d'eau (soit 6,25 $mg.ml^{-1}$). Dans le but d'évaluer l'intérêt d'ajouter de la bromélaïne (extrait brut d'ananas qui améliorerait la digestibilité des protéines et limiterait les inconforts digestifs) aux produits, 0,0144 g (soit environ 1 405 150 unités) de bromélaïne issue de tige d'ananas (Amano Enzyme, Japon) sont additionnés à la préparation protéique précédemment décrite. Pour simuler la digestibilité des produits de type 3 et 4, une solution protéique est préparée en plaçant 19,5 g de protéines dans 250 ml d'eau. Le mélange est placé sous agitation durant 30 s puis traité thermiquement en four à micro-ondes (Mars 6, CEM Corporation, États-Unis) selon le traitement de référence (800 W - 2 min). La solution est ensuite diluée de façon à obtenir 50 ml de solution protéique à 6,25 $mg.ml^{-1}$. Dans un second temps, la présence de lactose dans les produits réhydratés pouvant entrainer la formation de composés de Maillard durant le traitement thermique (et donc affecter

la digestibilité du produit) le même protocole que précédemment est suivi, excepté que 12 g de lactose sont ajoutés aux 250 ml de solution protéique. Là encore, la solution obtenue après traitement thermique est diluée de façon à obtenir 50 ml de solution 6,25 $mg.ml^{-1}$. Les solutions ainsi obtenues sont ajustées à un pH de 8 par ajout de NaOH 0,1 $mol.l^{-1}$ et sont ensuite équilibrées à 37 °C durant environ 10 min. Parallèlement à cela, une préparation enzymatique est préparée en plaçant 113520 unités de trypsine, 930 unités de chymotrypsine et 0,26 unités de carboxypeptidase dans 5 ml d'eau. Cette suspension est préparée au dernier moment, ajustée à un pH de 8 à l'aide de NaOH 0,1 $mol.l^{-1}$ et maintenue dans la glace. Après addition de la préparation enzymatique à la solution protéique, le pH est suivi durant les 10 min de réaction à 37 °C sous agitation. Le pH final permet ensuite de calculer la digestibilité de la protéine grâce à l'Équation 10:

$$\text{Digestibilité (\%)} = 210{,}464 - 18{,}103 \times pH_f$$

Équation 10 : Calcul de la digestibilité des protéines

Avec pH_f : le pH atteint au bout des 10 min d'incubation

5.2.3. Calcul de l'indice chimique et du SCCD

L'indice chimique est calculé en divisant la quantité de chaque acide aminé essentiel contenu dans la protéine par la quantité de chaque acide aminé correspondant de la protéine de référence. Les valeurs de la protéine de référence pour un adulte sont données par la FAO (2013). Le SCCD est ensuite calculé en multipliant l'indice chimique de l'acide aminé essentiel le plus limitant par la digestibilité de la protéine.

5.3. Suivi de la digestion des préparations protéiques

5.3.1. Digestion *in vitro*

La digestion gastro-intestinale *in vitro* des protéines est réalisée exactement selon le protocole donné par le consensus international détaillé et commenté dans ce chapitre, paragraphe 1.4. Brièvement, 11,25 ml de SSG (composition donnée en Tableau 3), ainsi que 2,4 ml d'une solution de pepsine à 25000 $U.ml^{-1}$ (P6887, Sigma-Aldrich, Lyon, France) et 7,5 µl d'une solution de $CaCl_2$ à 0,3 $mol.l^{-1}$ sont placés dans un réacteur sous agitation maintenu à 37 °C. Parallèlement à cela, 0,597 g d'isolat de protéine sont placés dans 15 ml d'eau distillée puis ajoutés au réacteur. Le contenu est alors ajusté à un pH de 3 par ajout d'une solution d'HCl à 1 $mol.l^{-1}$ puis maintenu durant

2 h à cette valeur. Des prélèvements successifs de 1 ml (0, 30, 60 et 120 min) sont réalisés et placés dans 1 ml de TCA à 40 %.

Au bout de 120 min de digestion gastrique, 14,3 ml de SSI, 6,5 ml d'une solution de pancréatine (P1750, Sigma-Aldrich, Lyon, France) à 800 unités de trypsine, 2,6 ml d'une solution d'acides biliaires (B8756, Sigma-Aldrich, Lyon, France) à 160 mmol.l^{-1} et 52 µl de $CaCl_2$ (0,3 mol.l^{-1}) sont ajoutés au réacteur. Le pH est ajusté à une valeur de 7 par ajout d'une solution de NaOH à 1 mol.l^{-1} puis maintenu à cette valeur durant 2 h. Deux prélèvements (60 et 120 min) sont réalisés en plaçant 1 ml d'échantillon dans 1 ml de TCA 40 %.

5.3.2. SDS PAGE

La SDS-PAGE-trycine est couramment utilisée pour séparer les protéines ayant une taille comprise entre 1 et 100 kDa, et plus particulièrement inférieure à 30 kDa. Avant dépôt, les échantillons sont centrifugés (5 min - 13400 *g*) et le surnageant est éliminé. Le culot est repris dans 200 µl d'acétone froid et l'échantillon est de nouveau centrifugé (5 min - 13400 *g*). Ce lavage est répété deux fois. Le culot, qui contient 1 mg de protéines, est additionné de 400 µl d'eau et 100 µl de tampon de solubilisation réducteur. La solution est ensuite traitée thermiquement durant 10 min à 90 °C puis 10 µl sont déposés. Pour la préparation de la SDS-PAGE, le protocole de Schägger (2006) est suivi. Le gel de séparation est constitué à 16 % d'acrylamide, contre 4 % pour celui de concentration.

5.3.3. Ninhydrine

Contrairement à la SDS-PAGE qui permet seulement le suivi de l'hydrolyse des protéines et des peptides de plus de 3 kDa, la réaction à la ninhydrine permet de quantifier les petits peptides et les acides aminés libérés durant la digestion. La ninhydrine est un puissant agent d'oxydation qui provoque une oxydation désaminante de la fonction α amino. Parmi les produits de réaction, de l'hydrindantine, ainsi que de l'ammoniac sont libérés. Ils réagissent ensuite avec une autre molécule de ninhydride pour former une molécule de couleur bleu-violet (le pourpre de Ruhemann) quantifiable par spectrophotométrie à 570 nm.

Expérimentalement, les échantillons sont centrifugés à 10000 *g* durant 20 min à 4 °C. Ils sont ensuite dilués (2 : 1 (v/v)) à l'aide d'acide sulfosalicylique à 6 % et de nouveau centrifugés à 10000 *g* durant 20 min à 4 °C. Cela permet l'élimination de la matière grasse éventuelle. Le surnageant est filtré à travers un filtre de 0,45 µm de façon à éliminer les molécules supérieures à

10 kDa puis dilué dans de l'eau en fonction de sa teneur en acides aminés. L'échantillon dilué (1 ml) est additionné à 0,5 ml d'une solution de ninhydrine (Sigma-Aldrich, Lyon, France) et le mélange placé durant 10 min exactement dans un bain sec maintenu à 100 °C. Après incubation, 2,5 ml d'éthanol à 95 % sont ajoutés et l'absorbance est lue à 570 nm. La teneur en acide aminé est exprimée en équivalent leucine. Trois répétitions sont effectuées.

6. Traitements statistiques

Le traitement statistique des données est réalisé à l'aide du logiciel KyPlot version 2.0. Pour les comparaisons par paire, une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur est réalisée. Pour les comparaisons multiples, un test multiparamétrique est effectué. Le niveau de signification est ***$p < 0,001$; **$p < 0,01$; *$p < 0,05$ et NSP $> 0,05$.

Chapitre 2 : Développement d'une formulation adaptée aux intolérants au lactose

1. Digestion du lactose : étude bibliographique 69

1.1. Le lactose 70

1.2. L'intolérance au lactose 72

1.3. Seuil de tolérance et sévérité de l'intolérance au lactose 79

1.4. Les solutions apportées 84

1.5. Conclusion 91

2. Étude de β-galactosidases 93

2.1. Les β-galactosidases : étude bibliographique 94

2.2. Résultats et discussion 102

2.3. Conclusion 122

3. Protection des β-galactosidases par encapsulation 125

3.1. Protection des β-galactosidases : étude bibliographique 126

3.2. Résultats et discussion 161

3.3. Conclusion 173

4. Conclusion du chapitre 175

1. Digestion du lactose : étude bibliographique

La réduction, génétiquement programmée, de l'activité de la lactase à l'âge adulte affecte 70 % de la population mondiale. Elle peut causer de sévères troubles digestifs, signes cliniques de l'intolérance au lactose. Ces symptômes varient en fonction de l'activité résiduelle de la lactase, de la durée du transit gastro-intestinal et principalement de la quantité de lactose ingérée. Pour formuler des produits adaptés à la grande majorité des intolérants au lactose, il est essentiel de mettre en évidence le seuil de tolérance au lactose. Il s'agit de l'un des objectifs de l'étude bibliographique présentée ci-après. Le second objectif de cette étude est de mettre en évidence les différents moyens actuellement employés pour lutter contre l'intolérance au lactose et de sélectionner le plus adapté à notre produit.

1.1. Le lactose

Le lactose, ou β-D-galactopyranosyl-(1-4)-D-glucopyranose, est un diholoside composé d'une molécule de D-glucose et d'une molécule de D-galactose, reliées entre elles par une liaison β-1-4 (Figure 9).

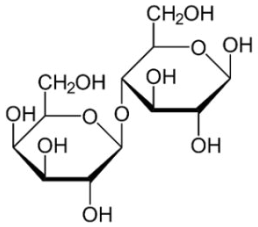


Figure 9 : Structure du lactose

Naturellement, le lactose est uniquement présent dans le lait des mammifères. Il est synthétisé dans les cellules épithéliales mammaires à partir de deux molécules de glucose issues du sang. L'une d'entre elles est épimérisée en galactose via la voie métabolique de Leloir. La molécule de galactose ainsi formée est ensuite phosphorylée et condensée par l'action de la galactosyltransférase, dont l'activité est modifiée et contrôlée par l'une des principales protéines du lait : l'α-lactalbumine. Cette protéine permet de réduire de 1000 fois la constante de Michaëlis de phosphorylation et de condensation. La concentration massique en lactose du lait bovin est d'environ 4,8 % et varie légèrement selon le stade de lactation (Fox *et al.*, 2015).

D'un point de vue chimique, le lactose est un sucre réducteur : l'ouverture du cycle du glucose au niveau du carbone anomérique permet la libération d'un groupement aldéhyde. Le lactose peut par conséquent être impliqué dans des réactions de Maillard, dont résultent des composés aromatiques et colorés. Bien que ce type de réaction soit recherché dans l'élaboration de bon nombre de produits alimentaires (pain, cuisson de la viande…), elle apparaît souvent comme un défaut dans le cas de produits laitiers. Lorsque le cycle de glucose se referme (par reformation de la liaison hémiacétale), le groupement hydroxyle peut se repositionner de deux façons par rapport au carbone du groupement carbonyle. Cela entraine la formation de deux isomères de lactose appelés α et β. Ces deux isomères présentent des propriétés différentes (solubilité dans l'eau, pouvoir rotatoire…). Le ratio α/β à l'équilibre est d'environ 1 pour 1,7, et la forme α est la plus couramment commercialisée. Du fait de traitements enzymatiques ou chimiques, le lactose peut subir des modifications structurales (oxydation, réduction, hydrolyse…). Il peut aussi être converti, suite à un traitement thermique, en lactulose (la molécule de glucose est convertie en fructose) ou en épilactose (la molécule de glucose est convertie en mannose) (Fox *et al.*, 2015).

Dans le domaine alimentaire, le lactose constitue une source calorique essentielle pour le nouveau-né et il est aussi retrouvé quotidiennement dans l'alimentation des adultes. Le lactose ne peut cependant pas être absorbé par l'organisme, il doit préalablement être hydrolysé en une molécule de glucose et une molécule de galactose par une enzyme ancrée au niveau de la bordure en brosse des entérocytes, la lactase-phlorizine hydrolase (LPH) (Marteau et Marteau, 2005). Le glucose et le galactose sont ensuite transportés à travers la membrane des entérocytes et rejoignent la circulation sanguine grâce à un transporteur sodium-dépendant. Cependant, chez certains sujets, l'activité enzymatique de la LPH décroît avec l'âge. Une partie du lactose ingéré atteint alors le côlon où il est fermenté par le microbiote intestinal, ce qui peut entrainer de nombreux symptômes cliniques (vomissements, diarrhées, flatulences, maux de tête…).

1.2. L'intolérance au lactose

1.2.1. Déficit en lactase, malabsorption et intolérance au lactose : terminologie

La LPH (EC 3.2.1.108) est une disaccharidase sécrétée au niveau des microvillosités de la membrane des cellules épithéliales de l'intestin grêle des mammifères (Plimmer, 1906). Elle est ancrée dans la membrane par son extrémité C-terminale et la majeure partie de la molécule est projetée au niveau du lumen intestinal. La LPH est une grande glycoprotéine, comportant deux sites actifs qui peuvent catalyser l'hydrolyse d'une variété de β-glucosides (phlorizine par exemple) et de β-galactosides, incluant le lactose. La LPH est encodée par un gène unique (LCT) d'approximativement 50 kb, localisé sur le chromosome 2 (Shatin, 1968). Chez l'Homme, cette enzyme est synthétisée sous forme d'un précurseur de 1927 acides aminés, dont les 19 premiers acides aminés forment la séquence signale clivée au niveau du réticulum endoplasmique. La pro-LPH résultant de ce clivage est ensuite glycosylée au niveau de l'appareil de Golgi (Ouwendijk, 1998). Le bon déroulement de cette glycosylation est crucial à l'activité enzymatique de la lactase (Jacob *et al.*, 2000). Un autre clivage entraine la formation d'un profragment (LPH α), enzymatiquement inactif, ainsi qu'un fragment de 160 kDa (LPH β) (Ouwendijk, 1998). La LPH β est une dernière fois clivée, au niveau de la membrane apicale, par la trypsine luminale pour aboutir à la forme intestinale (Figure 10).

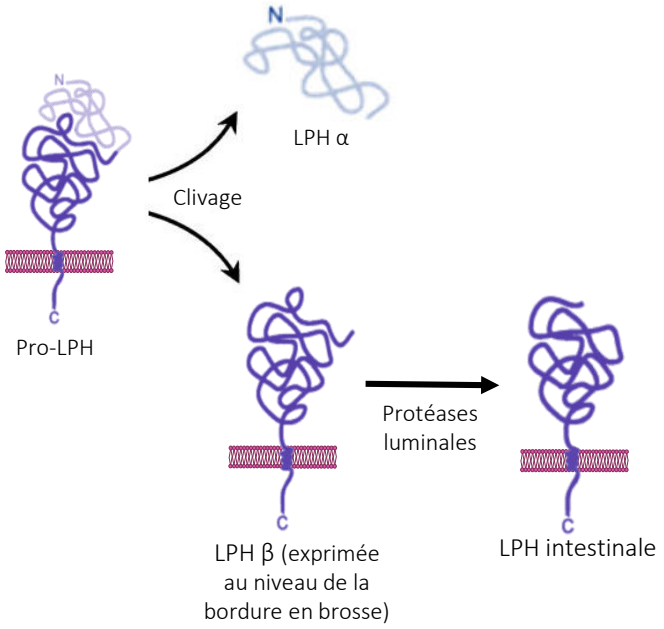


Figure 10 : Mécanisme permettant l'obtention de la LPH intestinale, adapté de Ouwendijk (1998)

Le déficit en lactase peut avoir une cause génétique (déficit primaire) ou être dû à une maladie (déficit secondaire) (Figure 11).

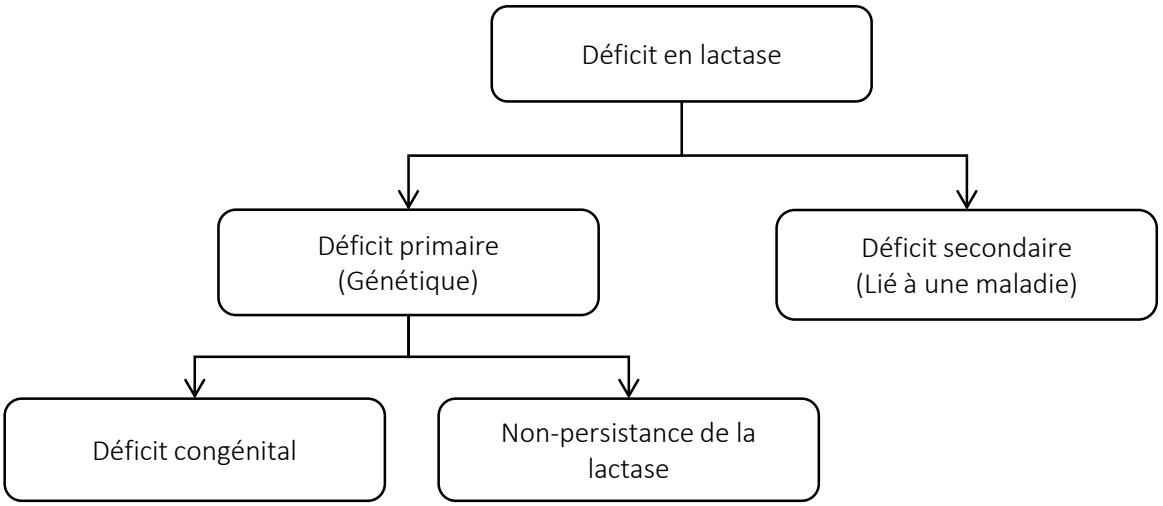


Figure 11 : Différents types de déficits en lactase

Le déficit secondaire en lactase est dû à une maladie ou à un traitement altérant la muqueuse intestinale (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, chimiothérapie…). Cette forme est seulement temporaire : l'activité lactasique réapparaît dès guérison (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2010). En général, de telles altérations affectent aussi l'activité d'autres disaccharidases sécrétées au niveau de la bordure en brosse de la muqueuse intestinale (Flatz, 1987).

Deux formes de déficit primaire sont rencontrées. La plus sévère, le déficit congénital en lactase, est liée à un trouble autosomique récessif rare qui touche les nouveau-nés (Berg *et al.*, 1969). La cause la plus courante d'un tel déficit est l'apparition prématurée d'un codon stop (dont résulte une protéine tronquée) du fait d'une mutation faux-sens dans la région codante, d'une duplication de l'exon ou du décalage du cadre de lecture. Le traitement consiste en une élimination rapide du lactose alimentaire permettant de limiter la déshydratation et la perte en électrolytes (Diekmann *et al.*, 2015). La non-persistance de la lactase, ou hypolactasie, est la moins sévère et la plus répandue des deux formes. Elle consiste en une baisse programmée de l'activité de la lactase intestinale après sevrage. Cette forme est celle étudiée dans la suite de ce document.

La malabsorption du lactose correspond, quant à elle, à l'absence d'hydrolyse du lactose ingéré au niveau de l'intestin grêle, qui atteint alors le côlon. Un déficit en lactase entraine généralement une malabsorption (Wilt *et al.*, 2010).

Enfin, l'intolérance au lactose correspond à la réponse symptomatique de l'expression clinique de la malabsorption du lactose (diarrhées, douleurs abdominales, flatulences…) (Lomer *et al.*, 2008). Cette expression clinique dépend notamment de la quantité de lactose mal absorbée. Si de petites quantités de lactose sont ingérées, les signes cliniques sont limités, voire absents. Ainsi, un certain nombre de sujets souffrant d'intolérance au lactose l'ignore (Flatz, 1987).

1.2.2. Le déficit en lactase : prévalence et génétique

La synthèse de la lactase est substantielle au cours de la première année de vie. Après cette période, les sujets présentant une non-persistance de la lactase subissent une réduction de sa synthèse. Cette réduction débute généralement à 2 ou 3 ans et se poursuit jusqu'à l'âge de 5 à 10 ans. Toutefois, des exceptions ont été rapportées : la réduction se produit par exemple au cours de l'adolescence chez les jeunes finlandais (Swallow, 2003). Seulement 5 à 10 % de l'activité initiale est conservée, même dans le cas d'une poursuite de la consommation de produits laitiers (Paige, 2005). La prévalence de ce déficit est étroitement liée à l'ethnicité (Figure 12) et plus particulièrement aux traditions d'élevage (Welsh *et al.*, 1978). Globalement, la prévalence est faible chez les individus descendant d'Europe du Nord (15 %), moyenne pour les africains, latinos, européens de l'est et sud-américains (70 - 80 %), et importante dans la population asiatique (proche de 100 %) (Paige, 2005).

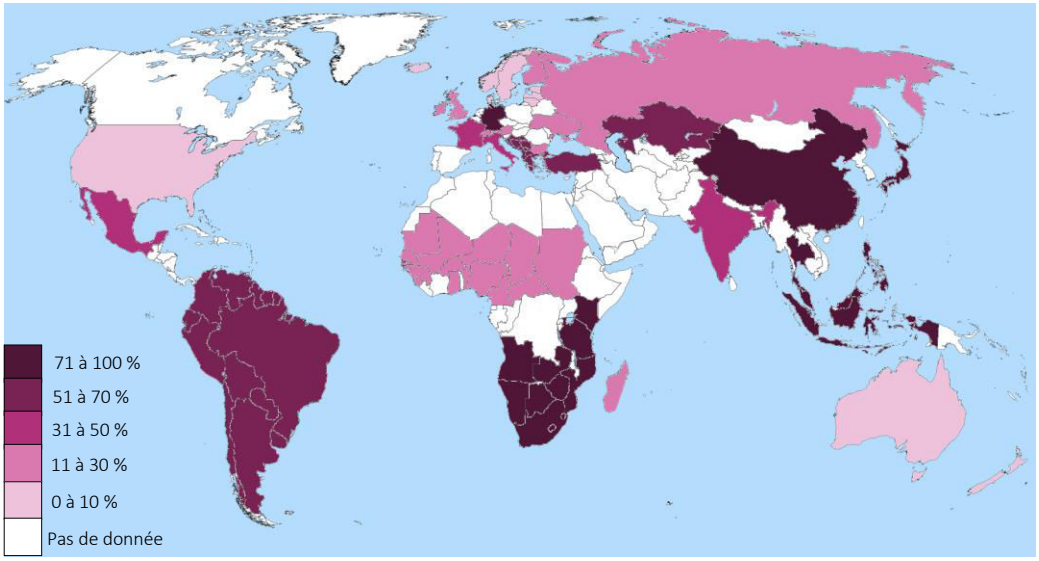


Figure 12 : Répartition de la population intolérante au lactose à travers le monde, adapté de Grosvenor et Smolin (2009)

Des études familiales ont permis de mettre en évidence que le caractère persistant ou non de la lactase était lié à un polymorphisme génétique : les adultes présentant une non-persistance

de la lactase sont homozygotes pour un allèle récessif causant le déclin post-sevrage, tandis que les adultes présentant une persistance de la lactase sont hétérozygotes ou homozygotes pour l'allèle dominante. En effet, la moitié de l'activité lactasique étant suffisante pour digérer correctement le lactose, la persistance de la lactase se comporte comme un trait dominant. Cependant, comme la LPH intestinale n'est pas présente en vaste excès, les sujets hétérozygotes peuvent être plus enclins à devenir intolérants au lactose en cas de stress ou de pathologie bénigne (Swallow, 2003). Le caractère non-persistant de la lactase est lié à un promoteur situé 14 kb en amont du gène. De façon naturelle, le promoteur contient deux résidus de cytosine, en position 13910, qui induisent la réduction de la synthèse de la lactase après sevrage. Dans certains cas, le résidu de cytosine est remplacé par un résidu de thymine sur l'un, voire, les deux allèles (Wang *et al.*, 1995). Cela engendre une poursuite de la synthèse de la lactase à l'âge adulte (Usai-Satta *et al.*, 2012). Les sujets non persistants présentent donc un génotype C/C alors que les sujets persistants présentent un génotype C/T (la mutation est dominante) ou T/T. Pour évaluer le déficit en lactase, il est par conséquent possible de réaliser une simple prise de sang et d'étudier le génotype de l'individu. Une seconde méthode consiste à réaliser une biopsie du jéjunum et de quantifier l'activité de la lactase intestinale. Cette méthode est tout de même très invasive et, du fait d'une distribution hétérogène de la lactase au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle, peu fiable (Usai-Satta *et al.*, 2012).

1.2.3. La malabsorption du lactose : mécanismes, symptômes cliniques et méthodes d'évaluation

Naturellement, le lactose ne peut pas être absorbé tel quel par l'organisme, il doit au préalable être hydrolysé en glucose et galactose. Cette conversion est rendue possible par l'action de la LPH intestinale (Figure 13). Cette enzyme possède deux sites actifs : l'un catalyse l'hydrolyse du lactose, tandis que le second catalyse l'hydrolyse d'autres glucides (dont la phlorizine). La LPH est synthétisée dans l'intestin grêle, et plus particulièrement au niveau du jéjunum. La surface intestinale est composée de centaines de villosités, recouvertes par des microvillosités qui forment la barrière en brosse apicale de la paroi intestinale. Cet arrangement permet de maximiser la surface d'échange nécessaire à l'absorption des nutriments. La LPH, comme d'autres enzymes impliquées dans la digestion de glucides, est ancrée à la surface de cette bordure en brosse. Une fois le lactose hydrolysé, le glucose et le galactose sont transportés à travers la membrane des cellules épithéliales pour rejoindre la circulation sanguine via un transporteur sodium-dépendant (Wright *et al.*, 2007). Ils finissent par rejoindre le foie, au niveau duquel ils sont métabolisés pour servir de source d'énergie (Figure 13).

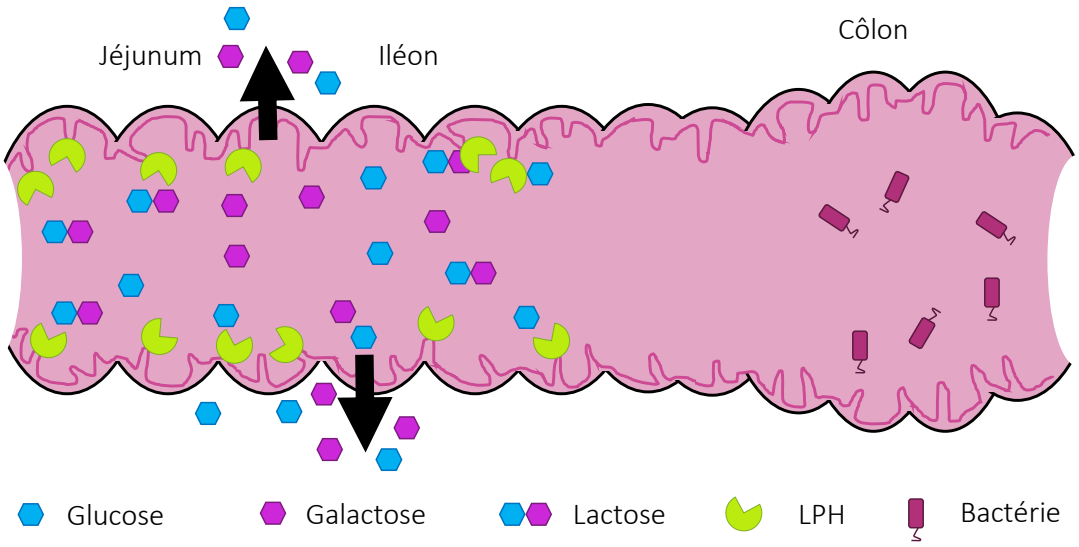


Figure 13 : Digestion du lactose en présence de LPH

En cas de déficit en LPH, le lactose ingéré n'est pas dégradé dans l'intestin grêle. Il atteint par conséquent le côlon où il est utilisé comme source d'énergie par l'abondante flore commensale (Figure 14).

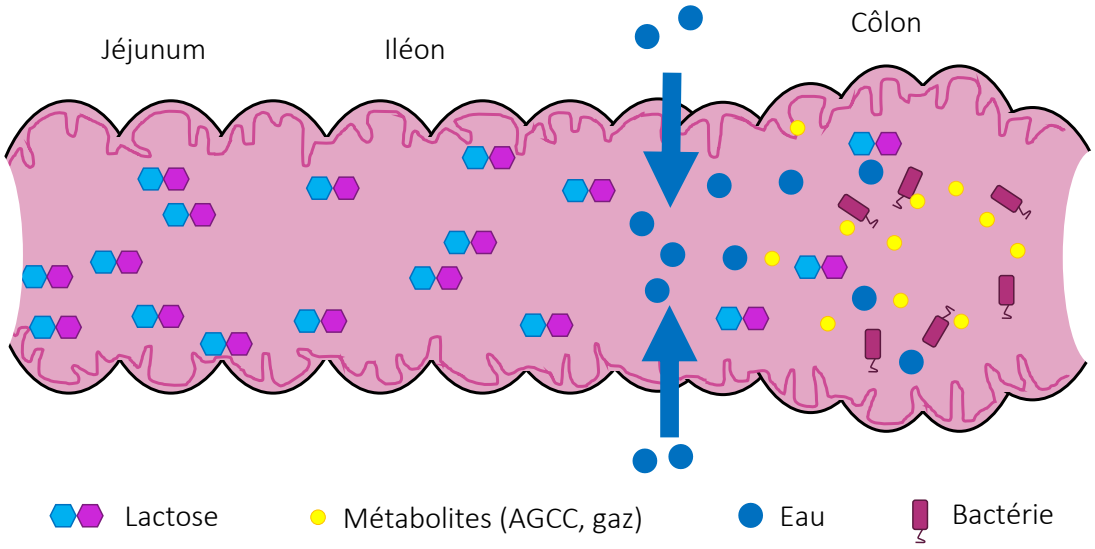


Figure 14 : Digestion du lactose en absence de LPH

Parmi les centaines de bactéries coliques, certaines (bifidobactéries, lactobacilles…) ont acquis la capacité de métaboliser le lactose. Ces enzymes catalysent la même réaction chimique que la LPH mais diffèrent tout de même dans leur structure, leur propriété enzymatique et leur régulation. Le glucose et le galactose, libérés par l'action des β-galactosidases, sont ensuite convertis par les bactéries coliques en une variété de produits incluant notamment des acides gras à chaîne courte (AGCC) et de l'hydrogène (Perlman, 2013). Cette fermentation entraine généralement des ballonnements et des douleurs abdominales.

En présence de LPH, le glucose et le galactose libérés après la consommation de lactose engendrent une augmentation de la glycémie. En absence de LPH, les produits finaux de dégradation étant des AGCC et des gaz, aucune augmentation de la concentration sanguine en glucose n'est observée. Cette observation permet de mettre en évidence la malabsorption du lactose via une simple prise de sang. Une glycémie inférieure à 0,2 $mg.ml^{-1}$ après l'ingestion d'une quantité importante de lactose (de 50 à 100 g) est généralement signe d'un déficit en lactase (Levitt *et al.*, 2013).

La présence intra-colique de produits de fermentation tend à accroître la pression osmotique du lumen intestinal. Du fait de l'importante perméabilité hydrique de la muqueuse intestinale, le maintien d'un gradient osmotique entre le sang et le lumen est difficile : une certaine quantité d'eau, venue du sang, pénètre par conséquent dans le contenu luminal pour le rendre isotonique. En fonction de la quantité de lactose présente dans le côlon, ce mécanisme peut causer d'importantes diarrhées (Levitt *et al.*, 2013). La fermentation colique peut aussi induire la production d'une quantité importante de gaz. Pour exemple, la dégradation de 12,5 g de lactose peut entrainer la libération de plus de 2600 ml de CO_2 et de 4000 ml de H_2 (Wolin, 1981), alors que l'excrétion usuelle est inférieure à 1000 ml de gaz par jour (Tomlin *et al.*, 1991). Une large part de ces gaz est excrétée par des flatuosités, et approximativement 15 % de l'hydrogène est absorbé et expulsé par les poumons dans l'air expiré (Kies, 2014). La quantification de l'hydrogène expiré après consommation de lactose est par conséquent utilisée pour diagnostiquer les cas de malabsorption du lactose. Cette méthode est considérée comme étant la plus fiable, la moins invasive et la moins coûteuse des techniques de diagnostic (Lomer *et al.*, 2008). Selon un consensus sur les tests à l'hydrogène (Gasbarrini *et al.*, 2009), la méthode consiste à absorber oralement 25 g de lactose et à mesurer la concentration en hydrogène de l'air expiré toutes les 30 min durant 4 h (3 h en pédiatrie). Un régime spécifique, excluant les glucides non-absorbables, est recommandé la veille au soir du test. Une concentration supérieure à 20 ppm d'hydrogène au-dessus de la ligne de base indique une malabsorption du lactose (Järvelä *et al.*, 2009) (Figure 15). Cette méthode de diagnostic présente une bonne sensibilité et une excellente spécificité (Usai-Satta *et al.*, 2012). Cependant, l'incapacité de la flore colique à produire de l'hydrogène ou l'administration récente d'antibiotiques peuvent induire des résultats faussement négatifs (Vernia *et al.*, 2003). Des résultats faussement positifs sont moins courants et sont souvent dus à une prolifération bactérienne dans l'intestin grêle.

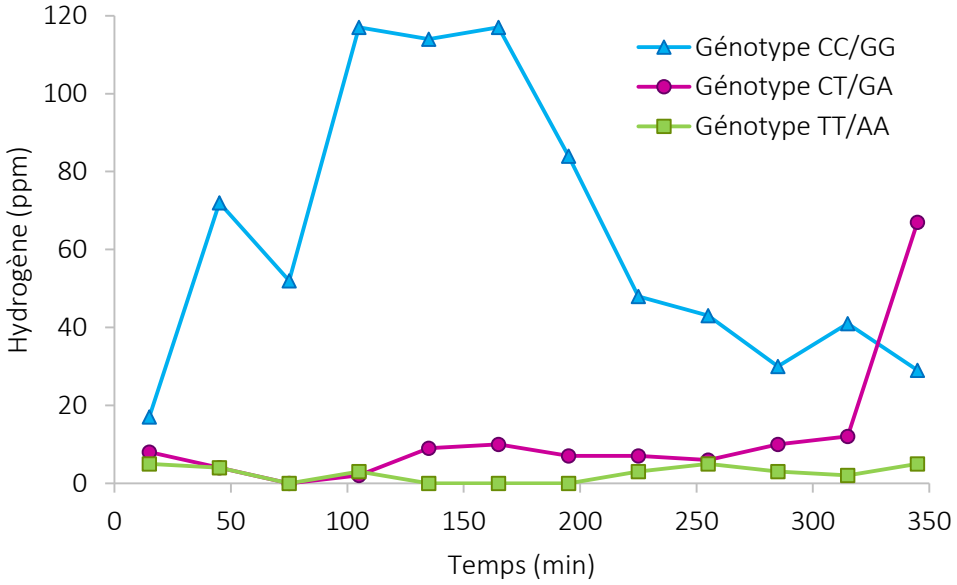


Figure 15 : Résultats du test à l'hydrogène selon le génotype du sujet, adapté de Matthews et al. (2005)

Globalement, l'intolérance au lactose se caractérise par des douleurs abdominales, des vomissements, des ballonnements et des flatulences. Elle peut aussi déclencher des nausées, des vomissements, des constipations, ainsi que des maux de tête, des pertes de concentration, des allergies diverses et des douleurs musculaires et articulaires (Matthews *et al.*, 2005).

La malabsorption du lactose n'entraine cependant pas nécessairement de symptômes d'intolérance chez les sujets présentant un déficit en lactase. Pour les sujets en présentant, les symptômes cliniques apparaissent entre 1 et 3 h après consommation, sont intimement dépendants de la quantité de lactose ingérée et liés à d'autres paramètres qui mènent à une grande variabilité interindividuelle (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2010). Contrairement au déficit en lactase et à la malabsorption du lactose, le diagnostic de l'intolérance au lactose ne peut pas être objectivement mis en évidence : il repose sur des symptômes auto-rapportés.

1.3. Seuil de tolérance et sévérité de l'intolérance au lactose

1.3.1. Le seuil de tolérance au lactose

La volonté de mettre en évidence un seuil de tolérance au lactose dans la population intolérante n'est pas récente : de nombreuses études ont été menées à ce sujet depuis plus de 40 ans (Cavalli-Sforza et Strata, 1987 ; Cheng *et al.*, 1979 ; Haverberg *et al.*, 1980 ; Hertzler *et al.*, 1996 ; Hertzler et Savaiano, 1996 ; Johnson *et al.*, 1993 ; Jones *et al.*, 1976 ; Kwon *et al.*, 1980 ; Lisker et Aguilar, 1978 ; Lybeck Sørensen *et al.*, 1983 ; Montalto *et al.*, 2005 ; Newcomer *et al.*, 1978 ; Paige *et al.*, 1975 ; Rask Pedersen *et al.*, 1982 ; Rorick et Scrimshaw, 1979 ; Stephenson et Latham, 1974 ; Suarez *et al.*, 1995a, 1997 ; Vesa *et al.*, 1996 ; Vesa, Lember, *et al.*, 1997 ; Xenos *et al.*, 1998). Pourtant, la première méta-analyse mettant en évidence une valeur seuil est récente. Cela s'explique par une hétérogénéité des études : certaines ne suivent pas les bonnes méthodologies, tandis que la plupart n'utilisent pas les mêmes protocoles (critères de recrutement, méthodologie pour évaluer la sévérité des symptômes…). La diversité physiologique complique aussi l'identification d'un tel seuil.

Idéalement, un large groupe de sujets présentant une importante diversité d'âges et d'ethnicité devrait être recruté de façon aléatoire et testé pour sa malabsorption du lactose (les sujets ne présentant pas de malabsorption ne peuvent pas être intolérants). Les sujets devraient ensuite subir un test en double aveugle avec une dose physiologique maximale (50 g) ou un placebo, pour sélectionner les réels intolérants au lactose. Ces sujets sélectionnés devraient ensuite être testés en double aveugle avec une large gamme de concentration en lactose et un placebo pour déterminer le seuil de tolérance. Idéalement, pour simuler la réalité, le lactose devrait aussi être administré durant les repas et les symptômes devraient être recueillis quotidiennement. Dans la pratique, la plupart des études classent les sujets d'après leur capacité à absorber ou non le lactose selon le résultat de leur glycémie ou de la concentration d'hydrogène expiré, mesurées après absorption de 30 à 50 g de lactose. En général, aucun contrôle de l'intolérance des sujets malabsorbants n'est effectué, la classification étant uniquement basée sur les symptômes rapportés durant le test précédent. Certains sujets sont par conséquent considérés à tort comme intolérants au lactose : ils auraient présenté les mêmes symptômes après l'administration d'un produit exempt de lactose. Les laits exempts de lactose, souvent utilisés comme placebo, sont par ailleurs plus sucrés que les laits classiques (le glucose et le galactose libérés ont un pouvoir sucrant supérieur à celui du lactose). Certaines études ne prennent pas la peine de masquer cette

différence de goût, tandis que d'autres emploient diverses méthodes pour y remédier (addition au lait d'édulcorants, de chocolat…). La fréquence de consommation, ainsi que sa répartition sur la journée diffèrent aussi grandement selon les études. Alors que la plupart emploient une unique dose de lactose administrée au petit déjeuner à jeun, certaines répartissent les prises sur la journée et les font coïncider avec les repas. Cette grande hétérogénéité dans les études menées jusqu'alors rend difficile le travail de synthèse.

La diversité physiologique des individus, qui entraine une large variabilité dans les doses de lactose tolérées, est un second challenge. Globalement, les perceptions symptomatiques de l'intolérance au lactose dépendent de la quantité de lactose ingérée et de lactose non-absorbé, du type d'administration (matrice alimentaire, prise de lactose au cours d'un repas ou à jeun...), de la vidange gastrique, du transit intestinal, de la capacité d'absorption colique en eau, de la fermentation des bactéries coliques mais aussi de la sensibilité viscérale du sujet. En effet, les sujets présentant un déficit en lactase conservent tout de même une activité résiduelle au niveau de la bordure en brosse de l'intestin grêle, très variable selon les individus. La quantité de lactose hydrolysé dépend aussi largement du temps de contact entre la lactase résiduelle et le lactose, et donc de la durée du transit intestinal. Les symptômes relèvent aussi largement de la quantité de lactose qui atteint le côlon : lorsque seules de petites quantités l'atteignent, les métabolites sont rapidement absorbés par la muqueuse colique et la pression osmotique n'est pas suffisante pour induire des diarrhées. À l'inverse, lorsque de plus grandes quantités atteignent le côlon, la production de métabolites par la flore colique dépasse la capacité d'absorption de la muqueuse intestinale, induisant des diarrhées. Des différences de flores coliques et de muqueuse intestinale renforcent aussi ces variabilités interindividuelles. Enfin, les individus diffèrent dans leur réponse à une distension colique. Pour un même degré de distension, certains sujets ressentiront un inconfort, tandis que d'autres ne ressentiront aucune gêne (Wilt *et al.*, 2010).

Malgré ces difficultés, deux méta-analyses majeures mettant en évidence le seuil de tolérance au lactose ont été conduites. La première (Savaiano *et al.*, 2006) vise à déterminer la sévérité de l'intolérance au lactose chez des sujets présentant une malabsorption après ingestion de 7 à 25 g de lactose via de l'eau, du lait ou des produits alimentaires transformés. Cette analyse inclut 21 études aux essais croisés, randomisés, en aveugle, incluant des sujets sans problèmes gastro-intestinaux. Les auteurs ont conclu à des différences non significatives, ne permettant pas de distinguer une relation dose-réponse. Cependant, la sévérité des symptômes gastro-intestinaux rapportée par les sujets présentant une malabsorption ne diffère pas après une prise de 12 g de

lactose ou d'un placebo. À l'inverse, la consommation de 25 g de lactose entraine des symptômes chez la plupart de ces sujets. La seconde méta-analyse (Wilt *et al.*, 2010) a étudié la dose maximale tolérable par des sujets cliniquement diagnostiqués comme intolérants au lactose. Pour cela, 38 études randomisées et croisées, menées entre 1968 et 2009 ont été sélectionnées. Ces études, méthodologiquement très hétérogènes, compliquent la mise en évidence d'un seuil de tolérance.

Globalement, d'après ces différentes études, il apparait tout de même que la plupart des individus intolérants au lactose tolèrent au moins 12 g de lactose en une seule dose, sans symptômes, ou seulement minimes. Pour des doses plus importantes, les symptômes liés à l'intolérance deviennent plus marqués, sauf si la consommation de lactose est répartie sur la journée et coïncide avec les repas. Dans ce cas, la plupart des intolérants tolèrent des doses comprises entre 20 et 24 g. La Figure 16, schéma bilan de notre étude, résume ces différents résultats.

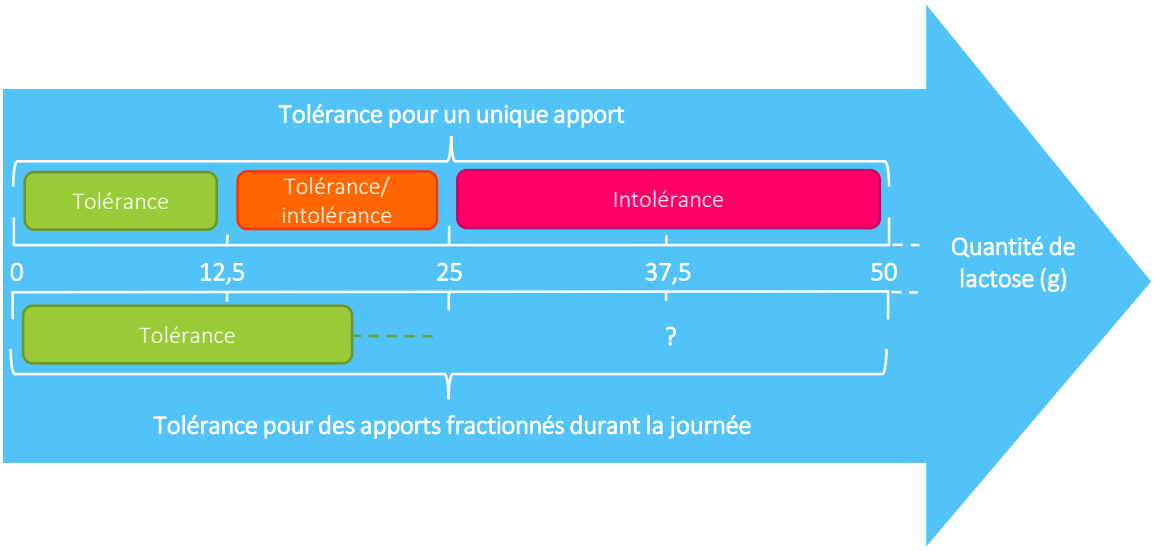


Figure 16 : Tolérance au lactose selon la quantité consommée et sa répartition sur la journée

1.3.2. La sévérité de l'intolérance au lactose

Pour mettre en évidence la réelle sévérité de l'intolérance au lactose, la composition en lactose de produits alimentaires courants doit être prise en compte. Naturellement, le lactose est uniquement retrouvé dans le lait et les produits laitiers dérivant du lait. Mais du fait de ses propriétés techno-fonctionnelles intéressantes ; propriétés rhéologiques, faible pouvoir sucrant, peu fermentable par les levures (ce qui prévient la production de CO_2 et d'éthanol non souhaitée), le lactose est aussi de plus en plus utilisé en industrie alimentaire. Dans les aliments, le lactose est utilisé comme agent de brunissement (notamment dans le pain et les gâteaux), et comme agent texturant dans les préparations carnées telles que les saucisses, les hamburgers ou les dérivés de

poulet. Dans le domaine alimentaire, le lactose est aussi retrouvé dans certaines boissons, ainsi que dans les sauces en poudre à destination des restaurants et des traiteurs (Matthews *et al.*, 2005). Le contenu en lactose de certains produits alimentaires courants est présenté en Tableau 8.

Tableau 8 : Contenu en lactose de certains produits alimentaires courants

	Lactose (g pour 100 g)	Portion moyenne (g)	Quantité de lactose par portion (g)
Boisson énergisante	0,20	30,5	0,06
Poisson pané	0,12	57	0,07
Mozzarella	0,07	112	0,08
Pain aux céréales	0,56	28,3	0,16
Sauce salade	1,40	15	0,21
Cheddar	0,18	132	0,24
Crème fraîche	2,91	12	0,35
Pudding à la vanille	1,80	28,3	0,51
Gâteau au chocolat	0,46	138	0,63
Cheeseburger	0,39	280	1,09
Lasagnes	1,00	225	2,27
Barre chocolatée	8,21	42	3,45
Yaourt	2,54	170	4,32
Lait entier	5,04	244	12,3

Les concentrations en lactose de ces différents produits varient de quelques traces (cheddar, mozzarella ou cheeseburger) à plus de 2 g pour 100 g dans les yaourts, le lait, la crème ou certaines barres chocolatées. En tenant compte de la composition en lactose des produits de consommation courante et du seuil de tolérance de la majorité des intolérants au lactose, ces derniers pourraient consommer 250 ml de lait ou encore 3 yaourts en une prise. En répartissant la consommation de lactose sur la journée et en la faisant coïncider avec les repas, la majeure partie de la population intolérante pourrait tolérer une part de lait entier, un cheeseburger, un yaourt, une barre de chocolat, ainsi que deux portions de cheddar. Des doses plus élevées peuvent même être tolérées si elles sont administrées tout au long de la journée et consommées en parallèle d'autres produits alimentaires. La majorité des intolérants peuvent par exemple tolérer une dose de lait entier (250 ml), un cheeseburger, un yaourt, une barre de chocolat et deux portions de cheddar.

En mettant en parallèle le contenu en lactose de produits alimentaires courants et la quantité de lactose pouvant être consommée sans effet, il apparaît que la fréquence et la sévérité de l'intolérance au lactose sont certainement surestimées par le grand public. Deux principaux

facteurs peuvent expliquer cette surestimation : la confusion avec le syndrome de l'intestin irritable (SII) et l'effet nocebo. Le SII touche 9 à 12 % de la population et se caractérise par des douleurs abdominales chroniques ou des inconforts, qui ne peuvent s'expliquer par une quelconque anormalité organique ou biochimique (Drossman *et al.*, 2002). Le type de repas, la caféine, le type et la quantité de fibres alimentaires, ainsi que les intolérances alimentaires sont les principaux facteurs influençant les symptômes (Burden, 2001). L'intolérance au lactose ne déclenche pas le SII (Turnbull, 2000) mais les sujets irritables présentent souvent une sensibilité viscérale plus élevée du fait de l'effet luminal du lactose (Sciarretta *et al.*, 1984). De plus, les symptômes de l'intolérance au lactose et du SII sont souvent très similaires (Vesa *et al.*, 1998), rendant le diagnostic difficile. Une part importante des sujets présentant le SII sont aussi diagnostiqués comme intolérants au lactose (Alpers, 2006). Mais quelques études ont montré qu'un lait sans lactose provoquait les mêmes symptômes qu'un lait classique chez des sujets diagnostiqués comme intolérants au lactose. Dans ce cas, le SII est souvent la réelle cause des symptômes (Suarez et Levitt, 1996 ; Vesa *et al.*, 1998). L'intolérance au lactose est d'ailleurs aussi confondue avec l'allergie aux protéines de lait de vache (APLV) : 20 % des patients avec des symptômes suggérant une intolérance au lactose souffrent en réalité d'APLV (Lomer *et al.*, 2008).

L'effet nocebo, opposé à l'effet placebo, est un phénomène qui se caractérise par une aggravation des symptômes liée à l'attente d'un résultat négatif. Plus précisément, les patients qui s'attendent à des effets secondaires avant de prendre un médicament ont plus de chance de les développer que les autres (Benedetti *et al.*, 2007). Ces attentes négatives tendent aussi à rendre le sujet plus attentif à ces potentiels effets secondaires, et à interpréter des éléments préexistants comme étant des symptômes associés à la prise de médicament ou d'aliment (Morselli et Garattini, 1970). Pour le grand public, le lactose est largement considéré comme étant potentiellement délétère (Vernia *et al.*, 2010) et cette idée est d'ailleurs relayée par certains médias (Suarez *et al.*, 1995b). Ainsi, parmi les sujets attribuant des symptômes divers à la prise de lactose, indépendamment de la dose, beaucoup ne présentent en réalité aucune intolérance au lactose. Cette fausse idée mène beaucoup d'individus à stopper inutilement leur consommation de produits laitiers. Cela devient problématique lorsque certains parents qui se sont auto-diagnostiqués intolérants au lactose placent leurs enfants sous un régime restreint en lactose en pensant que cette condition est héréditaire. Ces individus tendent à être en deçà des doses recommandées en calcium et vitamine D, ce qui provoque potentiellement une diminution de la densité osseuse (Solomons *et al.*, 1985). Pour les individus considérant le lactose comme délétère et pour ceux réellement intolérants à de faibles doses, des solutions ont été développées.

1.4. Les solutions apportées

1.4.1. Utilisation d'une β-galactosidase

Faute de sécrétion de LPH, des β-galactosidases exogènes peuvent être ajoutées dans le lait par le consommateur avant consommation ou bien être consommées en parallèle d'un repas contenant du lactose (Levitt *et al.*, 2013). Ces enzymes peuvent être isolées à partir de différentes sources telles que les plantes, les organes animaux, les levures, les bactéries ou encore les champignons (Richmond *et al.*, 1981). Les β-galactosidases utilisées dans le domaine alimentaire sont généralement d'origine microbienne (Greenberg et Mahoney, 1981). Les enzymes d'origine fongique, généralement produites par des souches d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus oryzae*, ont un pH optimal compris entre 3 et 6 et une température optimale relativement élevée, comprise entre 50 et 60 °C. Du fait de leur appréciable activité en milieu acide, ces enzymes sont particulièrement efficaces dans l'estomac et sont par conséquent utilisées comme compléments alimentaires. Les enzymes issues de levures, généralement de *Kluyveromyces lactis* et *Kluyveromyces marxianus*, ont un pH optimal proche de la neutralité et une température optimale comprise entre 30 et 40 °C. Du fait de leur pH optimal neutre, ces enzymes sont particulièrement adaptées à l'hydrolyse du lactose du lait.

Ainsi, quelques études ont évalué l'efficacité de préparations enzymatiques commerciales visant à être ajoutées au lait juste avant consommation (Barillas et Solomons, 1987 ; Corazza *et al.*, 1992 ; Montalto *et al.*, 2005 ; Payne *et al.*, 1981 ; Rosado *et al.*, 1984, 1986 ; Solomons *et al.*, 1985).

Tableau 9 : Études menées visant à évaluer l'efficacité de préparations enzymatiques utilisées dans du lait au moment du repas

Étude	Nombre de sujets	Source	Activité (ALU ou NLU)	Quantité de lactose (g)	Délai avant repas (min)
Barillas et Solomons (1987)	27	*K. Lactis* *A. Oryzae*	Entre 2345 et 13270	12	0
Corazza *et al*. (1992)	16	*A. niger*	3000	19,2	5
Montalto *et al*. (2005)	30	*K. lactis*	3900 - 7800	20	5
Rosado *et al*. (1986)	12	*A. niger*	-	18	5
Rosado *et al*. (1984)	38	*K. lactis* *A. niger*	-	18	0
Solomons *et al*. (1985)	15	*K. lactis* *A. niger*	-	18	5

Globalement, une amélioration générale des symptômes ainsi qu'une réduction de l'hydrogène expiré ont été notées après consommation d'un lait traité, mais l'efficacité exacte de

tels produits reste quelque peu discordante. Cette discordance s'explique principalement par le manque d'homogénéité des études menées (Tableau 9). Les enzymes étudiées n'ont pas été produites par la même souche, n'ont pas été additionnées au lait dans les mêmes proportions, et les études ont été menées sur un nombre de sujets limités. Cela entraine des difficultés à la mise en évidence d'une réelle tendance.

Des préparations solides de β-galactosidases fongiques sont aussi disponibles commercialement. Ces préparations sont consommées juste avant ou durant le repas et permettent une hydrolyse du lactose durant la digestion gastrique. Malheureusement, assez peu d'études ont examiné leur efficacité (Biller *et al.*, 1987 ; DiPalma et Collins, 1989 ; Gao *et al.*, 2002 ; Lin *et al.*, 1993 ; Ojetti *et al.*, 2010 ; Portincasa *et al.*, 2008 ; Ramirez *et al.*, 1994 ; Sanders *et al.*, 1992). Bien que certaines d'entre elles soulignent leur intérêt, l'utilité de telles préparations reste encore discutée. La plupart des études sont une nouvelle fois relativement difficiles à comparer du fait d'une hétérogénéité dans de nombreux paramètres (dose de β-galactosidase, moment de supplémentation, quantité de lactose, méthodes pour évaluer la malabsorption…). Ces études ont aussi été menées à petite échelle et les doses d'enzymes étudiées sont parfois vraiment très loin des recommandations récemment établies par l'EFSA (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2009) (Tableau 10).

Tableau 10 : Études menées visant à évaluer l'efficacité de préparations enzymatiques utilisées comme compléments alimentaires

Étude	Nombre de sujets	Source	Activité (NLU ou ALU)	Quantité de lactose (g)	Délai avant repas (min)
Biller *et al*. (1987)	16	*A. oryzae*	-	21,7	5
DiPalma et Collins (1989)	10	*A. oryzae*	4000	50	0
Gao *et al*. (2002)	10	*A. oryzae* *P. multicolor*	10000	18,3	0 - 30
Lin *et al*. (1993)	31	*K. Lactis* *A. Oryzae* *A. niger*	3000 - 6000	20 - 50	0
Ojetti *et al*. (2010)	60	*A. oryzae*	9000	25	15
Portincasa *et al*. (2008)	134	*A. oryzae*	4623 - 7705	25	0
Ramirez *et al*. (1994)	10	*A. oryzae*	6600 - 9900	18	0
Sanders *et al*. (1992)	24	*A. oryzae*	9900	50	0

L'étude *in vitro* de différentes β-galactosidases utilisées comme suppléments diététiques a montré une stabilité relativement basse en conditions gastro-intestinales, et plus particulièrement en milieu simulant l'environnement gastrique. Les meilleurs résultats ont été observés pour les enzymes présentant un enrobage entérique (O'Connell et Walsh, 2006). Les enrobages entériques

sont généralement composés de matériaux sensibles au pH qui restent stables au pH gastrique et qui libèrent la molécule d'intérêt au pH intestinal (Carino et Mathiowitz, 1999).

Des recherches ont par conséquent été menées pour améliorer la stabilité des β-galactosidases. Plusieurs enzymes, jusqu'alors non caractérisées, ont montré des propriétés plus intéressantes que les β-galactosidases commerciales. Cependant, la plupart de ces enzymes restent sensibles aux protéases digestives et au pH gastrique. Aussi, leur commercialisation dépend des règlementations en vigueur (Turner *et al.*, 2011). Une autre solution développée pour accroître la stabilité de l'enzyme a été de modifier chimiquement une β-galactosidase commerciale issue d'*Aspergillus oryzae*. Un polymère hydrophobe (polyéthylène glycol) branché de 40 kDa a été greffé à l'enzyme de façon à créer une zone d'encombrement stérique autour de l'enzyme (Liu *et al.*, 2013). Cet encombrement stérique permet de prévenir l'action d'enzymes digestives endogènes et d'améliorer la stabilité de l'enzyme à de faibles pH, tout en permettant au substrat d'atteindre le site actif de la β-galactosidase (Turner *et al.*, 2011).

1.4.2. Laits sans lactose ou à teneur réduite en lactose

Certains produits laitiers sont naturellement pauvres en lactose. C'est notamment le cas du fromage, dont une grande part du lactose est éliminé avec le lactosérum durant le procédé de fabrication. La prévalence de l'intolérance au lactose, réelle ou non, a mené au développement de produits laitiers à teneur réduite ou sans lactose. Cela permet dans le même temps à l'industrie laitière d'acquérir de nouveaux consommateurs qui auraient évité le lait. L'hydrolyse enzymatique et la filtration sont les deux principales approches permettant de produire industriellement du lait à teneur réduite en lactose et sans lactose. En Europe et aux États-Unis, aucune réglementation ne définit clairement le contenu en lactose résiduel de ces deux types de produits. L'EFSA a tout de même donné un avis positif quant à l'allégation suivante : « La consommation d'aliments avec une teneur réduite en lactose aide à réduire les inconforts gastro-intestinaux causés par l'absorption de lactose chez les individus intolérants au lactose » (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2011). Cette allégation a été acceptée du fait d'un large nombre d'études convaincantes montrant une diminution de la production d'H_2 expiré et une amélioration des symptômes après la consommation de lait sans lactose comparé à un lait standard (Kies, 2014).

L'hydrolyse enzymatique du lactose contenu dans le lait de vache a débuté dans les années 1970 suite à la disponibilité, à l'échelle industrielle, de β-galactosidases d'origine microbienne (Panesar *et al.*, 2006). Aujourd'hui, la β-galactosidase est l'une des enzymes les plus utilisées dans

le domaine alimentaire (Panesar *et al.*, 2006). Différentes techniques sont utilisées industriellement pour mener à bien l'hydrolyse du lactose : l'utilisation d'une enzyme soluble, la réutilisation de l'enzyme ou son immobilisation. Le choix du procédé dépend de la nature du substrat, des caractéristiques de l'enzyme et du coût de production, du stockage et du marketing du produit (Mahoney, 1997). Globalement, le coût du procédé d'hydrolyse est largement limité en ayant recours à une enzyme immobilisée (Sprossler et Plainer, 1983). L'enzyme est souvent additionnée à un lait pasteurisé qui est ensuite maintenu entre 6 et 8 °C durant 20 à 30 h. Le degré d'hydrolyse est contrôlé en faisant varier la durée d'incubation et la température, ainsi que la dose d'enzyme et dépend du type de produit voulu (sans lactose ou à teneur réduite) (Mahoney, 2002). Lorsque le degré d'hydrolyse attendu est atteint, le lait est traité thermiquement par ultra-pasteurisation pour inactiver l'enzyme et le produit est ensuite emballé. Pour améliorer le procédé et en limiter le coût, des recherches ont par ailleurs été menées pour sélectionner des β-galactosidases ayant une température optimale proche de la température de réfrigération (Stougaard et Schmidt, 2012). Une seconde méthode d'hydrolyse consiste à stériliser une petite quantité d'enzymes (produite par *Kluyveromyces lactis*) par ultrafiltration et à l'additionner à un lait UHT juste avant l'étape d'emballage aseptique. Durant le stockage du lait (au moins 7 à 10 jours) à température ambiante, une hydrolyse complète du lactose a lieu. Ce procédé est peu coûteux mais nécessite le recours à une enzyme très pure et exempte d'activité protéolytique (Mahoney, 2002).

Du fait du remplacement partiel du lactose par du glucose et du galactose (qui réagissent plus intensément avec la lysine que les diholosides), les produits obtenus par les méthodes enzymatiques sont très sensibles à des détériorations de type réaction de Maillard (Naranjo *et al.*, 2013). Ce brunissement dépend ainsi de la quantité de lactose hydrolysé (Ur-Rehman, 2009). L'hydrolyse du lactose d'un lait a aussi pour conséquence d'en faire décroître le point de congélation du fait d'une augmentation de la quantité de substances solubles (Antunes *et al.*, 2014). Étant donné le pouvoir sucrant plus élevé du glucose et du galactose, les laits dont le lactose a été hydrolysé présentent aussi un caractère plus sucré. Ce caractère semble globalement assez peu apprécié par les consommateurs (Adhikari *et al.*, 2010). Cette propriété permet cependant de limiter l'ajout de sucre à certains produits tel que le lait au chocolat (Li *et al.*, 2015).

La production de poudre de lait sans lactose est elle aussi possible. Le lactose du lait peut être partiellement ou totalement hydrolysé par une β-galactosidase avant le séchage. Ce procédé tend souvent à déclencher d'importants brunissements enzymatiques durant le stockage, causant des changements de flaveurs, une réduction de la valeur nutritionnelle, une détérioration du goût

et des phénomènes d'agglomération. Une autre méthode consiste à additionner une β-galactosidase sèche à la poudre de lait, qui agirait lors de la réhydratation du produit. Mais des phénomènes de démixtion ont lieu durant le procédé et le stockage, déclenchant une distribution hétérogène de l'activité enzymatique dans le produit et par conséquent une variation dans l'efficacité de l'hydrolyse après réhydratation. Une nouvelle méthode a récemment été développée par un leader de l'industrie alimentaire. La méthode propose de mélanger la β-galactosidase au lait et de sécher le mélange avant le début de l'action de l'enzyme. Ainsi, aucun brunissement enzymatique n'a lieu et l'enzyme est répartie de façon homogène dans le produit (Braun et Niederreiter, 2012). Ainsi, l'enzyme agit lors de l'étape de réhydratation du produit.

Les techniques membranaires telles que la microfiltration et l'ultrafiltration sont aussi utilisées industriellement pour produire des laits sans lactose ou à teneur réduite, sans modification gustative. L'ultrafiltration permet de retenir l'intégralité des protéines, de la matière grasse et seulement 30 % du lactose. Lorsque le concentrat de l'ultrafiltration est dilué dans l'eau pour atteindre la concentration en protéines et en matière grasse d'un lait standard, le contenu en lactose est en deçà de 1,6 %. Le lactose résiduel est ensuite hydrolysé enzymatiquement. D'autres méthodes de filtration ont été brevetées par différentes compagnies pour obtenir des laits quasiment exempts de lactose. Mais certains acides aminés et minéraux, non liés à des protéines, sont perdus dans le filtrat (Grandison et Glover, 1994).

En 2011, le marché du sans lactose aux États-Unis et en Europe a augmenté de 100 % par rapport à 2007. Cette croissance est principalement due au marché européen qui a triplé en volume durant cette période. Les marchés sud-africain et asiatique représentent par ailleurs une réelle opportunité (Mellentin, 2012).

1.4.3. Consommation de laits fermentés et de yaourts

L'effet bénéfique des produits laitiers fermentés sur l'intolérance au lactose a été mis en évidence dans les années 1970 (Gallagher *et al.*, 1974). Plusieurs études ont été menées pour vérifier ce postulat et pour comprendre les mécanismes impliqués. Beaucoup de ces études se sont intéressées à l'effet bénéfique du yaourt, un lait fermenté obtenu par l'action symbiotique des cultures de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus.* La plupart de ces études ont comparé l'effet d'un yaourt « frais » (avec des bactéries vivantes) à celui d'un yaourt pasteurisé (avec peu ou pas de bactéries vivantes) et/ou de lait dans le but d'étudier leur effet sur la digestion du lactose. Dans la plupart des études, le test à l'hydrogène a été utilisé pour

évaluer la digestion : la production d'hydrogène était significativement plus basse après consommation d'un yaourt « frais » qu'après celle de lait et/ou de yaourt pasteurisé (Dewit *et al.*, 1988 ; Kolars *et al.*, 1984 ; Labayen *et al.*, 2001 ; Lerebours *et al.*, 1989 ; Marteau *et al.*, 1990 ; Martini *et al.*, 1991 ; Onwulata *et al.*, 1989 ; Pelletier *et al.*, 2001 ; Pochart *et al.*, 1989 ; Rizkalla *et al.*, 2000 ; Rosado *et al.*, 1992 ; Savaiano *et al.*, 1984 ; Varela-Moreiras *et al.*, 1992). Certaines études ont aussi évalué les symptômes de l'intolérance au lactose : des symptômes moindres ont été notés après consommation de yaourt « frais » par rapport à la consommation de lait, mais aucune différence n'a été observée entre la consommation de yaourt « frais » ou pasteurisé (Kolars *et al.*, 1984 ; Onwulata *et al.*, 1989 ; Pelletier *et al.*, 2001 ; Rosado *et al.*, 1992 ; Shermak *et al.*, 1995). Ainsi, les bactéries du yaourt font décroître la malabsorption du lactose et améliorent les symptômes de l'intolérance au lactose.

La première explication proposée a été que le contenu en lactose du yaourt était inférieur à celui du lait (Gallagher *et al.*, 1974). En réalité, bien que les bactéries métabolisent le lactose, le contenu en lactose du yaourt est très proche de celui du lait. Cela est en partie dû à la capacité limitée des bactéries à consommer le lactose (Adolfsson *et al.*, 2004), et au fait que les yaourts sont souvent enrichis avec du lait en poudre (riche en lactose) de façon à augmenter la teneur en matière sèche (Kies, 2014). Ainsi, le contenu en lactose ne peut expliquer que partiellement la différence de tolérance entre yaourt et lait chez les intolérants au lactose.

L'effet des β-galactosidases produites par les bactéries du yaourt sur la digestion du lactose a été mis en évidence dans les années 1980 (Kolars *et al.*, 1984). En fait, tant que la bactérie garde son intégrité, le lactose peut pénétrer la cellule via une perméase et être hydrolysé par des β-galactosidases endogènes (Adolfsson *et al.*, 2004). La préservation de la β-galactosidase microbienne durant le passage gastrique s'explique par l'importante capacité tampon du yaourt (Savaiano, 2014). La présence de bile améliore aussi l'activité de la β-galactosidase (Gilliland et Kim, 1984), probablement en augmentant la perméabilité cellulaire et en permettant ainsi à plus de substrat de pénétrer la cellule bactérienne (Noh et Gilliland, 1994) ou en libérant la β-galactosidase de la cellule bactérienne qui devient alors plus accessible (Hove *et al.*, 1999). Ainsi, la structure de la paroi des bactéries joue un rôle primordial dans la disponibilité de la β-galactosidase (Mustapha *et al.*, 1997).

Enfin, la plupart des études ont montré que le pic de concentration en hydrogène après consommation d'un yaourt frais était plus tardif qu'après consommation de lait. Cela indique une digestion plus lente du yaourt. Il a été suggéré que le prolongement du temps de transit

gastro-intestinal expliquait en partie la meilleure digestion du lactose issu de yaourts. Plus spécifiquement, alors que le transit gastrique est identique pour le yaourt et pour le lait, le transit au niveau de l'intestin grêle est plus lent pour le yaourt. Cela permet d'accroître le temps de contact entre le lactose et les enzymes (LPH et β-galactosidases bactériennes) et ainsi d'améliorer le taux d'hydrolyse du lactose (Kies, 2014).

1.4.4. Adaptation de la flore colique

Dans le cas d'une malabsorption du lactose, les bactéries coliques fermentent le lactose et produisent des AGCC et des gaz. Historiquement, cette fermentation a été perçue comme une cause des symptômes de l'intolérance au lactose. Cependant, le rôle important de la fermentation du lactose et des autres glucides non absorbables sur la santé colique humaine et le statut nutritionnel a été largement mis en évidence (Hertzler *et al.*, 2013). Chez les sujets présentant une non-persistance de la lactase, la perte d'activité enzymatique est définitive : la poursuite de la consommation de lactose n'a aucun effet sur la production de LPH (Keusch *et al.*, 1969 ; Reddy et Pershad, 1972 ; Sahi, 1994). Cependant, plusieurs études ont mis en évidence une amélioration des symptômes de l'intolérance au lactose après une introduction graduelle de lactose dans le régime alimentaire (Habte *et al.*, 1973 ; Johnson *et al.*, 1993 ; Reddy et Pershad, 1972). Le rôle bénéfique de l'adaptation des bactéries colique a alors été proposé. Après la consommation prolongée de diholosides non absorbables, plusieurs études ont montré une réponse plus faible au test à l'hydrogène, une amélioration des symptômes et une activité accrue de la β-galactosidase fécale (Florent *et al.*, 1985 ; Hertzler *et al.*, 1996 ; Perman *et al.*, 1981). En fait, l'absorption prolongée de lactose, lactulose et d'autres glucides non absorbables stimulent la croissance ou l'activité métabolique de bactéries (bifidobactéries et bactéries lactiques notamment) qui peuvent fermenter le lactose sans production d'hydrogène. Aussi, la croissance de certaines bactéries productrices d'hydrogène (Clostridia et *Escherichia coli* par exemple) est inhibée par la présence d'une population importante de bifidobactéries (Hertzler *et al.*, 2013). Cependant, l'amélioration des symptômes observés dans ces études n'est pas nécessairement liée à l'adaptation du côlon, mais plutôt à un effet placebo. En effet, l'acclimatation aux procédures d'essai (entre le test initial et le dernier) permettrait de réduire la gravité des symptômes par diminution de la sensibilité viscérale ou par adaptation au système de notation (Briet *et al.*, 1997). Ainsi, le rôle de l'adaptation de la flore colique sur l'amélioration des symptômes de l'intolérance au lactose n'a pas encore clairement été établi.

1.5. Conclusion

Le lactose, naturellement présent dans le lait des mammifères, est de plus en plus retrouvé dans les produits alimentaires transformés. Pour être absorbé par l'organisme, il doit au préalable être hydrolysé par la LPH, une enzyme ancrée dans la bordure en brosse des entérocytes. Mais génétiquement, l'activité de cette enzyme décroit chez 70 % de la population mondiale à l'âge adulte. Le lactose ingéré n'est alors pas ou peu hydrolysé au niveau de l'intestin grêle et atteint le côlon où il est utilisé comme source d'énergie par l'abondante flore commensale. La présence intra-colique de produits de fermentation peut entrainer des douleurs abdominales, des ballonnements, des vomissements et des flatulences. Les perceptions symptomatiques de l'intolérance au lactose sont variables selon les individus et dépendent principalement de la quantité de lactose ingérée et de lactose non absorbé, du type d'administration, de la vidange gastrique, du transit intestinal, de la capacité d'absorption colique en eau, de la fermentation des bactéries coliques mais aussi de la sensibilité viscérale. Du fait de la confusion entre l'APLV et le SII, couplée à l'effet nocebo, la sévérité et la prévalence de l'intolérance au lactose sont probablement surestimées par le grand public. En réalité, la vaste majorité des sujets intolérants au lactose tolèrent jusqu'à 12 g de lactose en une prise et jusqu'à 18 g lorsque les prises sont réparties sur la journée.

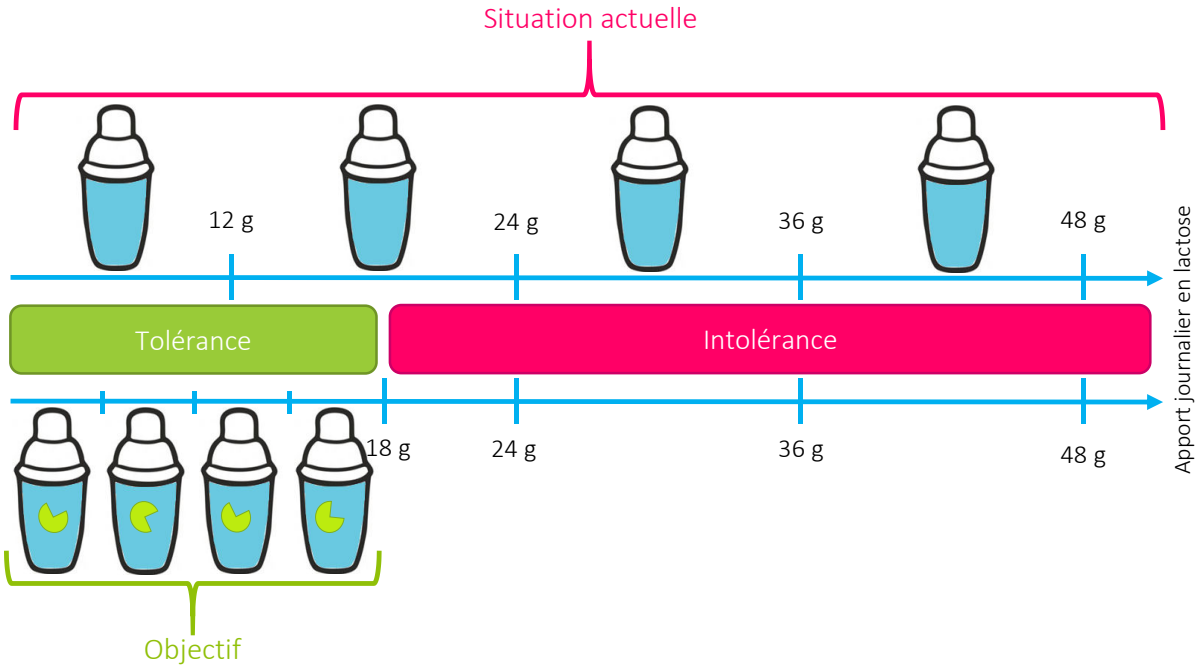


Figure 17 : Objectif fixé pour le développement de formulations adaptées aux intolérants au lactose

Dans le cadre de notre étude, les sujets consomment jusqu'à 4 portions de 250 ml de lait ½ écrémé réparties sur la journée (Figure 17). Cela correspond à un apport de 1 litre de lait, soit environ 48 g de lactose. L'objectif sera par conséquent de diminuer cet apport en lactose en deçà de 18 g. Pour cela, plusieurs solutions ont été étudiées. La première solution serait de conseiller aux consommateurs intolérants au lactose de recourir à un lait sans lactose ou à teneur réduite en lactose. Mais cette solution présenterait un coût supplémentaire pour le consommateur, ce qui n'est pas souhaitable. L'intérêt du recours à des bactéries probiotiques n'a pas encore été clairement établi par l'EFSA, tout comme le mécanisme de l'adaptation de la flore colique. Ainsi, la seule solution envisageable pour notre application serait l'ajout au produit d'une β-galactosidase exogène qui agirait durant ou après sa réhydratation.

2. Étude de β-galactosidases

La formulation d'un produit adapté à la vaste majorité des sujets intolérants au lactose nécessite l'élimination d'environ deux tiers du lactose présent dans un lait ½ écrémé. Pour cela, le recours à une β-galactosidase exogène qui pourrait agir durant la réhydratation du produit, son refroidissement et/ou la digestion gastrique et intestinale est étudié. Dans un premier temps, les caractéristiques des β-galactosidases commerciales, ainsi que le cadre législatif encadrant leur utilisation sont présentés dans une étude bibliographique. Dans un second temps, les deux enzymes commerciales sélectionnées grâce à l'étude bibliographique sont caractérisées expérimentalement (activité enzymatique, température optimale et pH optimal). Dans un troisième temps, le potentiel hydrolytique de ces deux enzymes est étudié durant la réhydratation du produit, son refroidissement, sa digestion gastrique et intestinale. L'influence de différents traitements thermiques sur l'activité des enzymes est elle aussi étudiée. Une pré-sélection de l'enzyme est réalisée en étudiant ce potentiel de manière simplifiée : le produit étudié (formulation sèche réhydratée dans du lait ½ écrémé) est remplacé par une solution aqueuse simulant la composition du lait en minéraux et en lactose. En fonction du potentiel hydrolytique mis en évidence dans cette solution aqueuse, les enzymes seront ou non étudiées dans le produit classique.

2.1. Les β-galactosidases : étude bibliographique

2.1.1. Sources

Du fait de leurs multiples fonctions, les β-galactosidases sont largement répandues dans la nature. Elles sont produites par des animaux, végétaux et micro-organismes. Cependant, seules les lactases, sécrétées par certains micro-organismes et par la muqueuse intestinale des mammifères, sont capables d'hydrolyser le lactose (Mahoney, 1997). Chez les bactéries et les levures, l'enzyme est généralement intracellulaire, tandis que chez les champignons, cette dernière peut être intra- ou extracellulaire. Les β-galactosidases suscitant un réel intérêt commercial, un nombre important de micro-organismes producteurs (levures, champignons et bactéries) a été évalué comme source potentielle (Mahoney, 2002). Une liste partielle figure en Tableau 11.

Tableau 11 : Sources de β-galactosidase hydrolysant le lactose, d'après Mahoney (2002)

Levures	Champignons	Bactéries
Candida pseudotropicalis	*Alternaria alternata*	*Bacillus acidocaldarius*
Saccharomyces anamesis	*Aspergillus fonsecaeus*	*Bifidobacterium bifidum*
Kluyveromyces bulgaricus	*Aspergillus niger*	*Clostridium acetobutylicum*
Kluyveromyces fragilis	*Aspergillus oryzae*	*Corynebacterium murisepticum*
Kluyveromyces lactis	*Neurospora crassa*	*Enterobacter agglomerans*
Kluyveromyces marxianus	*Paecilomyces variotii*	*Lactobacillus acidophilus*
	Penicillium conescens	*Pseudomonas jiuorescens*

Plusieurs de ces β-galactosidases ont été purifiées, séquencées et caractérisées. Cependant, peu de souches productrices sont utilisables pour la production de β-galactosidases à visée alimentaire. Actuellement, seules celles issues des levures *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* (anciennement nommée *Kluyveromyces fragilis*), des champignons *Aspergillus oryzae* et *Aspergillus niger* et de la bactérie *Bacillus circulans* sont autorisées. Les enzymes issues de ces deux levures sont commercialisées par un certain nombre d'entreprises (DSM Food specialties, Godo, Chr. Hansen, Kerry, Novozymes…) et présentent des propriétés biochimiques très proches. La β-galactosidase issue d'*Aspergillus Niger* n'est plus commercialisée, tandis que celle issue d'*Aspergillus Oryzae* est principalement commercialisée par Amano Enzyme Inc., et plus récemment par DSM food specialties. Enfin, la β-galactosidase issue de *Bacillus circulans* est utilisée industriellement pour son activité de transglycosylase et non pour son activité d'hydrolase (Mahoney, 2002). Bien que ces enzymes soient déjà utilisées pour un bon nombre d'applications, des recherches sont toujours menées pour mettre en évidence de nouvelles

β-galactosidases présentant des caractéristiques intéressantes (thermostabilité, activité à basse température…). Ces enzymes, issues d'organismes non autorisés, pourraient ensuite être clonées et exprimées chez des hôtes GRAS. Cependant, des tests approfondis sont nécessaires avant la mise sur le marché de ce type d'enzyme.

2.1.2. Structure et mécanisme d'action

Les β-galactosidases font partie de la superfamille des glycoside-hydrolases (GH) et, selon l'homologie de leur séquence, des familles GH 1, GH 2, GH 35 ou GH 42 (Cantarel *et al.*, 2009). L'enzyme produite par la souche d'*Aspergillus Oryzae* fait partie de la famille GH 35. Il s'agit d'une enzyme monomérique, constituée de 1005 résidus d'acides aminés (Figure 18) et ayant une masse moléculaire moyenne de 110 kDa (Ito *et al.*, 2002).

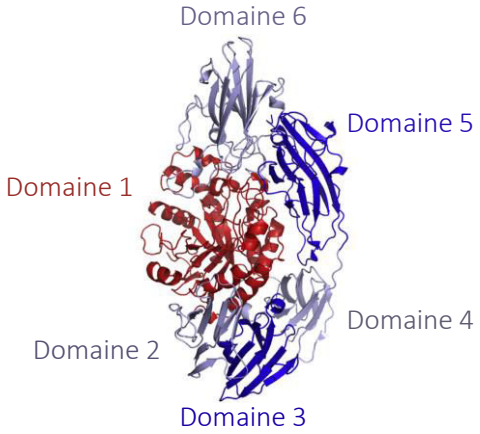


Figure 18 : Structure de la β-galactosidase issue d'*Aspergillus Oryzae*, adapté de Maksimainen *et al.* (2013)

Comme toutes les GH, elle possède un domaine catalytique occupé par un tonneau β entouré d'hélices α et semble s'articuler en six domaines : le premier domaine (Asp40 - Thr397) (en rouge sur la Figure 18) correspond au domaine catalytique autour duquel les domaines 2 à 6 forment un fer à cheval. Cette enzyme est supposée contenir 11 sites de N-glycosylation. Un seul serait localisé à l'intérieur de la protéine, les autres seraient situés à sa surface. Trois chaînes glucidiques, riches en mannose, sont localisées à l'interface des différents domaines. Cette localisation traduit le fait que les N-glycosylations permettent de stabiliser la structure du fait de liaisons hydrogènes. Ces chaînes glucidiques riches en mannose jouent aussi un rôle protecteur contre la protéolyse. En effet, certaines enzymes (la pepsine notamment) catalysent le clivage des liaisons entre des résidus hydrophobes et aromatiques. Or, ces résidus se trouvent protégés par les chaînes glucidiques (Maksimainen *et al.*, 2013).

Les β-galactosidases issues de *Kluyveromyces Lactis* et *Kluyveromyces Marxianus* (99 % d'identité) font partie de la famille des GH 2, tout comme la β-galactosidase la plus étudiée, celle issue d'*Escherichia Coli*. Elles se présentent sous la forme d'un tétramère, composé de deux dimères. Chaque monomère est constitué de 1024 résidus d'acides aminés, possède une masse moléculaire d'environ 119 kDa et se compose de 5 domaines structuraux (Figure 19).

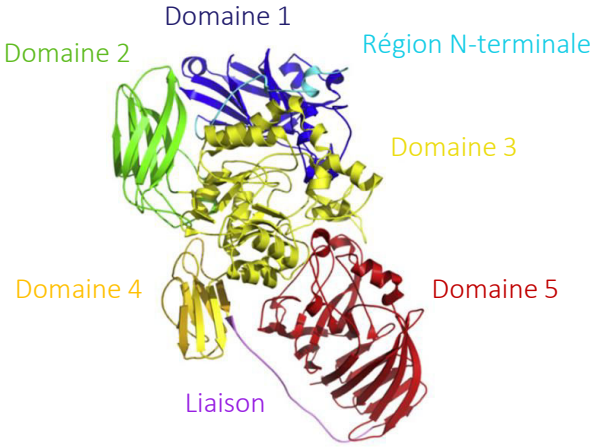


Figure 19 : Structure de la β-galactosidase issue de *Kluyveromyces Lactis*, adapté de Pereira-Rodríguez *et al.* (2012)

Le domaine central (résidus 333 à 642, en vert clair sur la Figure 19), se présente sous la forme d'un tonneau α/β et contient le site actif de l'enzyme. La poche catalytique est formée par des résidus provenant des domaines 1, 3 et 5, qui façonnent une cavité très étroite (10 Å) d'environ 20 Å de profondeur (Pereira-Rodríguez *et al.*, 2012).

L'hydrolyse enzymatique de la liaison glycosidique du lactose se fait par catalyse acide et nécessite 2 résidus particuliers : un donneur de proton et un nucléophile. Pour la plupart des β-galactosidases, il s'agit de résidus d'acide glutamique. La première étape de l'hydrolyse consiste en la formation du complexe enzyme-substrat : le nucléophile permet la formation transitoire d'une enzyme glycosylée, tandis que le donneur de proton permet le clivage de la liaison C-O du substrat et donc la libération du résidu de glucose. L'enzyme glycosylée réagit dans un second temps avec un groupement hydroxyle, libérant ainsi le produit final de réaction et l'enzyme sous sa forme initiale (Figure 20) (Zhou et Chen, 2001).

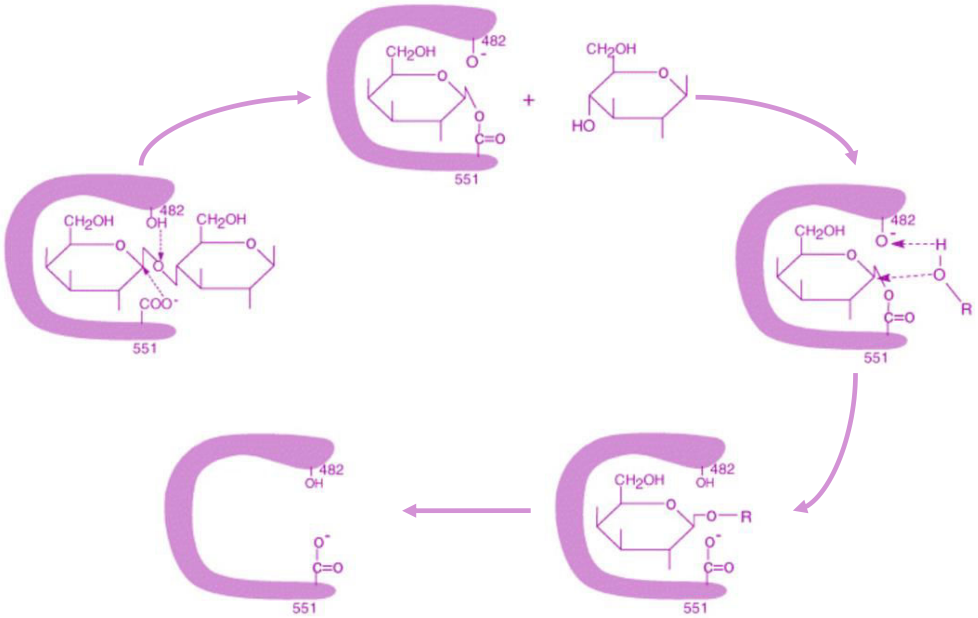


Figure 20 : Mécanisme d'hydrolyse du lactose par la β-galactosidase sécrétée par *Kluyveromyces Lactis*, adapté de Zhou et Chen (2001)

Dans une solution peu concentrée en lactose, l'eau est généralement un accepteur plus compétitif que les autres glucides (lactose, glucose et galactose notamment). La molécule de galactose emprisonnée dans le site actif est alors libérée. À l'inverse, dans une solution concentrée en lactose, la probabilité que les glucides agissent en tant qu'accepteurs est plus importante et cela entraine ainsi la formation d'oligosides (Chen et Duan, 2015 ; López Leiva et Guzman, 1995 ; Mahoney, 1998 ; Rustom *et al.*, 1998 ; Sheu *et al.*, 1998).

2.1.3. Propriétés biochimiques

Selon leur source, les β-galactosidases microbiennes présentent des propriétés biochimiques différentes (Tableau 12).

Tableau 12 : Propriétés catalytiques des β-galactosidases commerciales, d'après Dekker et Daamen (2011)

Source	pH optimal	Température optimale (°C)	Activateurs	K_m lactose ($mmol.l^{-1}$)	K_i galactose ($mmol.l^{-1}$)
A. oryzae	4,5 - 6	50	-	50	57
K. lactis	6,5 - 7	35	K^+, Mg^{2+}, Mn^{2+}	15	42
K. marxianus	6,5 - 7,5	37	K^+, Mg^{2+}, Mn^{2+}	14	28

2.1.3.1. Effet du pH

L'activité enzymatique de la plupart des enzymes dépend fortement du pH : des pH extrêmes peuvent avoir un effet de dégradation irréversible (dénaturation) sur l'enzyme en

modifiant sa structure spatiale, par répulsion de groupements chargés puis par rupture de liaisons covalentes ou non. Le pH peut aussi modifier l'état d'ionisation du substrat s'il possède des groupements polaires, voire l'état d'ionisation de l'enzyme elle-même. La relation entre l'activité et le pH se traduit en général par une courbe en cloche, avec une branche ascendante acide, un pH optimum et une branche descendante basique (Combes et Monsan, 2009). Les β-galactosidases issues de levures (Maxilact® commercialisée par DSM et Lactozym® commercialisée par Novozymes) présentent un pH optimal très proche de la neutralité, généralement compris entre 6 et 7 (Figure 21). Elles sont ainsi bien adaptées à l'hydrolyse du lactose du lait. L'acidification de leur environnement (à des pH compris entre 4,5 et 5) entraine une perte d'activité totale. À l'inverse, les β-galactosidases issues de champignons (telles que la Lactase DS produite par Amano Enzymes Inc. et la Tolerase L™ produite par DSM) sont actives dans un environnement acide, et le sont nettement moins dans un environnement neutre. Ainsi, elles sont principalement utilisées en tant que complément alimentaire pour l'hydrolyse du lactose dans l'estomac (Dekker, 2011).

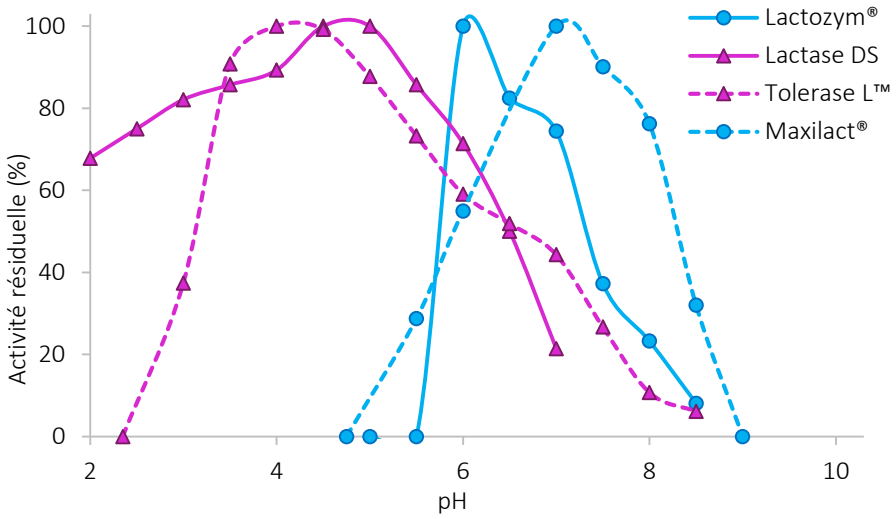


Figure 21 : Activité de certaines β-galactosidases commerciales en fonction du pH (données issues des fiches techniques des enzymes)

2.1.3.2. Effet de la température

La température joue aussi un rôle primordial dans l'activité d'une enzyme. La vitesse initiale d'une réaction enzymatique croît en effet régulièrement avec l'augmentation de la température, sur une plage généralement comprise entre 0 et 50 °C. Cela s'explique en partie par l'agitation moléculaire plus importante qui entraine une augmentation du nombre de collisions des molécules, mais surtout par une énergie de collision entre les molécules plus importante. Mais au-delà d'une certaine température, l'agitation thermique des molécules de solvant du milieu provoque la rupture de certaines liaisons, modifiant l'organisation de l'enzyme qui perd sa structure tertiaire et

donc son activité catalytique. L'enzyme est alors dénaturée (Combes et Monsan, 2009). Ainsi, les β-galactosidases d'origine fongique présentent une température optimale relativement élevée (généralement comprise entre 50 et 60 °C) et peuvent être utilisées, selon l'enzyme, jusqu'à des températures proches de 70 °C. À l'inverse, les β-galactosidases issues de levures présentent une température optimale comprise entre 30 et 40 °C et sont rapidement dénaturées à des températures supérieures (Figure 22). De par sa matrice, le lait peut toutefois présenter un effet stabilisant (Dekker et Daamen, 2011).

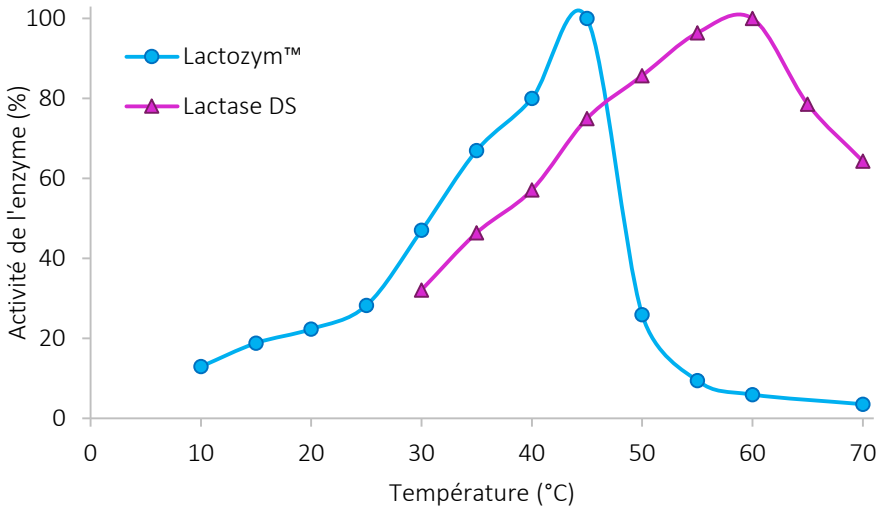


Figure 22 : Activité de certaines β-galactosidases commerciales en fonction de la température (données issues des fiches techniques des enzymes)

Quelques études ont par ailleurs mis en évidence un effet athermique du chauffage au four micro-ondes sur les propriétés structurales de certaines protéines (notamment globulaires), qui entrainerait leur précipitation (de Pomerai *et al.*, 2003 ; Porcelli *et al.*, 1997). Cependant, le contrôle de la température n'est pas suffisant dans ces travaux pour attribuer ces observations à l'unique effet des micro-ondes (Ehlermann, 2002).

2.1.3.3. Effet des inhibiteurs et des activateurs

Globalement, d'après les valeurs de la constante d'inhibition (K_i) (Tableau 12), le galactose est un inhibiteur compétitif de toutes les β-galactosidases : il se combine avec l'enzyme libre et empêche la liaison du lactose (Dekker et Daamen, 2011). Le glucose est quant à lui, à très haute concentration, un inhibiteur non-compétitif : il n'a pas d'effet sur la liaison entre le substrat et l'enzyme mais se lie de façon réversible et aléatoire sur différents sites de l'enzyme, son caractère inhibiteur est par conséquent limité (Mahoney, 2002). En règle générale, les ions métalliques sont des inhibiteurs des β-galactosidases mais ce phénomène est intimement lié au milieu dans lequel

évolue l'enzyme (tampon, lactosérum ou lait). Le potassium, le magnésium et le manganèse sont par ailleurs des activateurs des β-galactosidases issues des levures : ils augmentent la vitesse de réaction catalytique sans être impliqués dans la réaction catalysée par l'enzyme. Les β-galactosidases fongiques ne semblent dépendre d'aucun activateur (Dekker et Daamen, 2011). Les protéines de lait permettraient d'activer et de stabiliser les enzymes issues de *Kluyveromyces lactis* et *Kluyveromyces marxianus*, tandis que le lait préchauffé, du fait de la libération de groupements -SH libres, active lui aussi l'enzyme (Jiménez-Guzmán et *al*., 2002).

2.1.4. Aspect réglementaire

Naturellement, les enzymes sont présentes dans les ingrédients utilisés pour la production d'aliments et sont par conséquent historiquement considérées comme étant non toxiques. Elles ne présentent par conséquent pas de problèmes en matière de sécurité alimentaire. Cependant, le développement de nouvelles méthodes de production plus performantes, ainsi que l'utilisation de nouvelles sources d'enzymes, telles que les micro-organismes génétiquement modifiés, ont conduit à l'utilisation d'enzymes plus complexes. Jusqu'en 2008, les enzymes alimentaires qui n'étaient pas utilisées en tant qu'additifs alimentaires n'étaient pas règlementées au niveau de l'Union européenne, mais seulement soumises aux législations respectives des États membres en tant qu'auxiliaires technologiques. Depuis 2009, les enzymes alimentaires sont encadrées par un règlement européen (CE n°1332/2008) qui prévoit l'établissement d'une liste positive des enzymes autorisées en Europe. Cette première harmonisation européenne s'appliquera progressivement d'ici à l'horizon 2025, mais ne s'appliquera pas aux enzymes à but nutritionnel et digestif. Dans la littérature, très peu d'études ont été menées sur le seuil de toxicité de la β-galactosidase. Une étude a été réalisée sur une β-galactosidase commerciale produite par une souche de *Kluyveromyces Lactis* (Coenen *et al.*, 2000). La toxicité de l'enzyme a été étudiée chez la souris. La NOAEL (No-observed-adverse-effect-level) est estimée à 10000 $mg.kg^{-1}$ de masse corporelle par jour, soit 114000 $NLU.kg^{-1}$ de masse corporelle par jour. En ce qui concerne les instances publiques, l'EFSA recommande l'ajout de 4500 NLU ou ALU par repas contenant du lactose (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2009), tandis que Santé Canada préconise de ne pas dépasser 18000 LAU par repas, 1 à 3 fois par jour.

2.1.5. Conclusion

Globalement, seules deux souches microbiennes permettent la production de β-galactosidases commerciales utilisables dans le domaine alimentaire : la levure *Kluyveromyces*

Lactis et la moisissure *Aspergillus Oryzae*. Elles présentent des différences structurales et catalytiques. Les enzymes issues de la souche *Kluyveromyces Lactis* présentent généralement un pH optimal très proche de la neutralité, compris entre 6 et 7. L'acidification de leur environnement (pH inférieur à 4) entraine une perte d'activité totale. Elles présentent aussi une température optimale comprise entre 30 et 40 °C et sont rapidement dénaturées à des températures supérieures. Les β-galactosidases sécrétées par *Aspergillus Oryzae* sont, quant à elles, actives à pH acide mais le sont nettement moins à pH neutre. Elles sont aussi relativement thermostables : leur température optimale est comprise entre 50 et 60 °C et elles sont stables jusqu'à environ 70 °C.

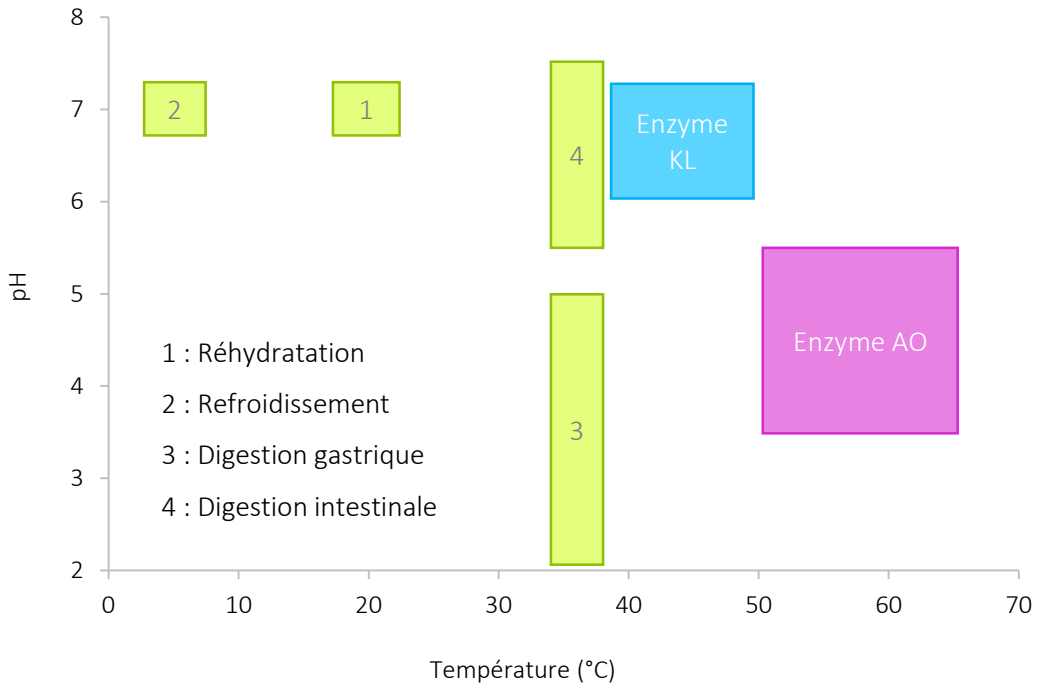


Figure 23 : Activité des enzymes KL et AO en fonction de la température et du pH, et comparaison aux conditions de vie du produit

Pour notre application, l'enzyme KL pourrait donc permettre une hydrolyse du lactose durant la phase de réhydratation, de refroidissement et/ou durant la phase intestinale, tandis que l'enzyme AO pourrait permettre une hydrolyse dans l'estomac. L'action de ces deux enzymes sera donc étudiée durant la réhydratation, le refroidissement et la digestion gastro-intestinale (Figure 23). Aussi, l'influence du traitement thermique sur l'activité de l'enzyme sera étudiée. Enfin, la quantité d'enzyme ajoutée correspondra à celle recommandée par l'EFSA, à savoir 4500 ALU ou NLU par produit contenant du lactose.

2.2. Résultats et discussion

Pour rappel, l'objectif de cette étude est de développer quatre types de produits alimentaires (différant dans leur mode de préparation) adaptés à la grande majorité de la population intolérante au lactose. Pour ce faire, deux β-galactosidases ont été sélectionnées. Elles seront tout d'abord caractérisées : température optimale, pH optimal et paramètres cinétiques. Leur efficacité hydrolytique sera ensuite étudiée durant les différentes phases de la vie des quatre produits : réhydratation, refroidissement, digestion gastrique et digestion intestinale. L'effet du traitement thermique de référence sur l'activité des enzymes sera lui aussi étudié. Cela permettra finalement de statuer quant à la possibilité de recourir à l'une ou l'autre des enzymes pour atteindre l'objectif initialement fixé.

2.2.1. Caractérisation des β-galactosidases

2.2.1.1. Détermination de la température optimale des β-galactosidases

L'influence de la température sur l'activité de l'enzyme KL et de l'enzyme AO a été étudiée en solution SMUF lactosée (48 $g.l^{-1}$) respectivement à pH 6 et pH 5. D'après la Figure 24, la température optimale de l'enzyme AO est de 50 °C, tandis que celle de l'enzyme KL est d'environ 45 °C. Ces données sont globalement en accord avec celles du fournisseur (Figure 22), même si l'enzyme AO présente une température optimale légèrement inférieure à celle attendue (60 °C).

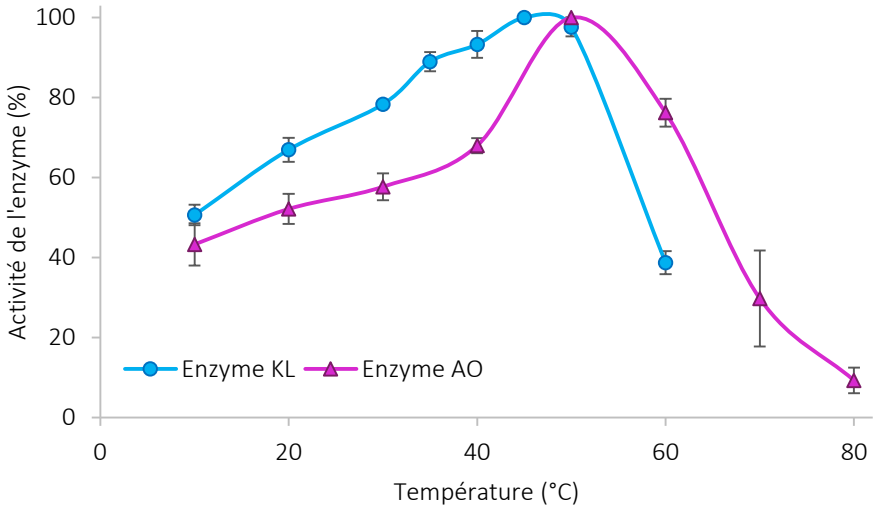


Figure 24 : Activité des enzymes KL et AO en fonction de la température

Au-delà de 50 °C, l'activité des deux enzymes diminue rapidement puisqu'à 80 °C, elle n'est plus que de 9,3 % pour l'enzyme la plus thermostable. En deçà de 50 °C, l'activité des deux enzymes diminue plus lentement pour atteindre entre 45 et 50 % d'activité à 10 °C. D'après ces premiers

éléments, il semblerait que l'enzyme KL soit plus à même d'hydrolyser le lactose durant l'étape de réhydratation (dont la température est généralement comprise entre 12 et 20 °C), ainsi que durant le passage gastro-intestinal (température proche de 37 °C) dans le cas où elle ne subit pas de traitement thermique (qui pourrait s'avérer délétère à son activité). L'enzyme AO serait quant à elle plus thermorésistante et pourrait potentiellement permettre une hydrolyse du lactose dans les conditions gastro-intestinales après un traitement thermique.

2.2.1.2. Détermination du pH optimal des β-galactosidases

L'influence du pH sur l'activité de l'enzyme KL et de l'enzyme AO a été étudiée en solution SMUF lactosée (48 $g.l^{-1}$) respectivement à 45 et 60 °C. D'après la Figure 25, l'activité des deux enzymes est très différente en fonction du pH.

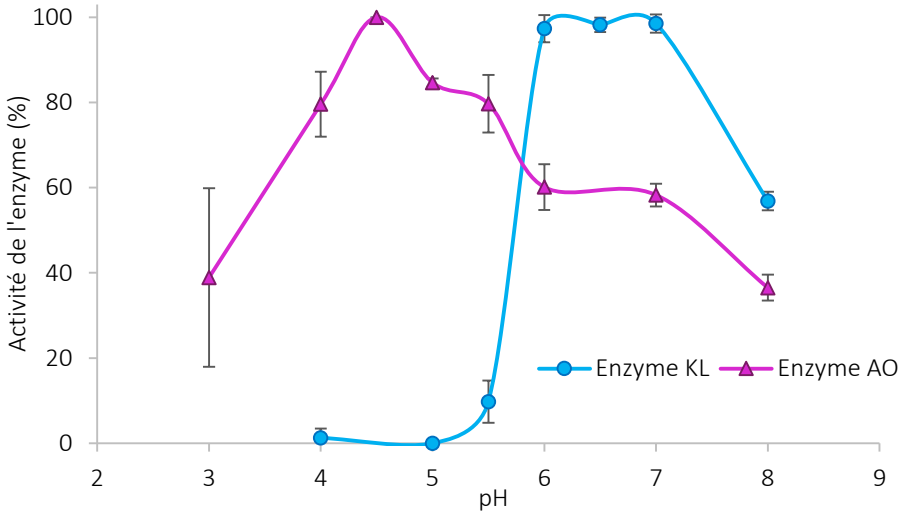


Figure 25 : Activité des enzymes KL et AO en fonction du pH

L'enzyme AO présente une activité optimale à pH 4,5. Cette activité décroît progressivement pour des pH inférieurs à 4,5 (à pH 3, l'activité de l'enzyme est proche de 40 %), tout comme dans le cas de pH supérieurs (à pH 8, l'activité est proche de 35 %). L'enzyme KL présente quant à elle une activité optimale à des pH compris entre 6 et 7. À des pH inférieurs à son pH optimal, l'activité de l'enzyme subit une chute considérable. Elle est d'environ 10 % à un pH de 5,5 et nulle pour des pH égaux ou inférieurs à 5. Pour des pH supérieurs à son pH optimal, l'activité de l'enzyme baisse progressivement : elle est d'environ 57 % à un pH de 8. Ces données sont globalement en accord avec celles données des fournisseurs (Figure 21). Au vu de ces premiers résultats, il semblerait que l'enzyme KL soit plus à même d'hydrolyser le lactose durant la réhydratation ou le refroidissement du produit (pH proche de 7) ou durant le transit intestinal (pH généralement compris entre 6 et 7) à condition qu'elle ne soit pas dénaturée lors de la digestion

gastrique (pH généralement inférieur à 5). À l'inverse, l'enzyme AO semble présenter une meilleure activité à un pH correspondant à celui du début de la digestion gastrique.

2.2.1.3. Détermination des paramètres cinétiques des β-galactosidases

Les paramètres cinétiques d'une enzyme permettent de définir son efficacité. La constante de Michaelis mesure l'affinité de l'enzyme pour son substrat et correspond à la concentration de substrat capable de saturer la moitié des sites catalytiques de l'enzyme. Expérimentalement, cette concentration est égale à la moitié de celle requise pour atteindre le V_{max}. Ainsi, plus le K_m est élevé, plus l'affinité de l'enzyme pour son substrat est faible. Pour rappel, les paramètres cinétiques de l'enzyme sont déterminés en faisant l'hypothèse que les deux enzymes sont michaeliennes. Les produits de réaction, galactose et glucose, étant respectivement des inhibiteurs compétitifs et non-compétitifs, seuls des paramètres cinétiques apparents peuvent être estimés (Tableau 13, Figure 26, Figure 27).

Tableau 13 : Paramètres cinétiques des enzymes AO et KL

	$V_{max\ apparent}$ (mol.l^{-1}.s^{-1})	$K_{m\ apparent}$ (mol.l^{-1})
Enzyme AO	1,47.10^{-4}	0,0132
Enzyme KL	3,18.10^{-4}	0,0303

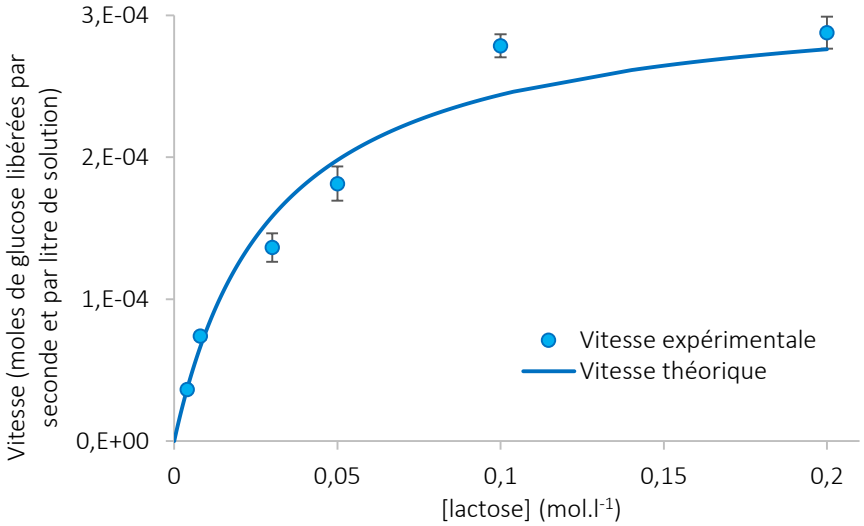


Figure 26 : Activité de l'enzyme KL en fonction de la concentration en lactose

Les valeurs des constantes cinétiques apparentes obtenues expérimentalement sont en accord avec celles données dans la littérature. D'après les valeurs du $K_{m\ apparent}$, l'affinité est plus importante entre le lactose et l'enzyme AO, qu'entre le lactose et l'enzyme KL. L'enzyme AO sera donc saturée à des concentrations en lactose inférieures à celles de l'enzyme KL. Pour notre

application, la concentration initiale en substrat est d'environ 0,14 mol.l^{-1} : ainsi, contrairement à l'enzyme KL, l'enzyme AO aura atteint sa vitesse maximale. L'objectif est d'obtenir, en fin de réaction, une concentration finale proche de 0,05 mol.l^{-1} de lactose : là encore, alors que l'enzyme AO présente une vitesse quasiment maximale, l'enzyme KL présente une vitesse largement inférieure à sa vitesse maximale. Ainsi, pour notre application, les deux enzymes semblent équivalentes.

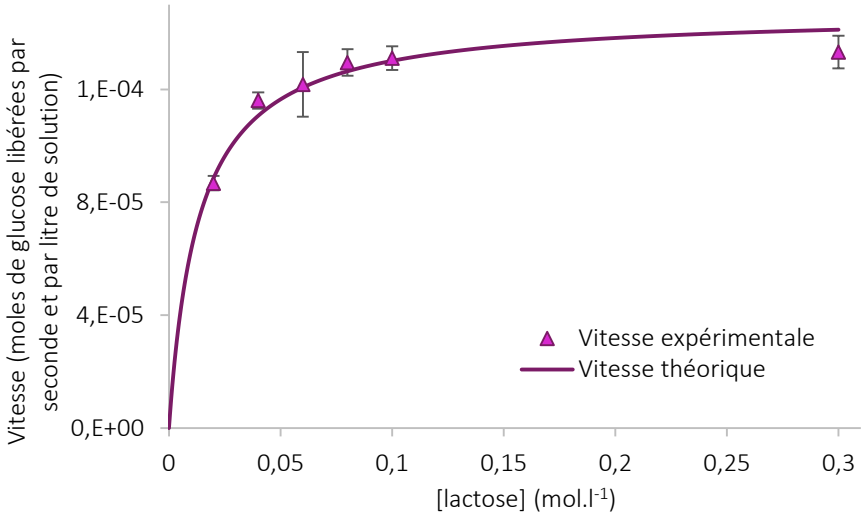


Figure 27 : Activité de l'enzyme AO en fonction de la concentration en lactose

2.2.2. Étude de l'hydrolyse du lactose durant l'étape de réhydratation

Pour rappel, l'étape de réhydratation, commune aux 4 types de produits (Figure 1), correspond à la dissolution de 25 g de formulation sèche dans 250 ml de lait ½ écrémé. Cette étape se déroule à température ambiante (environ 20 °C) et à un pH de 7. L'idéal serait qu'une des deux enzymes étudiées permette d'atteindre l'objectif fixé (18 g ou moins de lactose par litre de produit) durant cette étape. Cela permettrait en effet de s'affranchir de la variabilité liée aux traitements thermiques ou au passage gastro-intestinal du produit.

Dans un premier temps, l'hydrolyse du lactose par les deux β-galactosidases est étudiée en solution SMUF lactosée, dans les conditions de température et de pH de l'étape de réhydratation. Les résultats sont donnés en Figure 28. D'après cette figure, l'enzyme KL permet une meilleure hydrolyse du lactose que l'enzyme AO, dont l'activité est quasiment nulle. Cette observation est en accord avec les conditions optimales (pH et température) de chacune des deux enzymes. Mais globalement, d'après ces résultats, l'enzyme KL est loin de permettre d'atteindre l'objectif initialement fixé : au bout de 3 min (durée moyenne de l'étape de réhydratation), la concentration en lactose du milieu est encore d'environ 34 g.l^{-1}. Même au bout de 5 min, la concentration en

lactose est encore trop élevée pour répondre aux exigences de la population intolérante au lactose : au lieu de 18 g.l^{-1}, elle est encore de 28 g.l^{-1}.

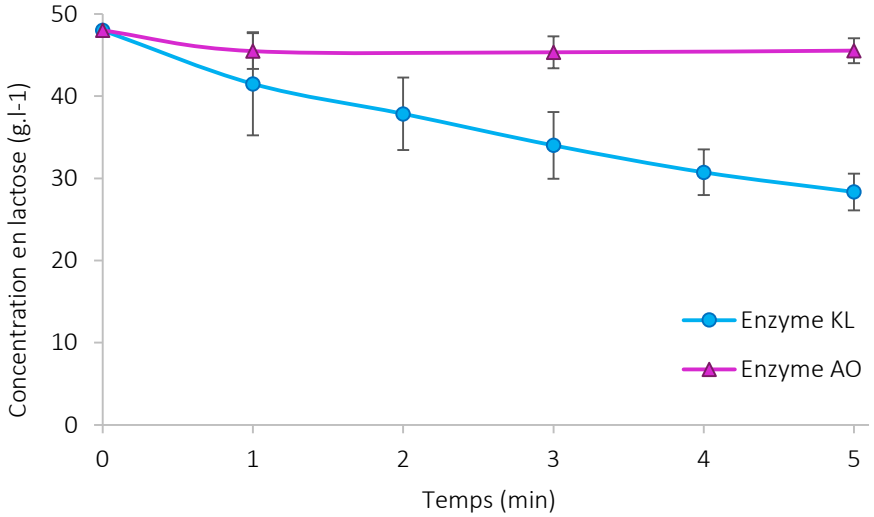


Figure 28 : Cinétique d'hydrolyse du lactose en solution SMUF dans les conditions de l'étape de réhydratation

Pour atteindre l'objectif fixé durant l'étape de réhydratation, deux solutions sont encore envisageables : préconiser aux consommateurs une durée de réhydratation plus longue ou ajouter une plus grande quantité d'enzyme. Après discussion avec la société finançant ce projet, l'augmentation de la durée de réhydratation n'est pas envisageable : dans des conditions de consommation réelles, le consommateur attendra difficilement plus de 3 min avant de consommer son produit. En restant dans des quantités d'enzymes réalistes (tant d'un point de vue règlementaire qu'économique), la seconde solution parait plus envisageable. En appliquant un facteur de sécurité à la NOAEL (paragraphe 2.1.4 de ce chapitre) et en prenant en compte le facteur économique, une quantité d'enzyme présentant une activité de 13000 NLU ou ALU pourrait être ajoutée dans chaque produit (soit 2,9 fois plus que la quantité utilisée pour la cinétique présentée en Figure 28). La réhydratation du produit dans du lait ½ écrémé est par conséquent réalisée en présence de 13000 NLU ou ALU. La concentration en lactose du produit est mesurée avant ajout de l'enzyme et après 3 min de réhydratation. Les résultats sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Concentration en lactose du produit réhydraté avant et après action des enzymes KL et AO (13000 NLU ou ALU)

Temps (min)	Concentration en lactose ($g.l^{-1}$)	
	Enzyme AO	Enzyme KL
0	48,4 ± 2,5	50,1 ± 2,3
3	49,1 ± 2,4	33,0 ± 3,6

Malgré l'ajout de 13000 ALU par produit, l'enzyme AO ne présente toujours aucune activité durant les 3 min de réhydratation. Cette observation est plutôt en accord avec les résultats obtenus lors de l'étude du pH optimal de l'enzyme : cette dernière possède en effet un pH optimal de 4,5, ce qui est relativement éloigné du pH 7 du produit réhydraté. L'enzyme KL présente, quant à elle, une activité permettant l'obtention d'un produit ayant une concentration d'environ 33 $g.l^{-1}$ à la fin de l'étape de réhydratation. Étonnamment, malgré la quantité plus importante d'enzyme placée dans le produit, celle-ci n'entraine pas une hydrolyse du lactose significativement supérieure ($P > 0,05$). Cela s'explique certainement par la différence de milieu : la cinétique précédente a été réalisée dans une solution SMUF, tandis que les résultats du Tableau 14 ont été obtenus dans le produit réhydraté. Ainsi, bien qu'elle présente une meilleure activité que l'enzyme AO, l'enzyme KL est loin de permettre d'atteindre l'objectif initialement fixé. Pour mettre en évidence l'activité enzymatique nécessaire à cela, la réhydratation du produit est réalisée avec des quantités d'enzymes KL croissantes (Tableau 15).

Tableau 15 : Lien entre l'activité enzymatique et la teneur en lactose du produit réhydraté après 3 min de réhydratation

Activité enzymatique (NLU/produit)	Teneur en lactose ($g.l^{-1}$)
20000	28,0 ± 1,4
25000	22,1 ± 0,9
30000	16,8 ± 0,3
40000	11,3 ± 1,2

D'après le Tableau 15, l'activité enzymatique nécessaire à l'obtention d'un produit répondant à l'objectif fixé serait d'environ 30000 NLU par produit. Cette activité, entre 6 et 7 fois supérieure aux recommandations de l'EFSA, est largement trop importante, tant sur le plan économique que règlementaire. **Ainsi, il semblerait que l'étape de réhydratation seule ne permette pas l'obtention de produits convenant à la majorité de la population intolérante au lactose.**

Pour le produit de type 1, l'activité des deux enzymes devra donc être étudiée dans des conditions simulant les conditions gastro-intestinales. Pour le produit de type 2, l'activité des enzymes sera étudiée dans les conditions de refroidissement. L'influence des traitements thermiques sur les enzymes sera dans le même temps étudiée pour les produits de type 3 et 4 (Figure 1).

2.2.3. Étude de l'hydrolyse du lactose durant l'étape de refroidissement

Seuls les produits de type 2 et 4 subissent une étape de refroidissement : cette dernière intervient respectivement juste après réhydratation, et après réhydratation et traitement thermique. Elle consiste généralement en un stockage à température réfrigérée (4 °C) entre 30 et 240 min. L'hydrolyse du lactose par les enzymes AO et KL a par conséquent été suivie en solution SMUF (pH 7), à 4 °C durant 6 h. Les résultats sont présentés en Figure 29.

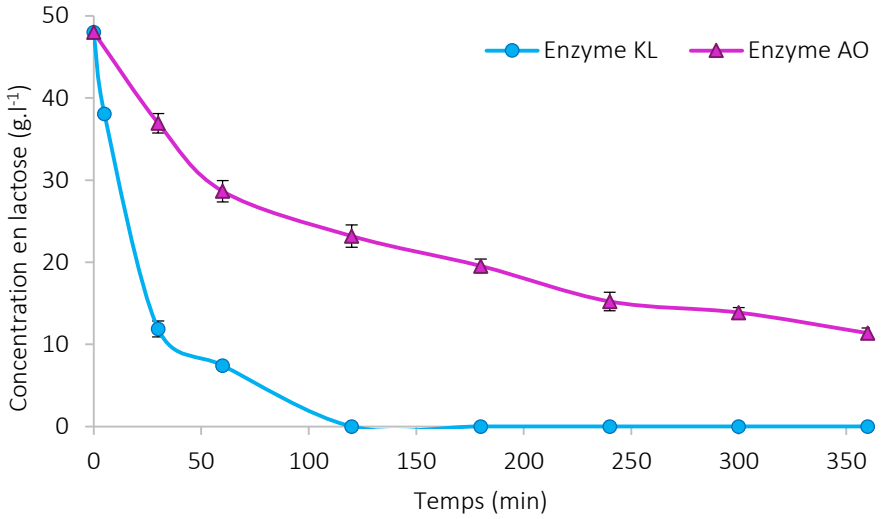


Figure 29 : Cinétique d'hydrolyse du lactose en solution SMUF dans les conditions de l'étape de refroidissement

D'après la Figure 29, malgré la température réfrigérée, l'enzyme KL permet une très bonne hydrolyse du lactose. Ainsi, au bout de 30 min de réaction, la teneur en lactose de la solution n'est plus que de 11,9 $g.l^{-1}$, ce qui est particulièrement encourageant. Au bout de 2 h seulement, la teneur en lactose est nulle. L'enzyme AO présente quant à elle une efficacité largement inférieure : la teneur en lactose est encore de 36,9 $g.l^{-1}$ au bout de 30 min, de 19,5 $g.l^{-1}$ au bout de 3 h et de 11,4 $g.l^{-1}$ au bout de 6 h.

L'efficacité de l'enzyme KL suggérant la possibilité de son utilisation pour le produit de type 2 voire de type 4, son action a été étudiée dans le produit, à savoir la formulation sèche réhydratée

dans du lait ½ écrémé. Dans ces conditions, le refroidissement inclut aussi une étape rapide de réhydratation de 30 s. Les résultats sont présentés en Figure 30.

D'après la Figure 30, bien que l'efficacité de l'enzyme KL soit légèrement moindre dans le produit réhydraté que dans la solution SMUF, elle permet une hydrolyse totale du lactose en 3 h. Au bout de 30 min, la teneur en lactose du produit est déjà inférieure à 18 $g.l^{-1}$: un tel produit serait donc adapté à la population intolérante au lactose. Or, le produit de type 2 étant généralement stocké entre 30 et 240 min à 4 °C, **il semblerait que l'ajout de 4500 NLU d'enzyme KL permette l'obtention d'un produit (type 2) convenant à la majorité de la population intolérante au lactose.** Avant de statuer quant à la possibilité de recourir à cette enzyme pour le produit de type 4, il faudra étudier l'influence du traitement thermique de référence sur l'enzyme KL.

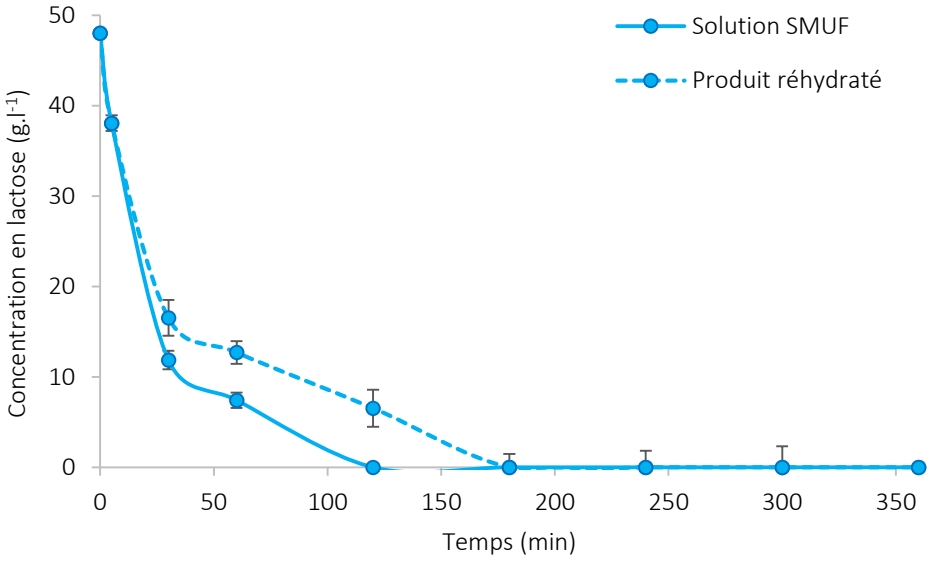


Figure 30 : Cinétique d'hydrolyse du lactose dans le produit réhydraté dans les conditions de l'étape de refroidissement

2.2.4. Étude de l'influence du traitement thermique sur l'activité des β-galactosidases

Le produit, une fois réhydraté, subit généralement un traitement thermique dans un four à micro-ondes (produits de type 3 et 4). Différents traitements thermiques ont été étudiés de façon à avoir une idée globale de l'influence de la cuisson sur l'activité catalytique des enzymes. Les paramètres de ce traitement ont été définis selon les caractéristiques des fours à micro-ondes ménagers vendus dans le commerce (paragraphe 3.5 du chapitre 1). Ainsi, le traitement thermique le plus intense correspond à l'envoi d'une puissance de 800 W durant 2 min. D'autres traitements plus « doux », détaillés dans le paragraphe 3.5 du chapitre 1 sont aussi étudiés.

Certains facteurs, tels que la teneur en eau du produit ou encore sa composition en matière grasse ou en sels, influencent les propriétés d'échauffement du produit. L'aptitude globale d'un matériau à s'échauffer sous l'action d'un rayonnement micro-ondes est qualifiée par le facteur de perte diélectrique ε''. Les produits ayant un facteur de perte inférieur à 0,1 ne se prêtent pas au chauffage par micro-ondes, tandis que ceux présentant un facteur compris entre 0,1 et 1 nécessitent une mise en œuvre particulière (c'est le cas des corps gras notamment). Enfin, pour les produits ayant un facteur de perte supérieur à 1, l'échauffement par micro-ondes est facile et rapide. Le facteur de perte diélectrique peut être décomposé en deux phénomènes : la polarisation et la friction. La constante diélectrique (ε') traduit la faculté du matériau à se polariser, tandis que la friction se manifeste par le léger retard pris par les matériaux polarisés pour s'orienter après l'application du champ électrique. Ce déphasage est représenté par l'angle de pertes (δ). Le Tableau 16 présente les propriétés diélectriques de certains produits laitiers.

Tableau 16 : Propriétés diélectriques de produits laitiers à une fréquence de 2450 MHz, d'après Kudra *et al.* (1992)

Produit	Composition du produit (% massique)				ε'	ε''
	Mat. grasse	Protéines	Lactose	Eau		
Eau distillée	0	0	0	100	78,0	13,4
Eau + lactose (4 %)	0	0	4,0	96,0	78,2	13,7
Eau + lactose (7 %)	0	0	7,0	93,0	77,3	14,4
Eau + lactose (10 %)	0	0	10,0	90,0	76,3	14,9
Lait entier	3,17	3,25	4,79	88,1	68,0	17,6
Lait ½ écrémé	0,94	3,31	4,93	90,1	70,6	17,6

Théoriquement, la montée en température du lait est plus rapide que celle de l'eau distillée. Cette différence est notamment influencée par les ions, le lactose et les protéines qui composent le lait. Le lactose entraine par exemple une légère, mais notable, augmentation du facteur de perte diélectrique : cela peut être attribué à l'expulsion d'eau « libre » et à la stabilisation des liaisons hydrogènes de la molécule. Les protéines jouent un rôle plus marqué : l'augmentation du facteur de perte peut être attribuée à la conductivité ionique et plus particulièrement à l'acquisition d'un moment dipolaire par les protéines suite à leur hydratation. De même, la présence de sels influence positivement le facteur de perte via une conductivité ohmique (Kudra *et al.*, 1992).

Par conséquent, la montée en température de 250 ml d'eau distillée, de SMUF contenant du lactose (48 $g.l^{-1}$) et de lait a été étudiée au cours du temps et en fonction des différents traitements thermiques. Malgré la légère différence de propriétés diélectriques données en

Tableau 16, aucune différence dans l'évolution de la température n'a été observée entre les différents milieux. Son évolution moyenne pour les trois milieux est donnée en Figure 31.

Entre 0 et 20 s, la montée en température du produit est globalement identique pour les quatre derniers cycles étudiés : le produit, initialement à 19 °C, atteint une température proche de 30 °C. Le fait que ces cycles débutent par une période « ON » justifie cette observation. Pour le premier traitement thermique (« 20 % ») la température atteinte au bout de 20 s est légèrement inférieure à 25 °C. Après ces 20 premières secondes, l'évolution de la température est globalement linéaire pour les différents traitements. Des variations de température, liées à l'alternance de cycles ON/OFF, sont tout de même observables pour les quatre premiers cycles étudiés. Au bout des 2 min de traitement, ces cinq cycles permettent au produit d'atteindre des températures respectives de 33, 45, 60, 74 et 93 °C.

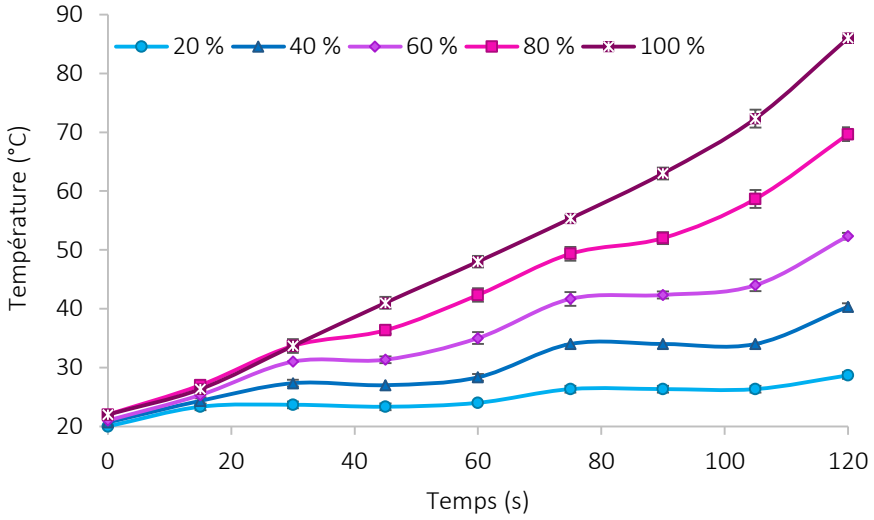


Figure 31 : Évolution de la température au sein de l'échantillon selon le cycle de traitement thermique

En tenant compte de l'activité des enzymes KL et AO en fonction de la température (Figure 24), d'importantes pertes sont à prévoir pour l'enzyme KL à partir du traitement « 60 % » et du traitement « 80 % » pour l'enzyme AO qui est plus thermostable. Dans un premier temps, les enzymes AO et KL ont respectivement été étudiées dans de l'eau et du tampon PEM (pH 6,5) et leur activité après traitement thermique a été mesurée à l'aide du test à l'ONPG. Les résultats sont présentés en Figure 32.

Le premier traitement thermique (« 20 % ») entraine une perte d'activité d'environ 13 % pour l'enzyme AO et aucune perte pour l'enzyme KL. Pourtant, le traitement thermique subi par l'enzyme est particulièrement « doux » : le produit atteint en effet une température de 28 °C au bout de 60 s et une température de 33 °C en fin de traitement. Ces températures, largement en deçà de la température optimale de l'enzyme (50 °C) ne devraient pas entrainer de dénaturation

de l'enzyme en un temps aussi court. Il en est d'ailleurs de même pour les traitements thermiques suivants : le cycle « 40 % » entraine une perte de 20 et de 23 % respectivement pour les enzymes AO et KL. Pourtant, la température atteinte au bout de 60 s n'est que de 34 °C et celle atteinte à la fin du traitement thermique n'est que de 45 °C. Pour le traitement « 60 % », les pertes d'activité s'accentuent encore : respectivement, les enzymes AO et KL ont perdu 55 et 100 % de leur activité initiale. Une perte d'activité de l'enzyme KL était attendue du fait de la température élevée atteinte en fin de cycle (60 °C) et de sa relative thermosensibilité. À l'inverse, la perte d'activité observée pour l'enzyme AO n'était pas attendue. Pour les traitements suivants, une perte quasiment totale de l'activité est observée pour les deux enzymes : des températures finales de 74,3 et de 93,3 °C sont respectivement atteintes pour les traitements « 80 % » et « 100 % ».

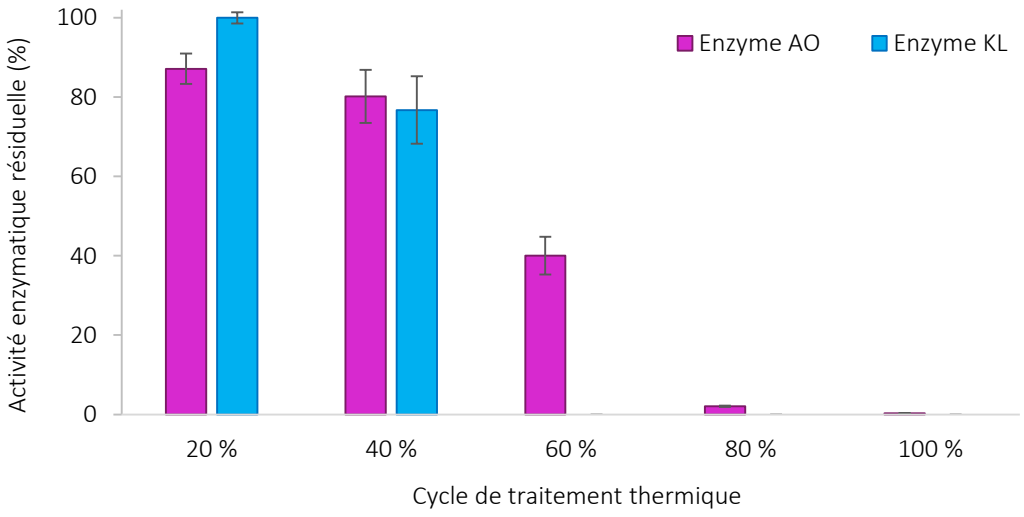


Figure 32 : Activité enzymatique résiduelle selon les différents cycles de traitements thermiques en solution aqueuse ou tamponnée

Trois principaux facteurs pourraient expliquer ces pertes inattendues. Tout d'abord, lors de traitements thermiques, la plupart des enzymes sont stabilisées par la présence de leur substrat qui empêche leur agrégation (Iyer et Ananthanarayan, 2008). Cette propriété a notamment été mise en évidence pour les β-galactosidases (Yang *et al.*, 1994). Ainsi, contrairement aux expérimentations ayant permis de mettre en évidence la température optimale de l'enzyme (Paragraphe 2.2.1.1), les expérimentations précédentes ont été réalisées en l'absence de lactose ou de tout autre substrat de l'enzyme. Cela pourrait en partie expliquer la dénaturation prononcée des deux enzymes. Un effet athermique du chauffage au four micro-ondes sur les propriétés structurales des enzymes pourrait entrainer leur précipitation (de Pomerai *et al.*, 2003 ; Porcelli *et al.*, 1997). Cependant, dans les travaux mettant en évidence un tel phénomène, le contrôle de la température n'est pas suffisant pour attribuer ces observations à l'unique effet des micro-ondes

(Ehlermann, 2002). Ainsi, pour l'heure, aucun effet athermique des micro-ondes sur la structure des protéines n'a été mis en évidence. Un dernier facteur expliquant la dénaturation prématurée de l'enzyme AO pourrait être le pH. En effet, le traitement thermique est réalisé à un pH proche de 7 (correspondant au pH du produit après réhydratation), ce qui est particulièrement éloigné du pH optimal de l'enzyme AO (pH 4,5). Ainsi, ce pH pourrait dans un premier temps déclencher une répulsion entre les groupements chargés de l'enzyme AO (Kishore *et al.*, 2012) et l'application de températures modérées à élevées pourrait par la suite entrainer plus aisément son déploiement et son agrégation. L'étude des enzymes dans une solution SMUF contenant 48 $g.l^{-1}$ de lactose parait donc essentielle pour statuer sur l'éventuel effet bénéfique de la présence du substrat de réaction sur l'activité des deux enzymes. Les résultats de cette étude sont donnés en Figure 33 et sont comparés aux résultats obtenus précédemment.

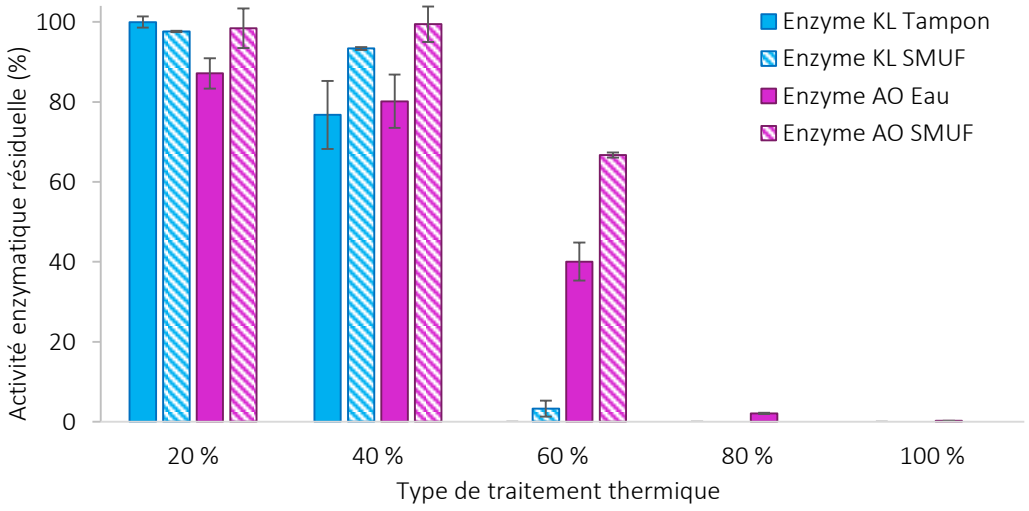


Figure 33 : Activité enzymatique résiduelle selon les différents cycles de traitements thermiques en solution SMUF lactosée (48 $g.l^{-1}$)

En solution SMUF et en présence de lactose, le premier traitement thermique (« 20 % ») n'entraine aucune perte d'activité pour chacune des deux enzymes. En milieu aqueux, la perte en activité de l'enzyme AO était de 13 % : il est donc envisageable que la présence de lactose protège l'enzyme de la dénaturation thermique. De même, pour les traitements « 40 % » et « 60 % », une légère augmentation de l'activité résiduelle est observable. En revanche, pour les deux derniers traitements (« 80 % » et « 100 % »), aucune amélioration n'est observée. Ainsi, il semblerait que la présence de lactose et d'ions dans le milieu réactionnel puisse légèrement améliorer la stabilité thermique des deux enzymes. Cette hypothèse a d'ailleurs été validée par une étude sur une β-galactosidase produite par une souche de *Kluyveromyces Lactis* (Mahoney et Wilder, 1988). La présence d'ions K^+, tout comme celle d'ions divalents (présents dans le SMUF) est connue pour

stabiliser cette enzyme. Comparé à une solution tampon de phosphate (contenant la même teneur en ions magnésium), le SMUF permettrait d'ailleurs d'augmenter la stabilité de l'enzyme. Dans le même temps, cette enzyme est aussi stabilisée par la présence de lactose, de glucose et de galactose (respectivement substrat et produits de l'enzyme). Le saccharose (qui ne peut pénétrer le site actif de l'enzyme) n'a à l'inverse aucune influence sur la stabilité. Ainsi, il s'agit d'un mécanisme de stabilisation spécifique. À concentrations molaires équivalentes, le lactose est plus efficace que le galactose. Cela pourrait refléter la meilleure affinité de l'enzyme pour le lactose, bien que ce ne soit pas le seul mécanisme. Mais malgré la présence de lactose et d'ions, les deux enzymes étudiées restent particulièrement sensibles au traitement thermique, notamment à ceux présentant une température finale supérieure à 60 °C. La présence de protéines laitières présentant elles aussi un potentiel effet stabilisateur sur les β-galactosidases, leur activité a été mesurée après un traitement thermique dans du lait ½ écrémé. Les résultats sont présentés en Figure 34.

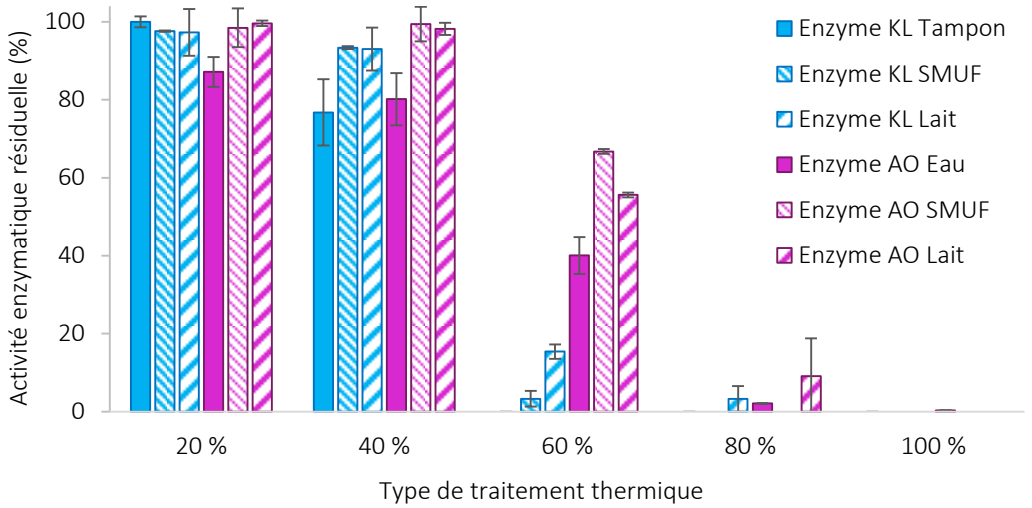


Figure 34 : Activité enzymatique résiduelle selon les différents cycles de traitements thermiques dans du lait ½ écrémé

Pour les deux premiers traitements thermiques étudiés (« 20 % » et « 40 % »), l'activité résiduelle des deux enzymes est identique en solution SMUF lactosée et dans du lait ½ écrémé : elle est très proche de 100 %. Pour le traitement thermique « 60 % », une amélioration de l'activité dans le lait est observée pour l'enzyme KL (15 % d'activité résiduelle dans le lait contre 3 % dans la solution SMUF lactosée) tandis qu'une légère diminution est observée pour l'enzyme AO (66 % en solution SMUF contre 55 % dans le lait). Pour le traitement à 80 %, une légère amélioration est visible pour les deux enzymes, mais leur activité résiduelle reste approximativement nulle. Il en est de même pour le dernier traitement thermique (« 100 % »). La légère stabilisation des enzymes dans du lait est probablement liée à la présence de protéines. En effet, les protéines (et notamment

les caséines et les protéines sériques) sont connues pour stabiliser les enzymes solubles. Ces dernières stabiliseraient les enzymes en perturbant les interactions enzyme-solvant et en favorisant ainsi les liaisons hydrophobes intramoléculaires (Mahoney et Wilder, 1988).

Pour conclure, malgré l'effet stabilisant du lait sur les enzymes KL et AO, ces dernières restent sujettes à dénaturation pour des traitements thermiques présentant une température finale supérieure à 50 °C. Or, d'après les dernières données fournies par l'industriel, il est recommandé aux consommateurs un traitement thermique à 750 W durant 1 min 30 s. La température au sein du produit a par conséquent été suivie à l'aide du four à micro-ondes Mars 6 (CEM Corporation, États-Unis). Les données sont présentées en Figure 35.

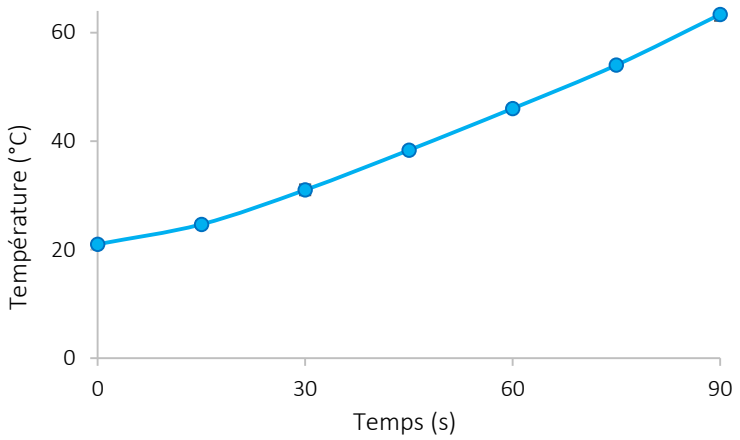


Figure 35 : Évolution de la température au sein d'un échantillon subissant un traitement thermique de 1 min 30 s à 750 W

En utilisation réelle et conformément aux recommandations données dernièrement aux consommateurs, le produit atteindra généralement des températures au moins supérieures à 60 °C (Figure 35). **Ainsi, pour espérer une action des enzymes durant la phase de digestion, il conviendra de développer une méthode de stabilisation.** La stabilisation de l'enzyme AO permettrait son intégration au produit de type 3 voire au produit de type 4 pour une action éventuelle durant le transit gastrique, tandis que la stabilisation de l'enzyme KL permettrait son intégration au produit de type 4 pour une action durant le refroidissement. Avant le développement d'une quelconque protection, l'action des deux β-galactosidases a été étudiée durant la digestion gastrique et intestinale.

2.2.5. Étude de l'action des β-galactosidases durant la digestion gastrique

Après sa réhydratation et un éventuel refroidissement et/ou traitement thermique, le produit est consommé. La digestion des protéines débute dans l'environnement gastrique qui présente un faible pH et qui contient des protéases (Cook *et al.*, 2012). En particulier, la pepsine a une propension à hydrolyser les liaisons peptidiques au niveau des résidus hydrophobes tels que la phénylalanine et la leucine (Hamuro *et al.*, 2008). Ce phénomène est d'ailleurs facilité par le dépliement des protéines en milieu acide. Ces deux mécanismes, en agissant de façon synergique, sont particulièrement efficaces pour dénaturer les enzymes : l'estomac est le principal obstacle rencontré par les formulations enzymatiques administrées par voie orale (Fuhrmann et Leroux, 2014).

Dans un premier temps, seule l'influence du pH gastrique sur l'activité des deux enzymes a été étudiée dans un milieu simulant la composition saline du lait, contenant 48 $g.l^{-1}$ de lactose et maintenu à 37 °C. Le pH est ajusté au fur et à mesure de la cinétique selon l'évolution donnée en Tableau 5. La cinétique d'hydrolyse du lactose par les deux enzymes est donnée en Figure 36.

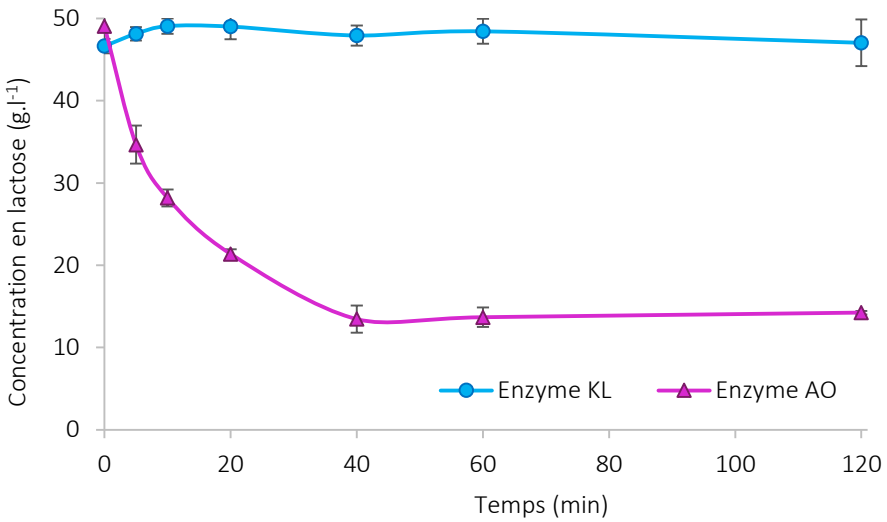


Figure 36 : Cinétique d'hydrolyse du lactose en solution SMUF dans les conditions de température et de pH de l'étape de digestion gastrique

D'après la Figure 36, l'enzyme KL ne présente aucune activité durant les 120 min de digestion gastrique. Elle est donc inactivée, voire dénaturée à un pH de 4,8. Cette observation est en accord avec les résultats du paragraphe 2.2.1.2 : l'enzyme ne présentait plus aucune activité à des pH inférieurs à 5. L'enzyme AO présente, quant à elle, une activité significative durant les 40 premières minutes de réaction. Par la suite, plus aucune activité n'est observée. Cela signifie qu'elle est active à des pH compris entre 4,8 et 4,2, mais que pour des pH égaux ou inférieurs à 2,8,

l'enzyme est inactivée voire dénaturée. Là aussi, les résultats sont corrélés à ceux obtenus au paragraphe 2.2.1.2 : l'enzyme présentait en effet une activité optimale à un pH de 4,5, mais subissait une perte d'activité significative pour des pH inférieurs. L'action de l'enzyme AO permet l'obtention d'un milieu ayant une concentration d'environ 13 $g.l^{-1}$ de lactose, ce qui est satisfaisant au regard de l'objectif initialement fixé (moins de 18 g de lactose par litre de produit). Bien que la présence de chaînes glucidiques semble permettre la protection des β-galactosidases contre l'attaque enzymatique de certaines protéases, et notamment de la pepsine (Maksimainen *et al.*, 2013), il convient d'étudier l'activité de l'enzyme AO dans un milieu simulant la digestion gastrique.

Le protocole choisi pour l'étude de l'influence de la digestion gastrique sur l'activité de l'enzyme AO est détaillé dans le paragraphe 3.6.1 du chapitre 1. Globalement, il consiste à placer le produit réhydraté contenant l'enzyme dans une solution ionique gastrique, en présence de pepsine. Le milieu est maintenu à 37 °C et le pH est ajusté tout au long de la cinétique selon les valeurs données en Tableau 5. La cinétique d'hydrolyse du lactose par la β-galactosidase AO, durant la digestion gastrique est donnée en Figure 37.

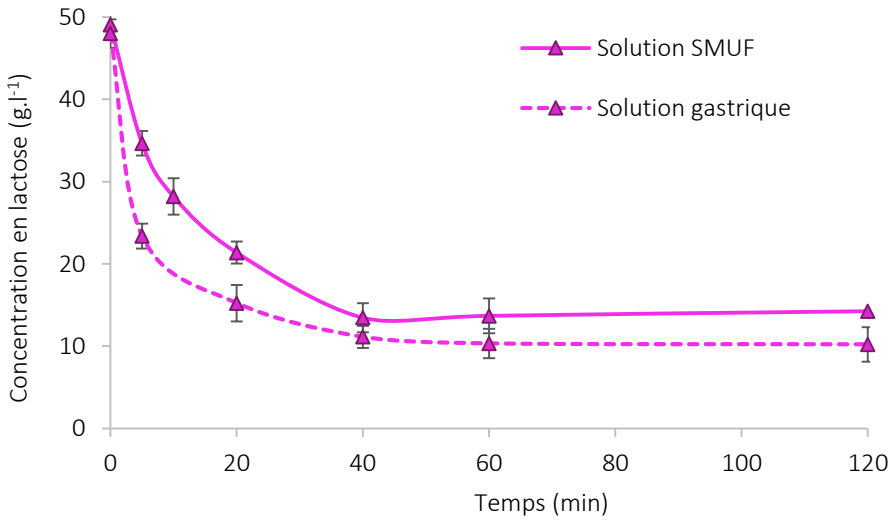


Figure 37 : Cinétique d'hydrolyse du lactose durant la digestion gastrique *in vitro* monocompartimentée

D'après la Figure 37, l'hydrolyse du lactose durant la digestion gastrique *in vitro* semble suivre une cinétique proche de celle observée dans une simple solution de SMUF. Il semblerait donc que l'enzyme AO ne soit pas affectée par la présence de pepsine. La présence de chaînes glucidiques riches en mannose au niveau de la structure des β-galactosidases (Maksimainen *et al.*, 2013) permet d'expliquer en partie cette observation. Cela s'explique aussi par le fait que le pH, relativement élevé en début de cinétique, n'est pas optimal pour l'activité de la pepsine (Trowers et Tischler, 2014) et n'entraine pas le dépliement des enzymes qui faciliterait l'action de la pepsine (Fuhrmann et Leroux, 2011). Dans la littérature, très peu de travaux ont étudié l'activité de

β-galactosidases durant le transit gastro-intestinal simulé *in vitro*. O'Connell et Walsh (2006) ont tout de même étudié l'activité *in vitro* de 4 compléments alimentaires à base de β-galactosidase dans des conditions gastro-intestinales. Les β-galactosidases utilisées dans ces 4 compléments sont aussi issues de la souche *Aspergillus Oryzae*. Les paramètres de la digestion gastrique sont légèrement différents de ceux choisis pour cette étude, notamment concernant le pH : ce dernier est maintenu durant l'intégralité du processus (120 min) à une valeur de 2. D'après les auteurs, deux des quatre compléments présentent encore une activité enzymatique proche de 100 % après ces 2 h d'incubation. La résistance des deux enzymes provient en réalité d'un enrobage entérique (enrobage permettant la protection de la substance active dans l'estomac et sa libération d'un l'intestin grêle). Ainsi, lorsque les enzymes sont extraites des comprimés ou des gélules, ces dernières sont totalement dénaturées après 1 min d'incubation en solution gastrique. Nos résultats sont par conséquent en accord avec les observations de cette étude.

D'après les résultats obtenus, la digestion gastrique pourrait donc permettre à l'enzyme AO d'atteindre l'objectif initialement fixé. Mais *in vivo*, l'intégralité du bol alimentaire (notamment lorsqu'il est sous forme liquide) ne stagne pas dans l'estomac durant 40 min : la vidange gastrique entraine régulièrement une partie du contenu gastrique vers le duodénum. Il convient donc de vérifier, en se rapprochant au mieux du déroulement de la digestion gastro-intestinale, que l'enzyme AO permet bien l'hydrolyse de la majorité du lactose présent dans le produit.

Pour cela, un modèle bicompartimenté, dont le principe et les paramètres ont été détaillés en paragraphe 3.6.2 du chapitre 1, a été mis au point. L'une des principales modifications apportée au modèle monocompartimenté a été la simulation de la vidange gastrique, et l'apport séquentiel des solutions gastriques (pepsine et lipase) et intestinales (pancréatine, acides biliaires et trypsine). Contrairement aux précédentes cinétiques pour lesquelles il était aisé de pratiquer des prélèvements, dans le cas de ce modèle semi-dynamique, seul un prélèvement en fin de phase intestinale est réalisable. Ainsi, après passage gastrique et intestinal, la concentration finale en lactose du produit a été mesurée. Cette dernière est de 17,0 ± 1,9 $g.l^{-1}$.

Pour répondre aux besoins de la majorité des intolérants au lactose, il a été mis en évidence que l'apport en lactose devait être inférieur à 18 g de lactose par litre de produit. Les paramètres simulant la digestion gastro-intestinale ayant été choisis pour se placer dans les conditions les plus néfastes pour l'enzyme, **il est donc envisageable de penser que l'ajout de 4500 ALU au produit de type 1 permettrait l'obtention d'un produit qui conviendrait à la majorité des personnes intolérantes au lactose.**

2.2.6. Étude de l'action des β-galactosidases durant la digestion intestinale

Après digestion gastrique, le bol alimentaire rejoint le duodénum grâce au phénomène de vidange gastrique. Le pH rencontré est alors proche de la neutralité. Bien que la plupart des enzymes exogènes soient à priori stables à ce pH, elles peuvent tout de même être dégradées par les peptidases pancréatiques (trypsine et chymotrypsine notamment) et dénaturées par les sels biliaires (Fuhrmann et Leroux, 2014).

Dans un premier temps, seule l'influence du pH intestinal sur l'activité des deux enzymes a été étudiée en solution SMUF, contenant 48 $g.l^{-1}$ de lactose et maintenu à 37 °C. Le pH est maintenu à une valeur de 7 tout au long de la cinétique. La cinétique d'hydrolyse du lactose par les deux enzymes est donnée en Figure 38.

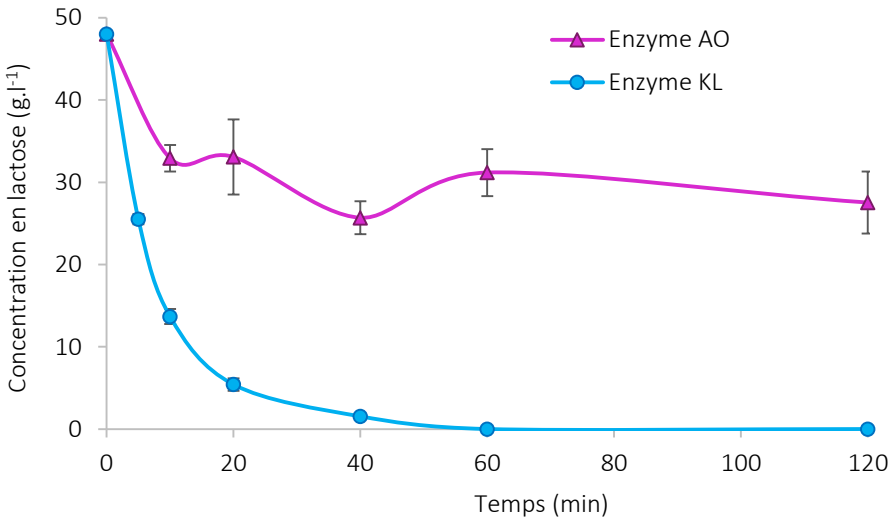


Figure 38 : Cinétique d'hydrolyse du lactose en solution SMUF dans les conditions de l'étape de digestion intestinale

D'après la Figure 38, l'enzyme AO présente une activité relativement faible durant la cinétique effectuée à une température de 37 °C et à un pH de 7. L'hydrolyse permet l'obtention d'une solution ayant une teneur en lactose proche de 30 $g.l^{-1}$. Cette observation est en corrélation avec la faible activité de l'enzyme observée à la température (Figure 24) et au pH (Figure 25) de l'étape de digestion intestinale. Respectivement, l'activité mesurée était de 65 et 60 %. Ainsi, l'enzyme AO n'est probablement pas dénaturée dans les conditions étudiées, mais ces dernières ne sont pas favorables à son activité. L'absence de dénaturation de l'enzyme AO dans ces conditions est d'ailleurs confirmée par l'étude de O'Connell et Walsh (2006). L'enzyme KL présente à l'inverse une très bonne activité dans les conditions de pH et de température correspondant à l'étape de digestion intestinale. Au bout de 5 min de réaction, la teneur en lactose de la solution est déjà

divisée par deux, et une hydrolyse totale est observée au bout de 60 min de réaction. Ces observations sont aussi en corrélation avec les résultats obtenus au paragraphe 2.2.1.2 de ce chapitre : le pH de digestion intestinale correspond au pH optimal de l'enzyme et cette dernière conserve environ 90 % de son activité à la température corporelle. Cela laisse penser que l'enzyme KL pourrait permettre une hydrolyse totale du lactose au niveau de son lieu d'action privilégié : l'intestin grêle. Cependant, il reste à vérifier que la présence des peptidases pancréatiques et des sels biliaires n'engendre pas une importante dénaturation de l'enzyme.

Pour cela, le protocole de digestion intestinal *in vitro* issu d'un consensus international (Minekus *et al.*, 2014) a été scrupuleusement suivi. Globalement, il consiste à placer le produit réhydraté (en présence de l'enzyme) dans une solution ionique contenant des acides biliaires et de la pancréatine. Le mélange est maintenu à 37 °C et à un pH de 7. Le détail du protocole est donné en paragraphe 3.6.1.2. La cinétique d'hydrolyse du lactose par la β-galactosidase KL, durant la digestion intestinale est donnée en Figure 39.

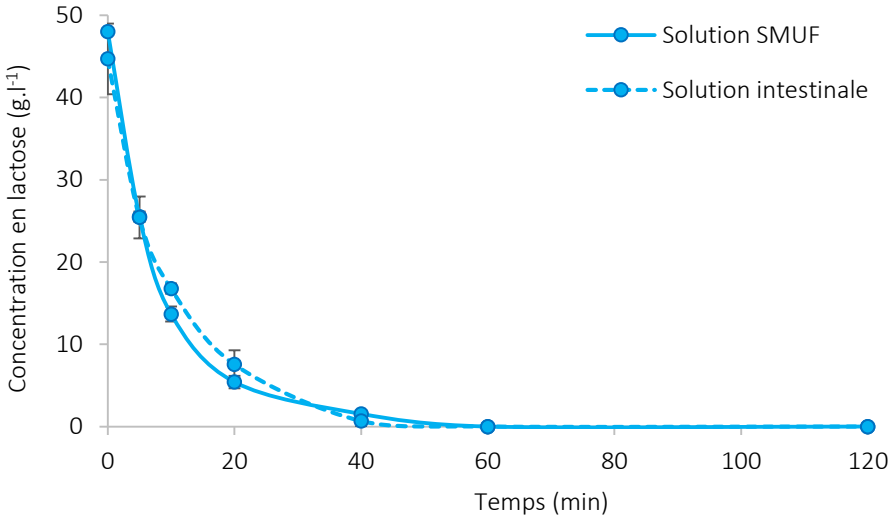


Figure 39 : Cinétique d'hydrolyse du lactose durant la digestion intestinale *in vitro* monocompartimentée

D'après la Figure 39, l'hydrolyse du lactose par l'enzyme KL est aussi efficace en solution SMUF que durant la digestion intestinale simulée *in vitro*. Il semblerait donc que l'enzyme ne soit sensible ni aux peptidases pancréatiques (trypsine et chymotrypsine) ni aux sels biliaires. Les quatre β-galactosidases issues de la souche *Aspergillus Oryzae* et étudiées par O'Connell et Walsh (2006) ne présentent, elles non plus, aucune dénaturation suite à l'ajout de pancréatine ou de bile au milieu intestinal. Des β-galactosidases issues d'autres sources ont par ailleurs montré la même résistance à la pancréatine (Turkiewicz *et al.*, 2003). L'enzyme KL pourrait donc permettre l'obtention d'un produit sans lactose avant son arrivée dans le côlon. Avant cela, il reste à

déterminer si la digestion gastrique entraine une simple inhibition de l'activité enzymatique ou bien s'il s'agit d'une dénaturation irréversible.

Pour ce faire, le produit réhydraté subit une digestion gastrique durant 120 min comme décrit dans le paragraphe 3.6.1.1 puis une digestion intestinale identique à celle précédemment décrite. Des échantillons sont prélevés tout au long de ces deux digestions et leur teneur en lactose est déterminée par CLHP. Les résultats de cette digestion complète sont donnés en Figure 40.

La Figure 40 montre clairement une absence totale d'hydrolyse de la part de l'enzyme KL durant l'intégralité du processus de digestion. Ainsi, plus qu'une inhibition, l'enzyme subit manifestement une dénaturation complète durant l'étape de digestion gastrique. Cette observation est en accord avec la probabilité d'un dépliement partiel de la protéine dû au faible pH, avec un potentiel effet synergique de la pepsine présente dans le milieu. La même observation a d'ailleurs été faite par O'Connell et Walsh (2006) : les β-galactosidases fongiques, pourtant censées être moins sensibles au pH acide, sont dénaturées en moins de 1 min dans une solution à pH 2, contenant ou non de la pepsine. En revanche, les mêmes enzymes munies d'un enrobage entérique résistent très bien à ce pH durant 2 h.

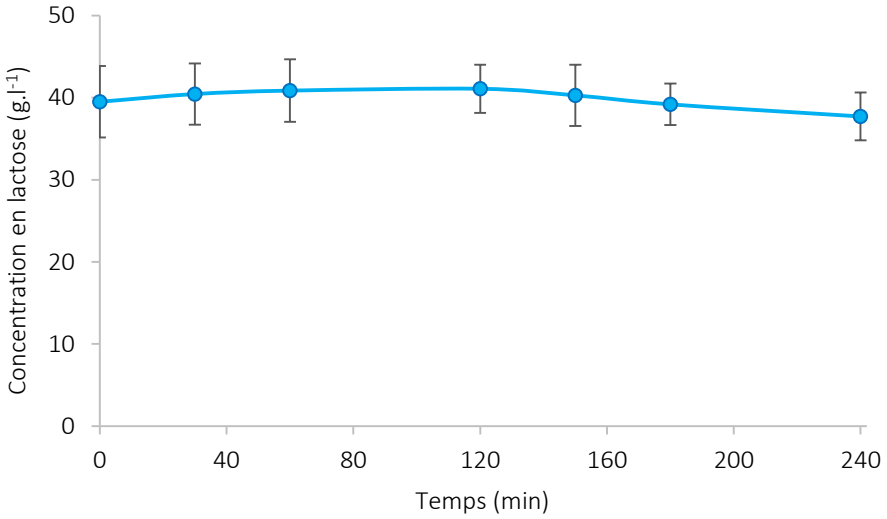


Figure 40 : Cinétique d'hydrolyse du lactose durant la digestion gastrique et intestinale

Ainsi, il semblerait que l'enzyme KL ne puisse être utilisable dans le produit qu'à condition qu'elle soit protégée de l'environnement gastrique néfaste à la conservation de sa structure. Dans le même temps, l'enzyme KL, tout comme l'enzyme AO, devra être protégée du traitement thermique en four à micro-ondes.

2.3. Conclusion

Les β-galactosidases sont largement répandues dans la nature et sont notamment sécrétées par les micro-organismes. Du fait de leur intérêt commercial, de nombreuses recherches ont été menées pour sélectionner les souches idéales. Malgré ces recherches, seules cinq enzymes sont actuellement autorisées pour des applications dans le domaine alimentaire et seules trois sont commercialisées pour des applications d'hydrolyse. Parmi ces trois β-galactosidase, deux présentent une activité optimale à pH neutre, tandis que l'optimum de la dernière est à pH acide. Elles présentent donc des conditions optimales de pH très différentes. D'un point de vue législatif, aucune règlementation n'existe quant à la quantité maximale d'enzyme additionnée aux produits alimentaires. Mais l'EFSA conseille tout de même le recours à environ 4500 unités d'activité enzymatique par produit et par repas.

L'étude expérimentale nous a tout d'abord permis de mettre en évidence les propriétés des deux principales β-galactosidases à vocation industrielle actuellement commercialisées : une β-galactosidase produite par la souche *Aspergillus Oryzae* et commercialisée sous forme pulvérulente par la société Amano Enzyme Inc. ainsi qu'une β-galactosidase sécrétée par la souche *Kluyveromyces Lactis* et commercialisée sous forme liquide par la société Novozymes. Les propriétés de ces deux enzymes sont particulièrement différentes. Alors que le pH optimal de l'enzyme KL est proche de la neutralité, celui de l'enzyme AO est proche de 4,5. Aussi, l'enzyme AO est légèrement plus thermostable que l'enzyme KL et leurs températures optimales sont respectivement de 50 et 45 °C. Par la suite, la capacité des deux enzymes à hydrolyser le lactose dans les différents types de produits a été étudiée. Pour cela, l'activité des deux enzymes a tout d'abord été suivie en conditions de réhydratation, étape commune à tous les types de produits. Malgré une activité prometteuse de l'enzyme KL, la quantité d'enzyme nécessaire à l'obtention d'un produit présentant une teneur en lactose inférieure à 18 $g.l^{-1}$ est largement supérieure aux recommandations de l'EFSA. Outre le problème sanitaire, cela pose aussi un problème économique. Les enzymes devront donc agir après l'étape de réhydratation.

Pour le produit de type 1, l'étape suivant la réhydratation est la consommation. L'activité des deux enzymes a par conséquent été étudiée durant la digestion gastrique et la digestion intestinale. Durant la digestion gastrique, malgré la présence de pepsine et d'un pH particulièrement acide, l'enzyme AO permet l'obtention d'un produit convenant à la majorité de la population intolérante au lactose. Ainsi, les produits de type 1 peuvent être additionnés de 4500 unités d'enzyme AO (Figure 41).

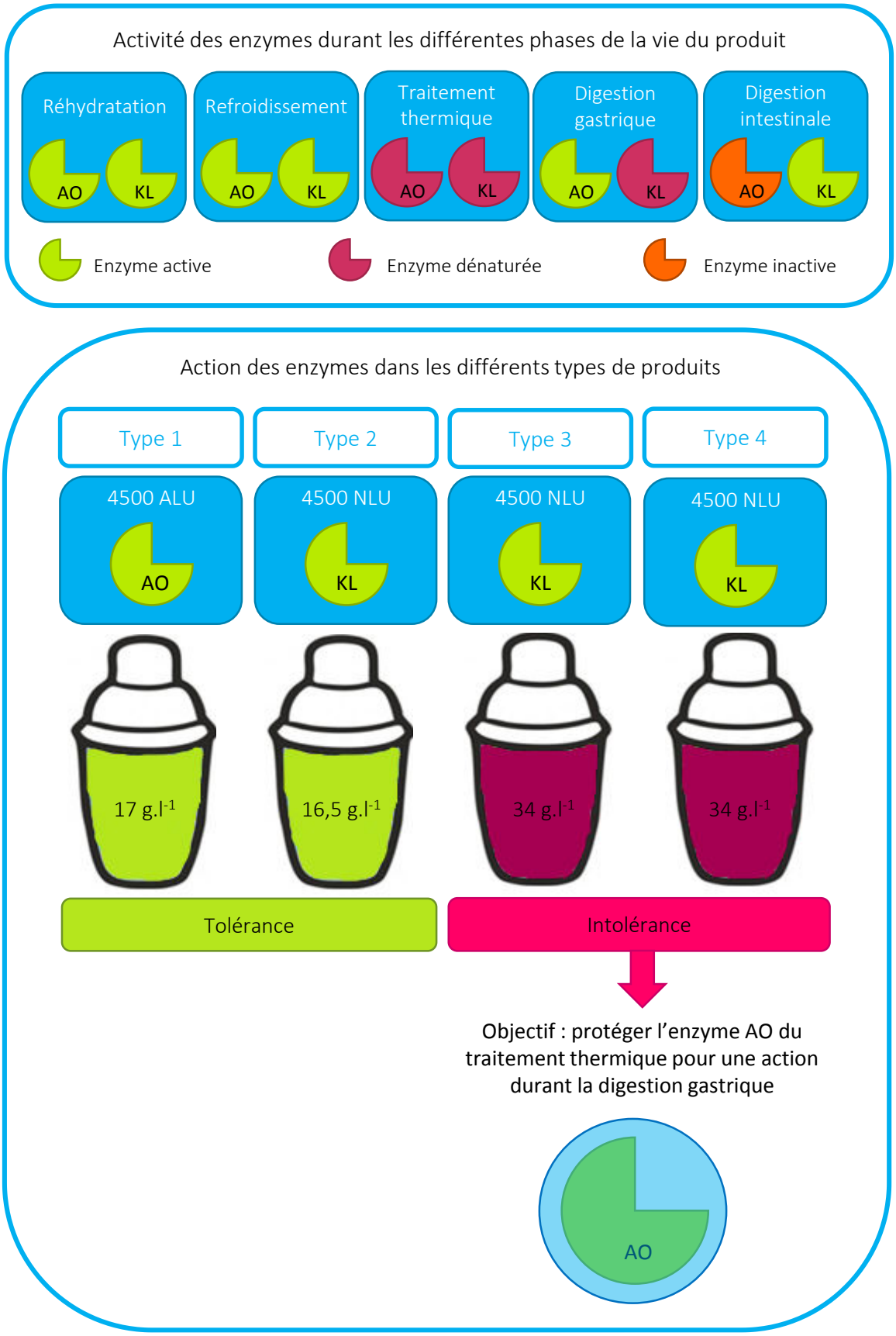


Figure 41 : Bilan de l'incorporation des enzymes AO et KL aux différents produits et perspectives

Le produit de type 2, après réhydratation, est stocké durant 30 min à 4 h en conditions réfrigérées. L'efficacité d'hydrolyse des deux enzymes a par conséquent été étudiée dans ces conditions. Ainsi, d'après les résultats obtenus, l'ajout d'enzyme KL (4500 NLU) à la formulation permet l'obtention d'un produit convenant à la majorité des intolérants au lactose (Figure 41). Les produits de type 3 et 4 subissent quant à eux un traitement thermique directement après réhydratation. D'après l'étude menée, le traitement thermique de référence entrainerait une dénaturation totale des deux enzymes : ces dernières sont en effet particulièrement thermosensibles. Ainsi, pour espérer obtenir des formulations de type 3 et 4 convenant à la population intolérante au lactose, la protection des enzymes devra être étudiée (Figure 41). Si ces dernières sont correctement protégées du traitement thermique, elles pourront agir durant le passage gastrique (enzyme AO) ou durant le passage intestinal (après protection de l'enzyme KL par un enrobage entérique) dans les produits 3 et 4 ou, pour le produit de type 4, durant le refroidissement (par ajout de 4500 NLU d'enzyme KL). Mais l'enzyme AO présentant une meilleure thermostabilité et n'ayant pas besoin d'être protégée du passage gastrique, sa protection sera prioritairement étudiée.

3. Protection des β-galactosidases par encapsulation

D'après l'étude menée précédemment, l'étape de réhydratation ne permet pas, à elle seule, l'obtention de produits convenant aux intolérants au lactose. Pour les produits de type 1 et 2, une solution existe : l'ajout, respectivement, de 4500 unités d'enzymes AO et KL permet l'obtention de produits ayant une teneur en lactose inférieure à 18 $g.l^{-1}$. Mais le traitement thermique en four à micro-ondes que subissent les produits 3 et 4 entraine une dénaturation des enzymes AO et KL, qui ne présentent ensuite plus aucune activité catalytique. Il est donc nécessaire de tenter de les protéger de ce traitement thermique néfaste. Dans cette optique, une étude bibliographique a été menée : elle détaille les différentes méthodes de stabilisation applicables aux enzymes, et se concentre par la suite sur l'encapsulation. Les procédés d'encapsulation extrapolables à l'échelle industrielle, ainsi que les matrices d'encapsulation autorisées dans le domaine alimentaire y sont par la suite détaillés. Cette étude nous a finalement permis de sélectionner un procédé idéal et des matrices prometteuses. La seconde partie de ce chapitre se consacre donc à la partie expérimentale : encapsulation des enzymes et évaluation de leur efficacité après protection.

3.1. Protection des β-galactosidases : étude bibliographique

3.1.1. Méthodes de stabilisation des enzymes

Les enzymes sont largement utilisées en industrie (pharmaceutique, alimentaire, textile…) pour leur grande spécificité (chirale et moléculaire), leur activité incomparable en conditions douces et leur biodégradabilité. Mais leur instabilité intrinsèque (caractéristique de leur structure complexe) entraine des difficultés de production, de stockage et d'utilisation. Selon la théorie de Lumry-Eyring, l'inactivation enzymatique est un phénomène présentant au moins 2 phases : un dépliement réversible de l'enzyme native, suivi par des étapes cinétiquement irréversibles entrainant l'agrégation de l'enzyme ou des modifications covalentes de sa structure. Parmi les nombreux facteurs pouvant entrainer ce type de modification, on compte notamment la température, le pH acide et la présence de protéase (Iyer et Ananthanarayan, 2008). Pour améliorer la stabilité des enzymes vis-à-vis de ces facteurs, quatre grands axes ont été développés.

3.1.1.1. Enzymes issues d'organismes extrêmophiles

Les organismes extrêmophiles sont capables de résister à des environnements hostiles tels que les sources chaudes, les milieux salins présentant une force ionique très importante ou encore des profondeurs correspondant à des pressions extrêmes. Un certain nombre d'études se sont intéressées à des β-galactosidases thermophiles issues de bactéries et d'archées (Berger *et al.*, 1995 ; Ichikawa *et al.*, 1992 ; Moracci *et al.*, 1992, 1995 ; Owusu et Cowan, 1989 ; Stevenson *et al.*, 1996 ; Tanaka *et al.*, 1975). Une β-galactosidase issue de *Thermus* sp. souche T2 présente, par exemple, une meilleure résistance aux agents hydrophobes et une meilleure stabilité à la température, au pH et aux agents chimiques que la β-galactosidase issue de *Kluyveromyces marxianus* (Pessela *et al.*, 2003). Les enzymes thermophiles présentent des structures tridimensionnelles très similaires aux enzymes mésophiles : la différence réside en fait dans la structure primaire de séquences éloignées de leur site actif mais permettant le maintien de leur conformation. Globalement, ces enzymes présentent plus d'interactions (liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques, interactions hydrophobes, ponts disulfures…) et une meilleure structure conformationelle (plus rigide, stabilité des hélices α…) que les enzymes mésophiles. En revanche, elles présentent une efficacité catalytique moindre à des températures modérées (Iyer et Ananthanarayan, 2008). Pour l'heure, aucune β-galactosidase de ce type n'est disponible commercialement pour une application industrielle.

3.1.1.2. Ingénierie génétique

L'une des stratégies développées pour stabiliser les enzymes consiste en la manipulation de leur séquence primaire par des technologies recombinantes. Des études comparatives ont révélé qu'il existe de nombreuses stratégies mutationnelles conduisant à une grande stabilité, dont certaines ne sont pas évidentes à définir et à rationaliser. Récemment, l'importance de la surface de la protéine dans les phénomènes de stabilisation a été mise en évidence, tout comme le fait qu'un nombre limité de mutations pourrait engendrer une importante stabilisation. L'introduction de résidus de proline ou de ponts disulfures semble permettre une stabilisation entropique. Toutefois, aucune stratégie globale ne permet la conversion d'enzymes mésophiles en enzymes thermophiles (Iyer et Ananthanarayan, 2008). Le remplacement des résidus hydrophobes (phénylalanine et leucine notamment), dont les liaisons peptidiques sont préférentiellement clivées par la pepsine, par des résidus analogues moins sujets à hydrolyse a aussi été exploré (Ehren *et al.*, 2008). Ces recherches n'ont pour l'heure permis le développement d'aucune β-galactosidase commerciale.

3.1.1.3. Modifications chimiques

Contrairement aux méthodes d'ingénierie génétique, les modifications chimiques ne se limitent pas aux 20 acides aminés les plus courants : théoriquement, la modification de la structure des chaînes latérales d'acides aminés est quasiment illimitée. Généralement, ces modifications reposent sur des conjugaisons covalentes avec des polymères (Iyer et Ananthanarayan, 2008). Une β-galactosidase a récemment été modifiée chimiquement à l'aide d'un polymère hydrophile (polyéthylène glycol 40 kDa) pour créer un encombrement stérique autour de l'enzyme (Turner *et al.*, 2011). Ce greffage permet de limiter l'accès aux protéases endogènes, mais doit être contrôlé pour permettre au substrat de rejoindre son site catalytique (Liu *et al.*, 2013). De même que pour les deux précédentes méthodes, aucune β-galactosidase modifiée chimiquement n'est actuellement disponible sur le marché.

3.1.1.4. Immobilisation

Enfin, il est possible de stabiliser les enzymes par des méthodes d'immobilisation. Il s'agit probablement de la stratégie la plus utilisée pour améliorer la stabilité, notamment thermique, de biocatalyseurs. Plusieurs types d'immobilisation existent : la liaison à un support solide, la réticulation ou l'encapsulation. La liaison d'enzymes à un support solide peut être de nature physique (liaisons de van der Waals ou hydrophobes), ionique ou covalente. Mais les liaisons

physiques sont généralement trop faibles pour maintenir l'enzyme fixée à son support ; les liaisons ioniques et covalentes sont ainsi plus adaptées. Les supports les plus couramment utilisés sont des résines synthétiques, des biopolymères ou encore des solides inorganiques. Les interactions entre le support et l'enzyme entrainent son immobilisation et lui procurent des propriétés chimiques, biochimiques, mécaniques et cinétiques particulières (Sheldon et van Pelt, 2013). La réticulation permet la formation de particules insolubles dans l'eau. Cette méthode consiste à provoquer l'agrégation de l'enzyme par ajout d'acétone, de sulfate d'ammonium ou encore d'éthanol puis à réticuler l'enzyme par l'ajout d'un agent tel que le glutaraldéhyde qui permet la formation de liaisons diimines (Hanefeld *et al.*, 2009). L'utilisation d'enzymes réticulées en industrie alimentaire nécessite cependant une étude toxicologique et d'immunogénicité ainsi qu'une autorisation de la part des autorités compétentes (Heck *et al.*, 2013). Enfin, l'encapsulation consiste en un piégeage de l'enzyme dans un réseau de polymères organiques ou inorganiques, ou une membrane. Le réseau doit permettre la diffusion des réactifs et des produits, tout en évitant la migration du biocatalyseur dans le milieu externe (Hanefeld *et al.*, 2009). Ce type d'immobilisation permet notamment de protéger certaines molécules d'intérêt du transit gastrique (Fuhrmann et Leroux, 2014). L'utilisation de substances autorisées dans le domaine alimentaire permet la protection de molécules d'intérêt et leur incorporation dans le produit alimentaire cible sans demande préalable d'autorisation.

Ainsi, de nombreuses avancées en termes de stabilisation des enzymes ont été réalisées. Cependant, assez peu d'entre elles sont pour le moment utilisables dans le domaine alimentaire. Globalement, seule l'encapsulation à l'aide de matériaux de grade alimentaire est actuellement permise. Par conséquent, seule cette voie sera envisagée dans la suite de ces travaux.

3.1.2. L'encapsulation : généralités

3.1.2.1. Définitions et objectifs

L'encapsulation correspond au piégeage d'un composé d'intérêt ou d'un système au sein d'un matériau dispersé (matrice) en vue de son immobilisation, sa protection, le contrôle de son transfert, sa structuration et sa fonctionnalisation (Poncelet *et al.*, 2007). La matrice d'encapsulation peut être constituée d'un seul ou de plusieurs composés et posséder une structure simple ou complexe (McClements, 2012) (Figure 42).

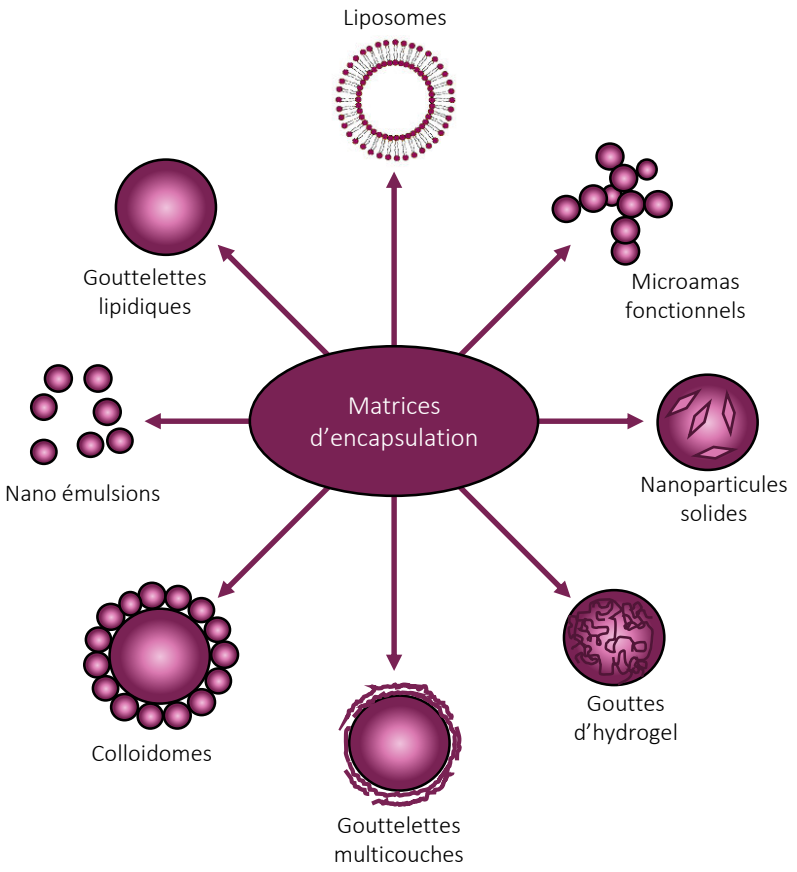


Figure 42 : Exemple de matrices d'encapsulation ayant des structures différentes, adapté de McClements (2012)

Cette encapsulation peut avoir différentes fonctions selon le type de matrice : protéger des substances actives contre les effets de l'environnement durant le stockage de l'aliment, convertir des substances liquides en poudres pour limiter le volume et améliorer la stabilité durant le stockage, isoler des substances participant à des interactions indésirables avec d'autres ingrédients affectant la qualité organoleptique du produit final, améliorer la valeur nutritionnelle d'un aliment sans en affecter le goût ou la texture, contrôler la libération des flaveurs indésirables et/ou les masquer pour améliorer la qualité du produit, ou encore prolonger ou retarder la libération de substances d'intérêt pour une libération au moment opportun (McClements, 2012).

3.1.2.2. Mécanismes de libération de la substance encapsulée

La libération d'un composé d'intérêt peut suivre différents profils : libération de la majorité du composé en un temps très court, libération prolongée à un taux relativement constant, libération en réponse à un signal environnemental (pH, température, force ionique…) ou libération lors de l'arrivée du composé au niveau d'un organe spécifique (bouche, estomac, intestin grêle, côlon…). De même, les mécanismes physico-chimiques mis en jeu dans la libération du composé

varient (Figure 43). Le composé d'intérêt peut être libéré par une diffusion simple à travers et hors de la matrice. Cette diffusion dépend principalement de la taille, de la forme, de la structure et de la composition de la particule, ainsi que du coefficient de diffusion à travers les différents composants de la matrice et du gradient de concentration entre l'intérieur de la matrice et le milieu environnant. Le composé peut aussi être libéré par un mécanisme physique de fragmentation de la matrice. Le taux de libération dépendra alors des propriétés de fracture de la particule, de la contrainte appliquée, de la taille et de la forme des fragments formés. Le composé actif, une fois la particule fragmentée, sera plus rapidement libéré du fait de l'augmentation de la surface d'échange et de la diminution du trajet de diffusion. L'érosion de la couche externe de la matrice, notamment déclenchée par des procédés chimiques, physiques ou enzymatiques, entraine le relargage du composé d'intérêt. La vitesse de libération dépend du taux d'érosion qui dépend lui-même de la structure et de la composition des couches externes de la matrice, ainsi que de l'ampleur et de la durée des phénomènes responsables de cette érosion. Le dernier mécanisme permettant une libération de composés d'intérêt est le gonflement de la matrice induit par un solvant. La vitesse de libération dépend alors du taux de gonflement et du temps de diffusion des composés à travers la matrice (McClements, 2012) (Figure 43).

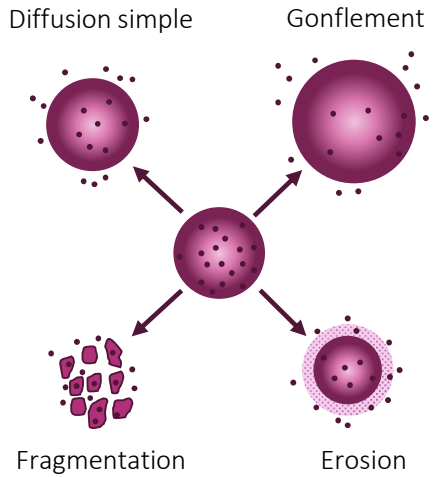


Figure 43 : Différents mécanismes de libération d'un composé encapsulé, adapté de McClements (2012)

3.1.2.3. Caractéristiques de la particule encapsulante

Un grand nombre de matériaux (lipides, tensioactifs, protéines, glucides, minéraux…), ainsi que de nombreuses techniques permettent l'obtention de matrices de structure et de composition très diverses. Mais en pratique, seule une quantité limitée de ces systèmes est utilisable à l'échelle industrielle. En effet, pour être utilisable en industrie alimentaire, la matrice doit posséder un certain nombre de caractéristiques (McClements, 2012) :

- Être de grade alimentaire : la matrice doit être exclusivement composée d'ingrédients alimentaires et être produite par des techniques autorisées dans le pays dans lequel le produit est commercialisé. En général, les ingrédients les plus utilisés sont les lipides, les protéines, les glucides, les minéraux, les tensio-actifs et l'eau.
- Être peu coûteuse : dans le domaine alimentaire, le coût de production de la matrice est un paramètre primordial. Les ingrédients, ainsi que le procédé d'obtention doivent être peu coûteux. Les bénéfices liés à l'encapsulation (amélioration de la durée de conservation, nouvelles fonctionnalités, meilleure biodisponibilité) doivent contrebalancer les coûts supplémentaires liés à l'encapsulation.
- Être compatible avec la matrice alimentaire : la matrice d'encapsulation ne doit pas affecter de façon néfaste l'apparence, la texture, l'arôme ou la durée de vie du produit.
- Posséder une capacité de charge et de rétention correcte : idéalement, la matrice d'encapsulation doit être capable d'encapsuler une grande quantité de composants par rapport à sa masse et de conserver efficacement le composé jusqu'à sa libération.

3.1.3. Les procédés extrapolables à l'échelle industrielle

Il existe un nombre important de techniques d'encapsulation (pulvérisation, pulvérisation par congélation, fluidisation, extrusion, co-extrusion, émulsification, inclusion, utilisation de fluides supercritiques…) mais assez peu d'entre elles sont aisément extrapolables à l'échelle industrielle. Globalement, seuls le séchage par pulvérisation, l'enrobage en lit fluidisé et l'encapsulation par émulsification le sont. Mais cette dernière technique n'étant pas envisageable pour notre application industrielle finale, ce paragraphe détaillera seulement le principe du séchage par pulvérisation et de l'enrobage en lit fluidisé. Par la suite, les avantages et les inconvénients de chacune de ces méthodes seront discutés, ce qui permettra de conclure quant au procédé idéal pour notre projet.

3.1.3.1. Séchage par pulvérisation

Le séchage par pulvérisation est la méthode d'encapsulation la plus utilisée dans le domaine alimentaire. Elle est économique (plus économique que la plupart des autres méthodes) et permet la production de particules de bonne qualité (Desai et Park, 2005). Le procédé d'encapsulation par atomisation est similaire au procédé conventionnel de séchage, excepté pour la préparation de la solution à atomiser qui peut se révéler légèrement plus compliquée. Elle implique souvent des étapes de dissolution, d'émulsification ou de dispersion, permettant l'obtention d'une solution ou

d'une dispersion stable. La préparation d'un tel système dépend de la nature du composé d'intérêt, de la matrice d'encapsulation sélectionnée et des paramètres de séchage. La sélection de la matrice est d'ailleurs un point clé du procédé d'encapsulation par pulvérisation : elle doit posséder de bonnes propriétés filmogènes et émulsifiantes, permettre de protéger correctement le composé d'intérêt tout en le libérant de façon contrôlée, avoir une solubilité élevée dans l'eau, une faible viscosité à haute concentration et une faible hygroscopie, être peu coûteuse et aisément disponible tout en étant insipide. Généralement, des substances telles que l'amidon modifié ou hydrolysé, les cyclodextrines, la gomme arabique ou de xanthane, l'alginate ou encore les protéines de lait, de soja, la gélatine sont largement utilisées pour l'encapsulation par atomisation (Fang et Bhandari, 2012). La configuration d'une tour de séchage est donnée en Figure 44.

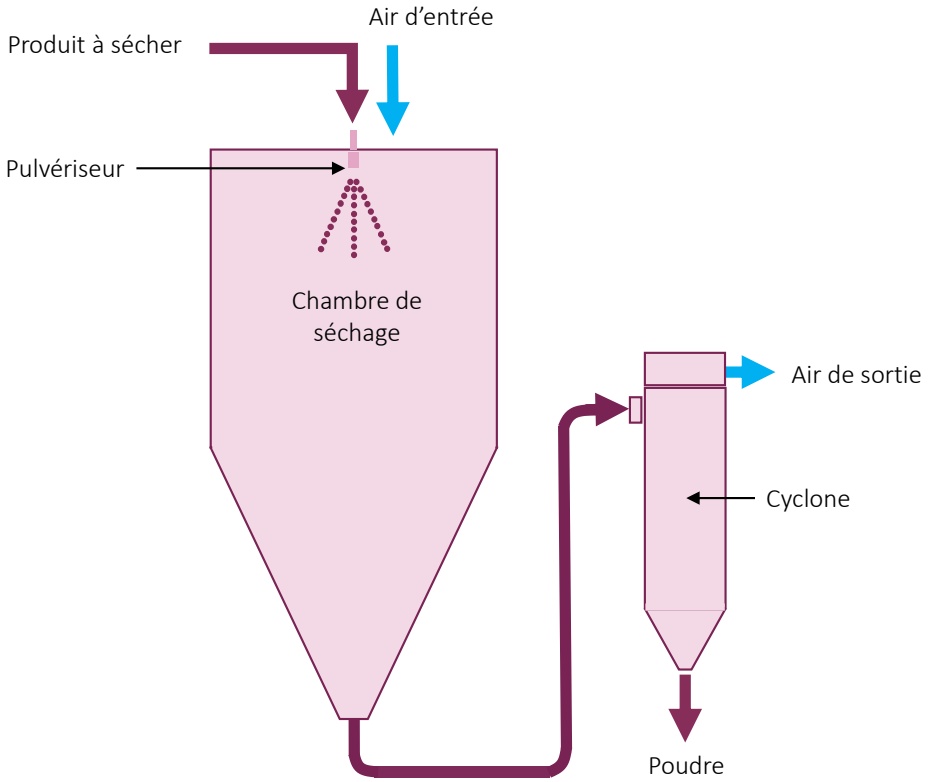


Figure 44 : Principe du procédé d'encapsulation par pulvérisation

Le produit à sécher (suspension ou dispersion) est pulvérisé en fines gouttelettes (10 à 100 µm) au sommet de la chambre de séchage par un pulvérisateur. Il en existe 3 types : la turbine centrifuge, la buse pneumatique et bifluide. La turbine, entrainée par un moteur électrique, permet l'éjection et la dispersion du liquide par une force centrifuge. La vitesse de rotation de la turbine est généralement comprise entre 10000 et 250000 tours par minute, ce qui permet la production de très fines gouttelettes. La pulvérisation peut aussi être effectuée par le passage du liquide à travers un orifice calibré qui se trouve au-dessus d'un disperseur. L'énergie de dispersion est alors

apportée par le liquide lui-même, véhiculé sous pression. Selon les installations, la pression peut varier de 5 à 30 MPa. Enfin, l'utilisation d'une buse bifluide permet notamment la pulvérisation de produits sensibles aux hautes pressions. L'énergie de pulvérisation est apportée par de l'air comprimé. Le type de pulvérisateur sera choisi en fonction de la quantité de liquide à pulvériser, de la taille des gouttelettes, de la distribution granulométrique souhaitée, de la viscosité du liquide ou encore de la conception de la tour de séchage (Jacobs, 2014 ; Schuck, 2007). Les gouttelettes ainsi formées se déplacent avec le flux turbulent d'air chaud dans la partie supérieure de la tour. Les molécules d'eau des gouttelettes migrent à la surface et sont ensuite transférées vers la phase gazeuse. Après déshydratation, les particules sont entrainées avec le gaz chaud vers un cyclone qui permet leur séparation. La poudre est récupérée, tandis que le gaz est évacué dans l'atmosphère. Globalement, toutes les tours de séchage présentent ces différents éléments mais elles varient notamment dans la configuration de la chambre, la conception du cyclone, le type de pulvérisateur ou encore la présence éventuelle d'un lit fluidisé externe ou interne (Jacobs, 2014). On parle ainsi de tour de séchage à 1, 2 ou 3 étages.

L'aspiration de l'air atmosphérique se fait au travers de filtres dont le type dépend des conditions locales et de la nature du produit à traiter. Le chauffage de l'air peut s'effectuer par chauffage direct ou indirect. Concernant les enceintes de séchage, celles à simple effet sont les plus communes. L'air de séchage entre au sommet de la tour et circule en co-courant avec les gouttelettes de liquide pulvérisé. Le temps de séjour dans la tour est court (généralement entre 20 et 60 s) mais aucun équilibre entre l'humidité de l'air et celle du produit n'est atteint : la température de l'air de séchage doit par conséquent être plus élevée et le rendement thermique est donc moindre. Les poudres obtenues par ce procédé sont fines et présentent une quantité importante de poussières et de mauvaises propriétés d'écoulement. Pour améliorer la qualité de la poudre (formation d'agglomérats), une nouvelle génération de tours de séchage, dites à multiples effets, a été conçue. Au lieu de réaliser le séchage en une seule étape, il est effectué en deux temps. Le temps de séjour du produit est plus long (plusieurs minutes) et donc plus proche de l'équilibre thermodynamique. La première étape consiste en un séchage habituel, puis les plus grosses particules pénètrent dans un lit fluidisé vibrant intégré au fond de la chambre. Ce séchage final permet l'obtention de particules ayant l'humidité résiduelle requise et présente des débits d'air et des températures de traitement plus faibles que dans la chambre de séchage. Ce procédé est mieux adapté à la préservation qualitative de la poudre. Les particules les plus fines sont quant à elles forcées de remonter vers la chambre de séchage puis passent dans un cyclone. À la sortie du cyclone, les fines sont réinjectées au sommet de la tour de façon à ce qu'elles s'agglomèrent avec

les gouttelettes pulvérisées entrantes. En fonction de la taille de la chambre et du flux d'air, ce type de procédé permet l'obtention de particules agglomérées d'un diamètre généralement compris entre 100 et 300 µm. Ces poudres présentent de bonnes propriétés d'écoulement et sont beaucoup moins poussiéreuses. Une troisième configuration de tour de séchage existe. Elle consiste à faire entrer l'air chaud à contre-courant du liquide pulvérisé. Cela permet un plus long temps de séjour du liquide et donc un gain énergétique. Ce type de séchoir est cependant peu utilisé en industrie alimentaire en raison de l'exposition thermique importante des particules. Globalement, la forme de la chambre de séchage dépend du type de produit à sécher. Les séchoirs cylindriques à fond plat sont utilisés pour des produits tels que les œufs, les jus ou la pulpe. Les produits sont déchargés grâce à un procédé pneumatique. Les chambres à fond conique sont plus couramment utilisées pour les produits alimentaires, et notamment les maltodextrines, les arômes et les émulsions (Jacobs, 2014 ; Schuck, 2007).

Du fait de la température élevée maintenue en entrée de tour, le séchage par pulvérisation est souvent considéré, à tort, comme une méthode destructive pour les molécules thermosensibles. En considérant l'intégralité du processus, il apparaît clairement que les gouttelettes, autant que les particules sèches obtenues, n'atteignent pas la température d'entrée. En effet, lorsque l'eau des gouttelettes s'évapore, celles-ci subissent un refroidissement qui les empêche d'atteindre la température de l'air de séchage. C'est seulement lors des dernières étapes du procédé, lorsque l'activité de l'eau des particules à sécher est faible, que la température de ces dernières peut s'élever. Pour les molécules thermosensibles, le procédé doit être optimisé de façon à limiter la stagnation des particules en fin de séchage. La température atteinte par les particules reste tout de même inférieure à la température de l'air en sortie (Millqvist-Fureby *et al.*, 1999). En outre, le temps de séchage par pulvérisation étant très court (généralement entre 15 et 30 s) cela limite les potentielles dégradations (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Dans le cadre d'applications industrielles, les enzymes sont souvent encapsulées ou immobilisées, et ce notamment, pour les protéger de substances telles que les ions, les protons ou d'autres substances qui pourraient provoquer leur inhibition ou leur inactivation (Gibbs *et al.*, 1999). La trypsine, les amylases, des protéases, la glucose-oxydase, les pectinases, la glucose-isomérase, la lactase ou encore la pepsine sont autant d'enzymes séchées par pulvérisation (Fang et Bhandari, 2012). Les procédés de séchage, en déshydratant partiellement les protéines, tendent tout de même à altérer leur structure secondaire. L'ajout d'excipients tels que le lactose ou le sucrose permet de limiter les phénomènes de dénaturation en formant des liaisons

hydrogènes avec les protéines (Millqvist-Fureby *et al.*, 1999). L'efficacité de ces substances est enzyme-dépendante. Par exemple, la β-galactosidase serait mieux protégée par le tréhalose que par le sucrose, le mannitol ou l'arginine (Broadhead *et al.*, 1994). À l'inverse, le sucrose protège plus efficacement le lysozyme que le tréhalose (Liao *et al.*, 2002). Les forces de cisaillement exercées par la buse de pulvérisation sont aussi responsables de modifications structurales des protéines. Un faible cisaillement doit donc être appliqué lors du séchage des protéines par pulvérisation. Du fait du caractère amphiphile des protéines, ces dernières se retrouvent principalement adsorbées à la surface des gouttelettes. Lors du séchage, les protéines subissent alors un stress plus important pouvant aboutir à un changement conformationnel. Ces changements dépendent de nombreux facteurs et notamment du pH, de la stabilité structurale de la protéine, des interactions protéines-surface et sont souvent accompagnés d'une réduction de l'activité biologique de la protéine. L'addition de surfactants, qui se placent préférentiellement à l'interface air/liquide, permet de limiter la présence de protéines adsorbées à la surface des gouttelettes et donc la dénaturation protéique (Fang et Bhandari, 2012 ; Millqvist-Fureby *et al.*, 1999).

3.1.3.2. Enrobage en lit fluidisé

Dans le domaine alimentaire, de nombreux produits se présentent sous forme de poudres et de particules solides qui, non enrobées, peuvent présenter des caractéristiques aromatiques, gustatives ou chimiques indésirables. Le mélange de certains produits peut aussi donner lieu à des réactions ou des interactions indésirables entre les composés. L'enrobage permet d'emprisonner un liquide, un solide ou un gaz dans un matériau polymère pour lui conférer des propriétés en lien avec la problématique et l'application visée. Généralement, ce procédé vise à améliorer les propriétés d'écoulement, à réduire le nombre de particules fines ou encore à améliorer sa stabilité. Il permet l'obtention de particules de type réservoir, c'est-à-dire des particules recouvertes intégralement d'une ou de plusieurs couches (El Mafadi et Poncelet, 2007) (Figure 45).

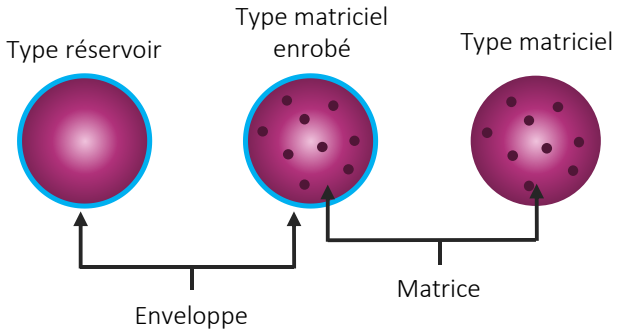


Figure 45 : Différents types de particules encapsulantes

La technologie de fluidisation a été développée dans les années 1950 dans l'industrie chimique. La fluidisation consiste à faire passer une phase fluide (très souvent un gaz) à travers un lit de particules, supportées par une grille, pour les mettre en suspension (Figure 46).

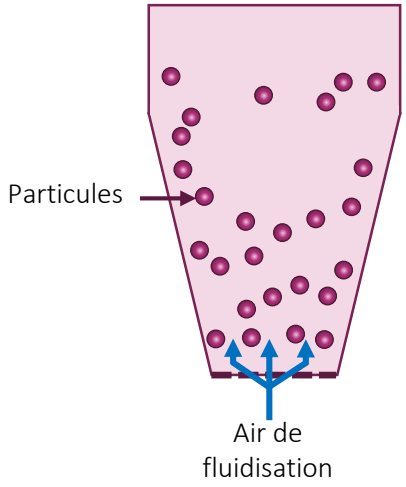


Figure 46 : Principe de la fluidisation

Pour un lit de particules donné, l'état de suspension change en fonction de la vitesse de fluidisation. À de très faibles vitesses de gaz, les particules sont immobiles, aucune fluidisation ne se produit. À la vitesse minimale de fluidisation, les particules bougent légèrement et se mettent en suspension. La suspension est homogène et aucune bulle n'apparaît (Figure 47).

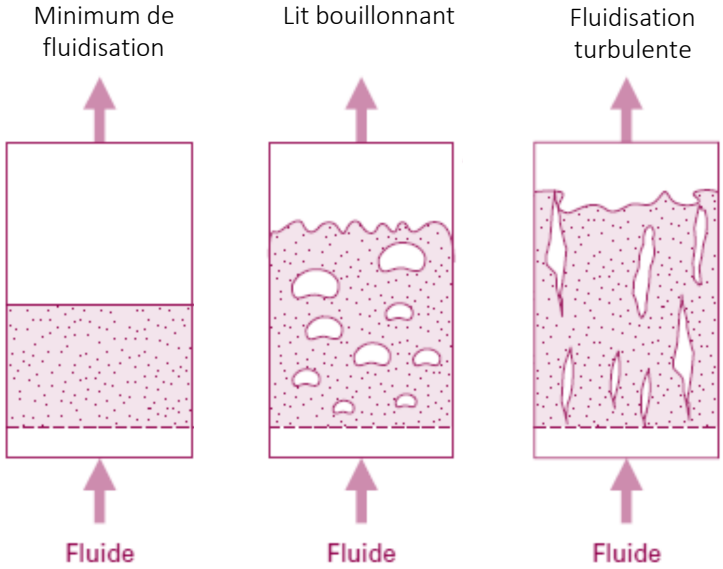


Figure 47 : Différents régimes de fluidisation, d'après Shakourzadeh (2002)

À une vitesse légèrement supérieure à la vitesse minimale de fluidisation, des bulles apparaissent, il s'agit alors de la vitesse de bullage (Figure 47). Excepté pour les particules de grande taille, cette vitesse peut être confondue avec la vitesse minimale de fluidisation. En pratique

industrielle, on considère que le bullage débute pratiquement au minimum de fluidisation. En augmentant la vitesse de fluidisation, même sur une plage opératoire relativement large, le lit reste fluidisé. Dans ce régime, les bulles ont une forme régulière, souvent sphérique : ce fonctionnement, le plus courant, correspond à une fluidisation bouillonnante. Au fur et à mesure que la vitesse de fluidisation augmente, la taille et le nombre des bulles croissent progressivement. À des vitesses importantes, la forme des bulles devient irrégulière. Cela correspond au régime turbulent de fluidisation (Figure 47). Enfin, lorsque la vitesse terminale de chute libre des particules est dépassée, celles-ci quittent le lit avec le courant gazeux (Shakourzadeh, 2002).

L'application de la fluidisation pour l'enrobage de particules est plus récente et concerne plus particulièrement les domaines pharmaceutique, cosmétique, chimique et alimentaire. Dans le domaine alimentaire, l'enrobage reste surtout limité à des produits à forte valeur ajoutée du fait du coût élevé de production. L'amélioration des performances de cette technologie (lits fluidisés continus par exemple) tend tout de même à la rendre plus abordable. L'enrobage en lit fluidisé consiste à faire passer une phase fluide (généralement de l'air) à travers un lit de particules à enrober, supportées par une grille, dans le but de les maintenir en suspension (El Mafadi et Poncelet, 2007). Parallèlement à cela, le produit d'enrobage est pulvérisé de façon à former une membrane autour des particules. Ce procédé permet donc l'obtention de particules de type réservoir, recouvertes d'une ou plusieurs couches.

Cette couche ne se forme cependant pas après un simple passage par la zone de pulvérisation : un grand nombre de passages successifs sont nécessaires. La formation de la membrane se déroule en plusieurs étapes. Les gouttes entrent tout d'abord en collision avec les particules, par inertie ou interception. La quantité de gouttes captées par chaque particule dépend du mécanisme de collision, du nombre, de la taille et de la vitesse des gouttes par rapport aux particules, ainsi que de l'effet de la turbulence. Après collision, la goutte s'étale à la surface de la particule en prenant la forme d'une calotte hémisphérique. Suite à l'étalement des gouttelettes, ces dernières adhèrent à la surface des particules grâce à la formation de liaisons (mécaniques, thermiques…) à l'interface liquide-solide. La solidification de l'enrobage se fait par séchage dans le cas d'une solution d'enrobage aqueuse ou par refroidissement dans le cas d'un matériau d'enrobage fondu. Au cours des cycles d'enrobage, les gouttes sont réparties aléatoirement sur toute la surface de la particule. La continuité de la couche déposée s'établit par coalescence entre gouttes voisines et superposition de l'enrobage déposé à chaque cycle (El Mafadi et Poncelet, 2007) (Figure 48).

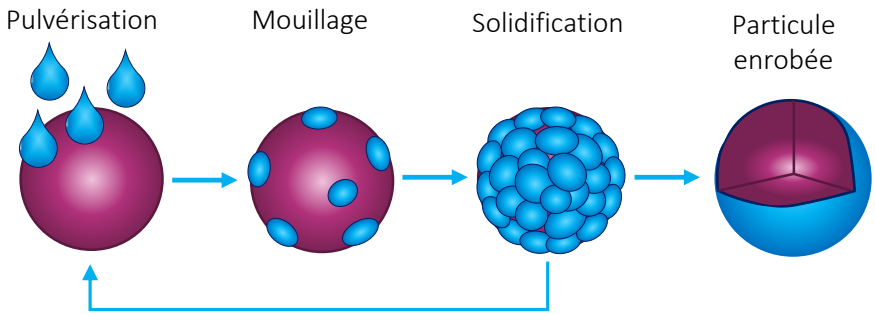


Figure 48 : Formation d'un enrobage

L'enrobage en lit fluidisé peut être appliqué à l'aide de différentes techniques discontinues se différenciant principalement par la position de la buse de pulvérisation. La technique d'enrobage avec pulvérisation par le haut (top spray) (Figure 49) a été développée à partir du sécheur conventionnel en lit fluidisé.

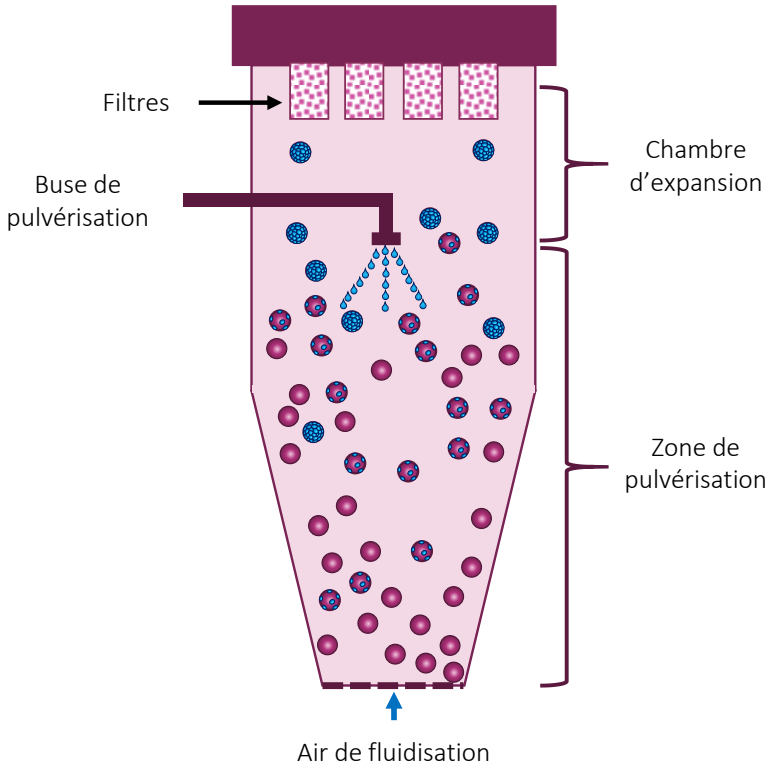


Figure 49 : Principe de l'enrobage en lit fluidisé « top spray »

Les particules à enrober sont placées dans une cuve conique ou cylindrique et sont retenues par une grille au fond de la cuve. L'air traversant la grille de distribution fluidise les particules. En parallèle, le matériau d'enrobage est pulvérisé à contre-courant par la buse placée à l'extrémité supérieure de la chambre d'enrobage. Les particules entrent alors en contact avec les gouttelettes dans la zone de pulvérisation puis atteignent la chambre d'expansion (au-delà de la buse de pulvérisation) au niveau de laquelle le surplus de solvant est évaporé par l'air chaud. Les particules

retombent puis subissent un nouveau cycle d'enrobage. Cette technique permet l'enrobage de particules d'un diamètre allant de 100 µm à environ 2 mm. Elle présente l'avantage de recourir à des cuves de grande capacité et de permettre un accès aisé aux buses. Cependant, cette configuration ne permet pas le contrôle de la distance que les gouttelettes parcourent avant d'entrer en contact avec les particules (Jones, 1988). Ainsi, du fait de l'évaporation prématurée des gouttelettes d'enrobage, des imperfections peuvent avoir lieu. Les gouttelettes séchées avant contact avec les particules sont collectées par le système de filtration situé à l'extrémité haute du lit fluidisé. La qualité de l'enrobage obtenu n'est pas adaptée à la libération contrôlée de la particule enrobée mais suffisante pour masquer des goûts ou changer l'aspect de la poudre (texture, couleur) (El Mafadi et Poncelet, 2007).

La pulvérisation tangentielle a été développée pour produire des granulés plus sphériques et plus denses (Figure 50).

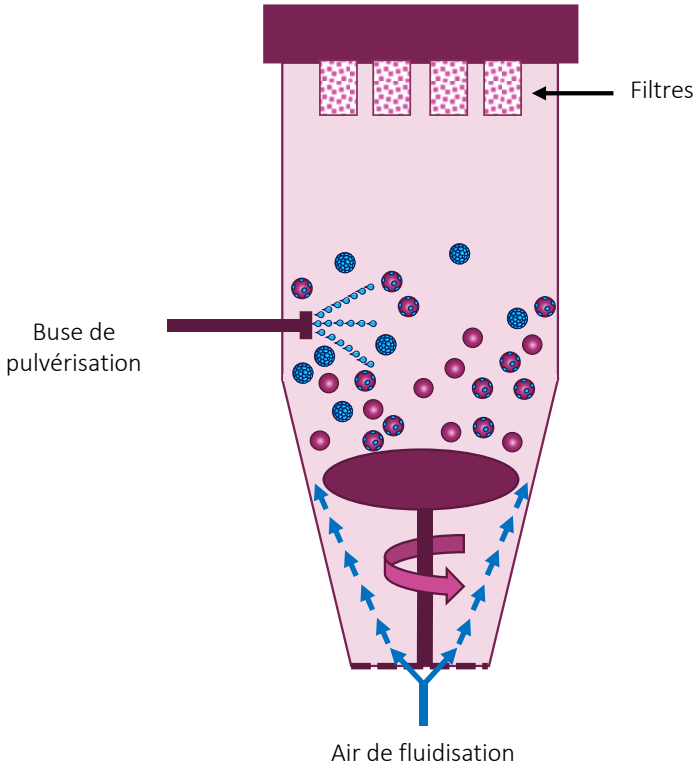


Figure 50 : Principe de l'enrobage « tangential spray »

Le rotor consiste en un disque plein tournant sur un axe à l'intérieur de la cuve. Ce disque est ajustable en hauteur, ce qui permet de créer un espace à sa périphérie permettant le passage de l'air. Les particules, du fait de la force centrifuge induite par le disque, ainsi que de la gravité, décrivent une trajectoire hélicoïdale. Parallèlement à cela, une buse pulvérise de fines gouttelettes du matériau d'enrobage tangentiellement au mouvement des particules. Contrairement à la

technique « top spray », cette technique permet la production de particules pouvant présenter une libération contrôlée. Cependant, du fait du stress infligé aux particules, ces dernières ne doivent pas être friables (El Mafadi et Poncelet, 2007).

La pulvérisation par le bas (bottom spray) se déroule à co-courant des particules (Figure 51). Ce procédé est amélioré par ajout d'un cylindre (tube de Würster) au centre de la chambre de pulvérisation, ainsi que d'un courant gazeux auxiliaire.

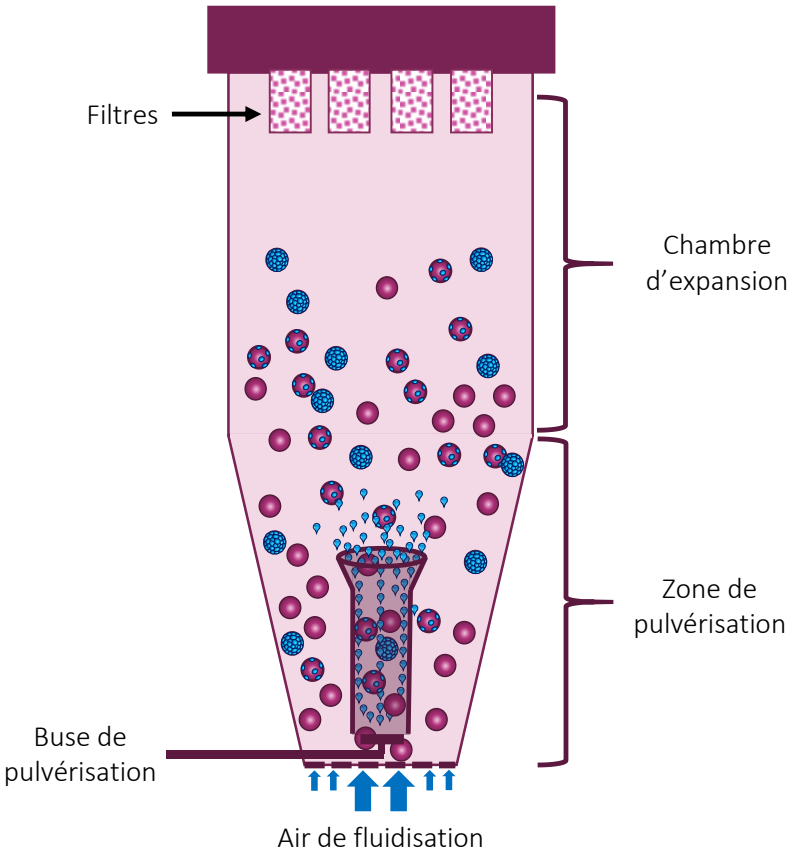


Figure 51 : Principe de l'enrobage « bottom spray »

La buse de pulvérisation est située à l'extrémité inférieure de la chambre de séchage et pulvérise de fines gouttelettes du bas vers le haut à travers le tube Würster. La plaque du fond de cuve distribue un débit d'air plus important au centre qu'à la périphérie. Cela entraine les particules vers le haut de la chambre à travers le tube. Celles-ci rejoignent ensuite la chambre d'expansion où le solvant est évaporé. Elles retombent ensuite dans le fond de la cuve (à l'extérieur du tube), pour former un lit fluidisé et sont à nouveau entrainées à travers le tube pour un nouveau cycle d'enrobage (El Mafadi et Poncelet, 2007). Ce procédé est le plus adapté pour l'enrobage de particules individuelles : le mouvement ascendant des particules, couplé à la direction de pulvérisation, permet un séchage rapide et une réduction des risques d'agglomération et d'attrition

(Frey, 2014). Cette configuration permet aussi de réduire le risque de séchage des gouttes avant leur dépôt sur les particules.

3.1.3.3. Choix du procédé

Appliqués à notre problématique, l'encapsulation par enrobage en lit fluidisé et par pulvérisation présentent tous deux des avantages et des inconvénients (Figure 52).

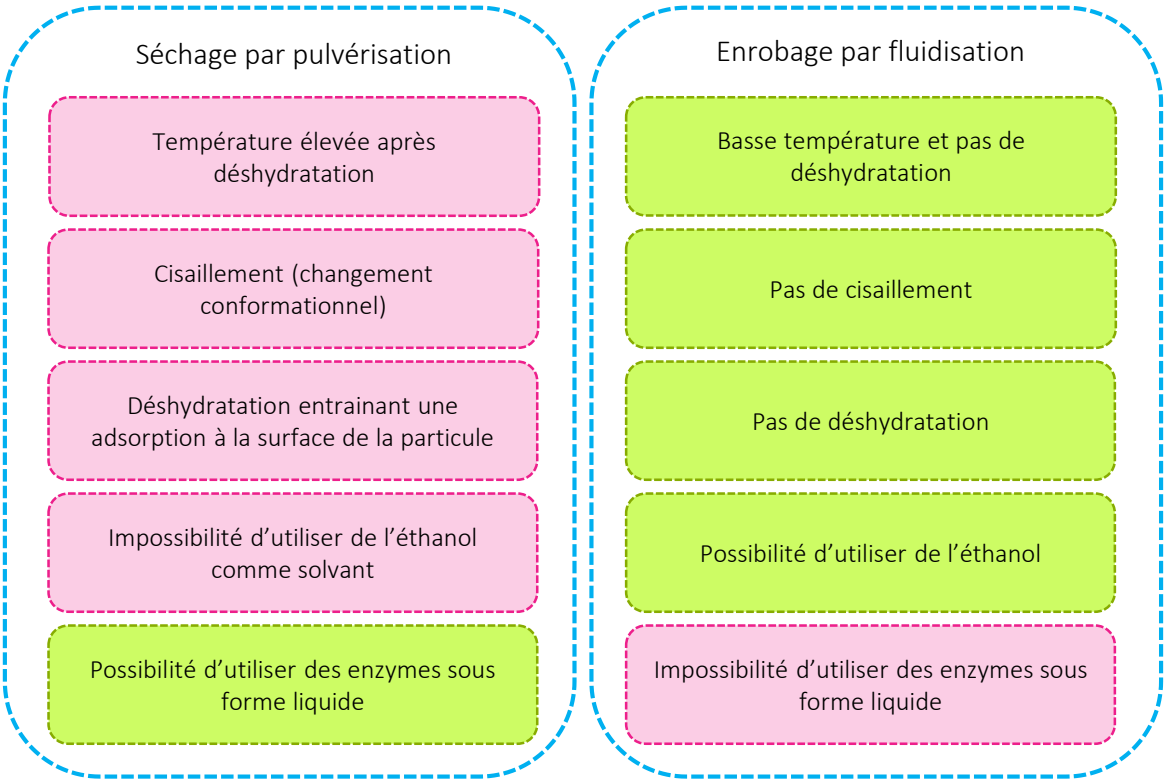


Figure 52 : Comparaison des avantages et inconvénients des deux méthodes d'encapsulation utilisables à l'échelle industrielle

Le principal avantage du séchage par pulvérisation réside dans la possibilité d'utiliser des molécules d'intérêt sous forme liquide. Cela présente notamment un avantage pour la protection des β-galactosidases issues de la souche *Kluyveromyces Lactis*, qui sont quasiment exclusivement commercialisées sous cette forme. Mais la composition de ces préparations enzymatiques rend presque impossible leur séchage par pulvérisation : pour leur conservation, elles sont composées à plus de 50 % de glycérol. Or, du fait de sa viscosité et de sa température d'ébullition élevée (290 °C), le glycérol est un composé inadapté au séchage par pulvérisation (Simmons et Agrawal, 2012). Pour limiter la proportion de glycérol, la dilution de la préparation enzymatique à l'aide de la matrice d'encapsulation aurait pu être possible, mais la poudre obtenue aurait alors présenté une activité beaucoup trop faible. La protection de l'enzyme KL nécessite donc la sélection d'une préparation enzymatique sous forme pulvérulente ou sous forme liquide exempte de glycérol. Mais le séchage

par pulvérisation présente tout de même un certain nombre d'inconvénients pour l'encapsulation d'enzymes. Bien que la température de la particule n'atteigne pas la température d'entrée de la tour, les forces de cisaillement appliquées lors de la pulvérisation, couplées à la déshydratation de la particule, tendent tout de même à altérer leur structure secondaire. À l'inverse, l'enrobage en lit fluidisé ne présente pas autant de facteurs pouvant altérer la structure secondaire de l'enzyme à encapsuler : la température d'air utilisée est relativement basse (généralement comprise entre 40 et 60 °C pour des applications alimentaires), l'enzyme est déjà sous forme déshydratée et aucun cisaillement n'est appliqué. Un autre avantage de l'encapsulation en lit fluidisé réside dans la possibilité d'utiliser des solutions d'enrobage solubilisées dans l'éthanol et non dans l'eau. Cela présente un réel avantage pour la formulation de matrices donc l'objectif est d'être insoluble dans l'eau : des molécules insolubles dans l'eau mais solubles dans l'éthanol peuvent alors être sélectionnées. Dans le même temps, l'utilisation d'éthanol permet de réduire encore la température du lit et donc de préserver l'activité enzymatique. Idéalement, l'encapsulation des enzymes KL et AO serait donc réalisée en lit fluidisé.

3.1.4. Les matrices utilisables dans le domaine alimentaire

Les matrices d'encapsulation utilisables dans le domaine alimentaire sont relativement nombreuses et présentent par conséquent des propriétés très variées. Globalement, elles peuvent être regroupées en trois grandes catégories : les glucides, les protéines et les lipides. Ce paragraphe se propose donc de lister les matrices les plus couramment utilisées dans le domaine de l'encapsulation en précisant leur nature, leurs propriétés et leurs applications les plus significatives. Cela permettra finalement d'orienter le choix quant aux matrices les plus adaptées à notre application. Pour rappel, l'objectif final est de développer une première matrice qui permettrait de protéger l'enzyme AO du traitement thermique en four à micro-ondes et une seconde matrice qui protègerait l'enzyme KL du même traitement thermique, mais aussi du passage gastrique. Respectivement, ces deux enzymes devront donc être libérées dans l'estomac et dans l'intestin grêle.

3.1.4.1. Les glucides

Parmi les glucides, les gommes, ainsi que la cellulose, l'amidon et leurs dérivés respectifs sont particulièrement utilisés dans le domaine de l'encapsulation à visée alimentaire.

3.1.4.1.1. La cellulose et ses dérivés

La cellulose, constituant majeur de la plupart des plantes, est probablement la substance organique naturelle la plus abondante. Il s'agit d'une chaîne polymérique linéaire constituée d'unités d'anhydroglucose reliées entre elles par des liaisons β (1-4) (Murray, 2009) (Figure 53).

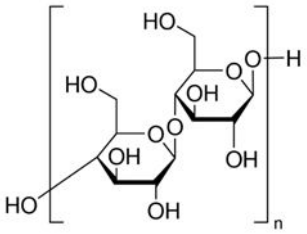


Figure 53 : Structure de la cellulose

La cellulose, malgré son important niveau d'hydroxylation, est insoluble dans l'eau et les solvants classiques. Ses applications dans le domaine alimentaire restent par conséquent limitées. Mais ses groupements hydroxyles peuvent être partiellement ou complètement modifiés par certains réactifs : cela permet la formation de dérivés présentant des propriétés intéressantes. Les propriétés de la cellulose modifiée dépendent notamment du type de substituant, de sa distribution le long du squelette carboné ou encore de son poids moléculaire. Les éthers de cellulose sont les dérivés cellulosiques les plus utilisés pour des applications alimentaires, pharmaceutiques et d'encapsulation (Mishra, 2015). Dans les états membres de l'Union européenne, l'utilisation de ces dérivés est règlementée par la directive 95/2/EC, qui concerne les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants (Murray, 2009). Les dérivés autorisés comme agents d'enrobage sont les suivants :

- E461 : Méthyl-cellulose
- E462 : Éthyl-cellulose
- E463 : Hydroxypropyl-cellulose
- E464 : Hydroxypropyl-méthyl-cellulose
- E466 : Carboxyméthyl-cellulose sodique

La méthyl-cellulose (MC) est un éther de cellulose mono méthyl-substitué (Figure 54). Lorsque son degré de substitution est supérieur à 1,4, la MC est soluble à froid et présente, en milieu aqueux, un comportement de gélification thermique réversible : au-dessus de la température de gélification (environ 50 °C), un gel élastique solide est formé du fait d'associations hydrophobes au sein du polymère. La résistance thermique de ce gel dépend fortement de la distribution des substituts. La MC, bon agent filmogène, est notamment utilisée dans le domaine

de l'encapsulation pour stabiliser les émulsions contenant des huiles (Davidov-Pardo *et al.*, 2008 ; Kolanowski *et al.*, 2004 ; Wu et Xiao, 2005).

L'hydroxypropyl-méthyl-cellulose (HPMC) est un éther de cellulose présentant des substitutions hydroxypropylées et méthylées sur l'unité d'anhydroglucose (Figure 54). Ses propriétés sont proches de celles de la MC, mais les gels formés par l'HPMC sont moins résistants et plus souples. En jouant sur le ratio entre les substituts méthyles et hydroxypropyles, il est notamment possible d'influencer la solubilité de l'HPMC. Dans le domaine de l'encapsulation, l'HPMC est principalement utilisé pour ses propriétés stabilisatrices et la libération lente de certaines molécules d'intérêt (Katona *et al.*, 2010 ; Liang *et al.*, 2004 ; Solomon, 2013 ; Song *et al.*, 2005).

L'hydroxypropyl-cellulose est un éther de cellulose non ionique présentant des substitutions hydroxypropylées (Figure 54). Il est soluble dans l'eau froide et l'éthanol, et possède de bonnes propriétés filmogènes : les films obtenus sont flexibles, brillants et non collants. Il est compatible avec la plupart des gommes et résines solubles dans l'eau, et notamment la gomme de guar, l'alginate, la gomme de caroube ou encore les caséinates de sodium (Mishra, 2015). Il est pour l'heure très peu utilisé en industrie alimentaire (Murray, 2009) tout comme dans le domaine de l'encapsulation (Wallick, 2014).

L'éthyl-cellulose (EC) est un éther de cellulose présentant des substitutions éthylées (Figure 54). Il est plus hydrophobe que la MC et sa solubilité dépend de son degré de substitution. Pour un degré de substitution compris 0,7 et 1,7, l'EC est soluble dans l'eau, alors que pour un degré de substitution supérieur, l'EC est soluble dans les solvants organiques mais insoluble dans l'eau. Les produits commerciaux présentent généralement un degré de substitution supérieur à 2,2, ce qui leur permet d'avoir une excellente solubilité organique. Globalement, l'EC présente une excellente thermoplasticité et permet ainsi la formation de films d'une grande qualité. Le point de ramollissement dépend du type d'EC, mais il est généralement compris entre 135 et 160 °C. L'EC est notamment utilisé pour encapsuler différentes molécules sensibles au pH gastrique (acide folique, polyphénols, vitamine D2…) grâce à différentes techniques (évaporation de solvant, atomisation…). Les matrices ainsi obtenues permettent de protéger très efficacement la molécule d'intérêt à des pH proches du pH gastrique (entre 1 et 6), mais la libère au niveau intestinal de façon très lente (jusqu'à 12 h) et seulement partiellement (Prasertmanakit *et al.*, 2009 ; Zheng *et al.*, 2011 ; Shi et Tan, 2002).

Enfin, la carboxyméthyl-cellulose sodique (NaCMC) (Figure 54), aussi plus couramment appelée gomme cellulosique, est soluble dans l'eau chaude et froide. Elle est physiologiquement inerte et acalorique (Wandrey *et al.*, 2010). Elle est notamment utilisée comme liant dans la confection de capsules hautement chargées et leur confèrerait dans le même temps une résistance thermique (Wallick, 2014). La NaCMC est aussi utilisé pour l'encapsulation d'antioxydants tels que l'α-tocophérol ou l'acide ascorbique (Pierucci *et al.*, 2006, 2007).

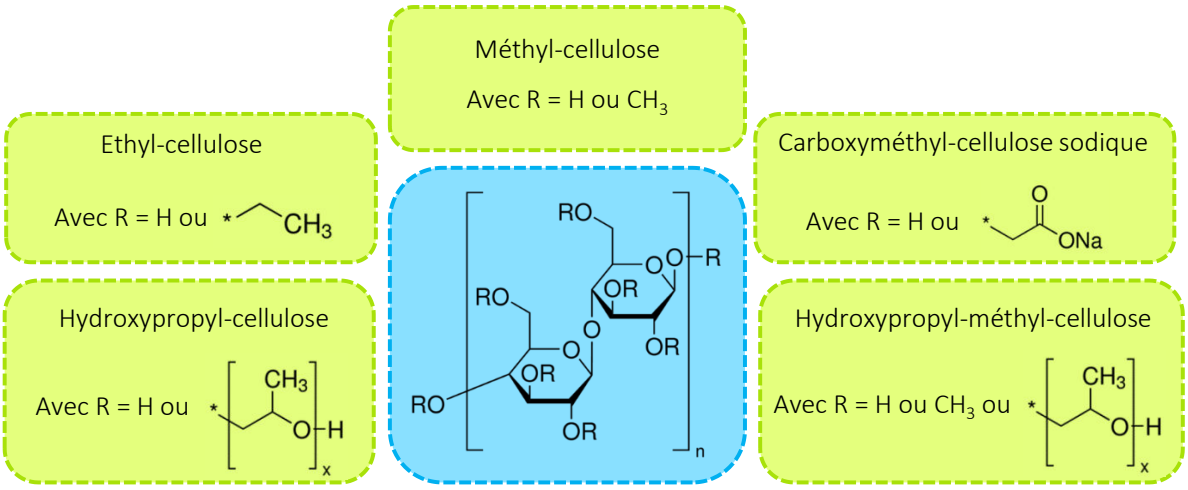


Figure 54 : Structure des différents dérivés de la cellulose

3.1.4.1.2. L'amidon et ses dérivés

L'amidon, réservoir énergétique de la plupart des végétaux, est le polysaccharide le plus abondant dans la nature après la cellulose. Il s'agit d'un polymère d'α-D-glucose composé de deux fractions : l'amylose et l'amylopectine (Figure 55). L'amylose est une molécule linéaire, dont les résidus de glucose sont reliés par des liaisons α (1-4), tandis que l'amylopectine est une molécule ramifiée comportant des liaisons α (1-4) et α (1-6).

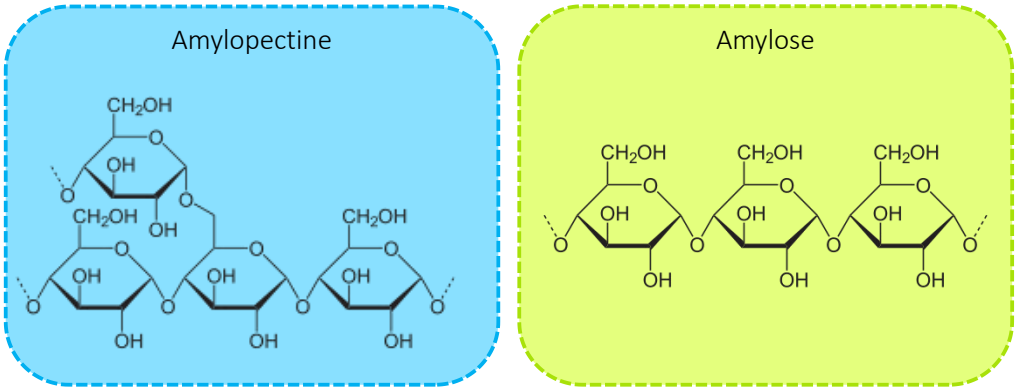


Figure 55 : Structure de l'amylose et de l'amylopectine

L'amidon se présente généralement sous la forme d'une poudre blanche, dépourvue de couleur et d'odeur, insoluble dans l'eau, dans l'éthanol et dans la plupart des solvants courants.

Lorsqu'une suspension d'amidon est chauffée en présence d'un excès d'eau, l'amylopectine perd sa double structure hélicoïdale, entrainant le gonflement des granules. L'amidon est employé dans le domaine alimentaire pour des applications d'encapsulation visant notamment à protéger des arômes, des huiles essentielles ou des polyphénols durant leur stockage (Ades *et al.*, 2012 ; Glenn *et al.*, 2010 ; Robert *et al.*, 2012). Mais, du fait de son insolubilité dans l'eau et la plupart des solvants, l'amidon est principalement utilisé sous des formes modifiées. Il peut en effet être modifié par voie chimique (hydrolyse acide), biochimique (hydrolyse enzymatique) et physique. Cela permet l'obtention de dérivés fonctionnels réticulés, oxydés, acétylés, hydroxypropylés ou encore partiellement hydrolysés (Mishra, 2015).

Les amidons hydrolysés sont largement utilisés dans le domaine de l'encapsulation. Les maltodextrines (Figure 56) sont des polysaccharides obtenus par hydrolyse acide ou enzymatique partielle de l'amidon. Elles sont caractérisées par leur dextrose équivalent (DE), qui correspond au degré d'hydrolyse de l'amidon (plus le DE est élevé, plus l'hydrolyse est importante). Il s'agit d'une poudre blanche, hygroscopique généralement insipide ou légèrement sucrée et aisément digestible (Mishra, 2015). Ces hydrolysats sont peu coûteux, solubles dans l'eau et présentent de faibles viscosités. Ils sont particulièrement utilisés pour l'encapsulation de molécules lipophiles telles que les arômes, certaines enzymes et huiles. Excepté pour l'encapsulation de molécules hydrophiles, ces hydrolysats doivent être couplés à d'autres substances du fait de leur faible capacité émulsifiante. Ils peuvent être utilisés avec de la gomme de guar, des protéines solubles dans l'eau ou d'autres composés. Les poudres obtenues ont tendance à former des solides amorphes permettant la protection des molécules d'intérêt contre l'évaporation ou l'oxydation. En revanche, elles ont tendance à s'agglomérer (Forssell, 2004). Ainsi, les maltodextrines sont largement utilisées pour l'encapsulation de composés aromatiques (Madene *et al.*, 2006). La rétention des arômes est d'ailleurs en partie liée à leur DE (Bangs et Reineccius, 1982 ; Yoshii *et al.*, 2001) et à leur poids moléculaire (Wang et Wang, 2000 ; White Jr. *et al.*, 2003).

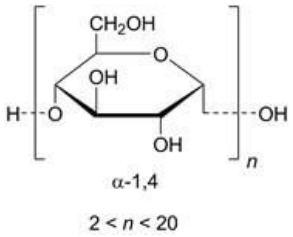


Figure 56 : Structure des maltodextrines

Des dérivés d'amidon ont été développés pour être utilisés seuls, sans addition d'émulsifiants ou d'autres substances nécessaires lors du recours aux maltodextrines. En Europe,

le seul dérivé autorisé présentant des propriétés émulsifiantes est l'octényle succinate d'amidon sodique. Il est obtenu par greffage d'un groupement lipophile au squelette de l'amidon. Les préparations commerciales consistent soit en des succinates d'amidon purs, soit à un mélange entre les succinates et du sirop de glucose. Ces dérivés, présentant une bonne solubilité dans l'eau froide et une faible viscosité, sont largement utilisés pour la microencapsulation d'arômes, de lipides et de vitamines et peuvent aussi être utilisés en association avec la gomme arabique ou des protéines telles que la gélatine et la caséine. Ainsi, ils sont largement utilisés pour la protection de composés hydrophobes tels que les huiles essentielles (Baranauskienė *et al.*, 2007 ; Paramita *et al.*, 2012), les huiles de poisson (Drusch *et al.*, 2006 ; Serfert *et al.*, 2010) et les huiles de fruits (Murúa-Pagola *et al.*, 2009 ; Partanen *et al.*, 2002, 2005 ; Tuomasjukka *et al.*, 2006).

Les cyclodextrines sont des dérivés d'amidon spécifiques : il s'agit de molécules cycliques composées de molécules de D-glucose, obtenues par modification enzymatique de l'amidon (Figure 57). Ces molécules présentent une cavité interne hydrophobe dans laquelle un certain nombre de substances peuvent être solubilisées. Les β-cyclodextrines sont composées de 7 unités de glucose, et sont les seules à être autorisées pour la formulation de produits alimentaires. Elles permettent notamment de protéger les substances lipophiles sensibles à l'oxygène (López-Nicolás, Núñez-Delicado, *et al.*, 2007 ; López-Nicolás, Pérez-López, *et al.*, 2007a, 2007b ; López-Nicolás et García-Carmona, 2007), à la lumière ou à la chaleur (Jouquand *et al.*, 2004 ; Pagington, 1986 ; Qi et Hedges, 1995), de solubiliser les colorants alimentaires et les vitamines, de stabiliser les parfums, les arômes, les vitamines et les huiles essentielles contre des changements non désirés, ou encore de supprimer des odeurs ou des saveurs indésirables (Shaw *et al.*, 1984 ; Singh *et al.*, 2002). Contrairement à celles formées par les hydrolysats d'amidon, les poudres obtenues à partir de cyclodextrines ne sont pas hygroscopiques et sont très stables thermiquement. Mais elles ne permettent la rétention que d'une faible quantité de substances d'intérêt, et ces dernières doivent être assez petites pour se loger à l'intérieur des molécules de cyclodextrines.

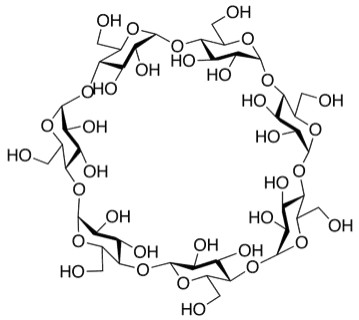
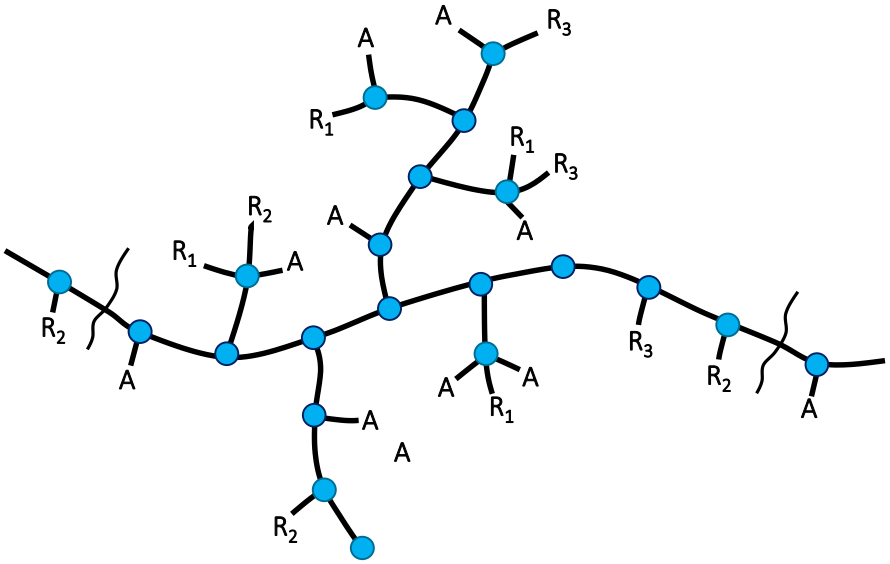


Figure 57 : Structure des cyclodextrines

3.1.4.1.3. Les gommes et hydrocolloïdes

La gomme arabique, aussi connue sous le nom de gomme acacia, est un exsudat de plantes issues de la famille des *acacias*. Elle est composée à 88 % d'arabinogalactane (responsable des propriétés filmogènes de la gomme) et à environ 11 % de protéines (responsables de ses propriétés émulsifiantes). Sa composition varie tout de même en fonction de la source, du climat et d'autres facteurs. Ainsi, sa composition chimique exacte, ainsi que sa structure moléculaire restent incertaines. Sa structure probable est tout de même présentée en Figure 58.



Galactose — R_1 Rhamnose-acide glucuronique — R_3 Arabinose 3-arabinose

A Arabinose — R_2 Galactose 3-arabinose

Figure 58 : Organisation possible des composants glucidiques de la gomme arabique, adapté de Williams et Phillips (2009)

Elle présente une très bonne solubilité aqueuse et se dissout dans l'eau chaude et froide à des concentrations supérieures à 50 % (Mishra, 2015). La gomme arabique est particulièrement adaptée à l'encapsulation par atomisation étant donné qu'elle permet la formulation d'émulsions stables, tout en maintenant une viscosité suffisamment faible pour passer facilement à travers la pompe et la buse de la tour et en formant des films après séchage. La gomme arabique est largement utilisée pour la protection et la conservation des huiles et des composés aromatiques additionnés aux produits alimentaires (Bertolini *et al.*, 2001 ; Bhandari *et al.*, 1992 ; Buffo et Reineccius, 2000 ; Chang *et al.*, 2006 ; Kanakdande *et al.*, 2007 ; Kaushik et Roos, 2007 ; Kim et Morr, 1996 ; Krishnan *et al.*, 2005 ; Sankarikutty *et al.*, 1988 ; Shiga *et al.*, 2001 ; Williams et Phillips, 2009 ; Yoshii *et al.*, 2001). Elle est aussi efficace pour stabiliser et protéger les bactéries probiotiques

durant leur séchage, leur stockage et/ou leur passage gastro-intestinal (Desmond *et al.*, 2002 ; Lian *et al.*, 2002). La gomme arabique n'est en effet pas digérée par les enzymes gastro-intestinales (Phillips, 1998) et procure un effet protecteur mécanique au niveau de l'estomac, ce qui permettrait aux bactéries d'atteindre le côlon (Desmond *et al.*, 2002). La gomme arabique permettrait aussi d'améliorer la résistance de certaines enzymes au traitement thermique tout en les libérant dans le milieu de façon lente et prolongée (Ramakrishnan *et al.*, 2007).

La pectine est généralement isolée des écorces d'agrumes et des coproduits de l'industrie du jus de pomme et des huiles essentielles d'agrumes (Wandrey *et al.*, 2010). Il s'agit d'un polyoside anionique linéaire constitué majoritairement d'unités d'α-D-galacturonique reliées par des liaisons α (1-4). Des molécules de L-rhamnose (1 à 4 %) sont parfois introduites dans la chaîne en α (1-2) et produisent des irrégularités. Le degré de méthoxylation et d'amidation des résidus d'acide glucuronique permettent de caractériser et de classer les pectines (Rolin, 1993). Les plus courantes sont peu méthoxylées, très méthoxylées ou amidées (Figure 59).

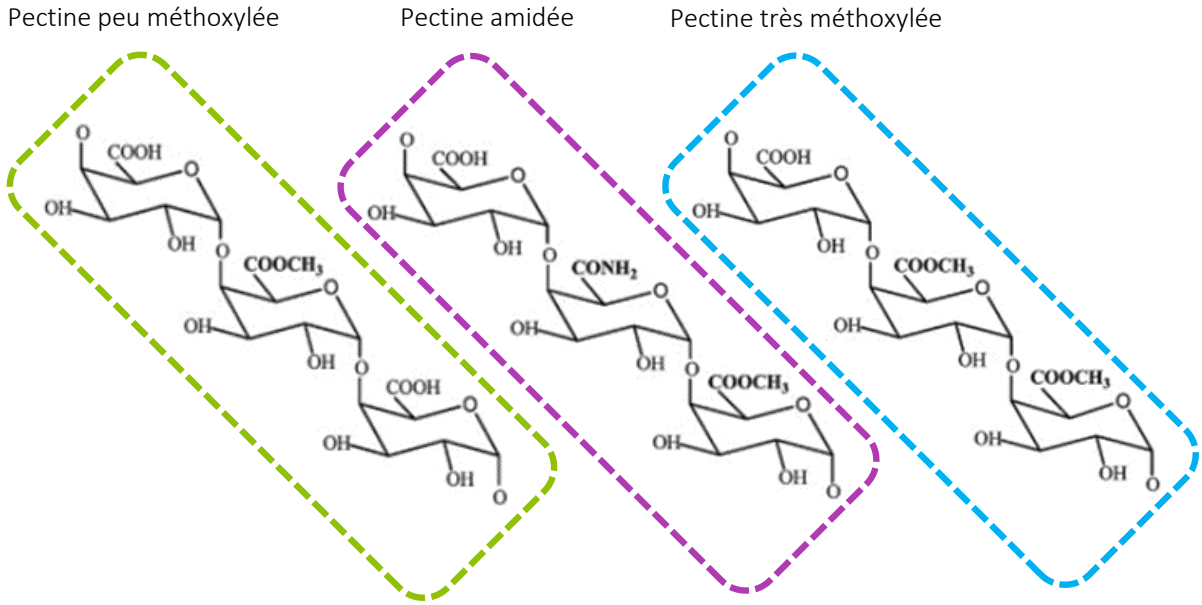


Figure 59 : Structure des différents types de pectine, adapté de Nguyen *et al.* (2011)

Plusieurs glucides neutres tels le galactose, le glucose, le rhamnose, l'arabinose et le xylose participent à sa structure par la formation de chaînes latérales. Les pectines sont insolubles dans la plupart des solvants organiques mais sont solubles dans l'eau jusqu'à 12 % selon leur type. Les solutions aqueuses de pectine sont moins visqueuses que celles obtenues avec d'autres gommes (Wandrey *et al.*, 2010). En microencapsulation, elle est souvent utilisée en présence d'autres matériaux (gélatine, protéines de soja, chitosane, alginate…) et permet principalement de véhiculer des molécules d'intérêt jusqu'au niveau du côlon. La pectine est en effet résistante au passage gastro-intestinal et dégradée par les bactéries coliques (Kosaraju, 2005).

L'alginate est un polymère retrouvé dans les parois cellulaires des algues brunes et les cellules bactériennes. Bien qu'il puisse être utilisé tel quel, il est souvent utilisé, pour des raisons de stabilité, sous forme d'un de ses sels (alginate de sodium principalement). L'alginate est composé de 2 monomères, l'acide α-L-guluronique (bloc G) et l'acide β-D-mannuronique (bloc M), formant des chaînes linéaires (Figure 60) (Brownlee *et al.*, 2009).

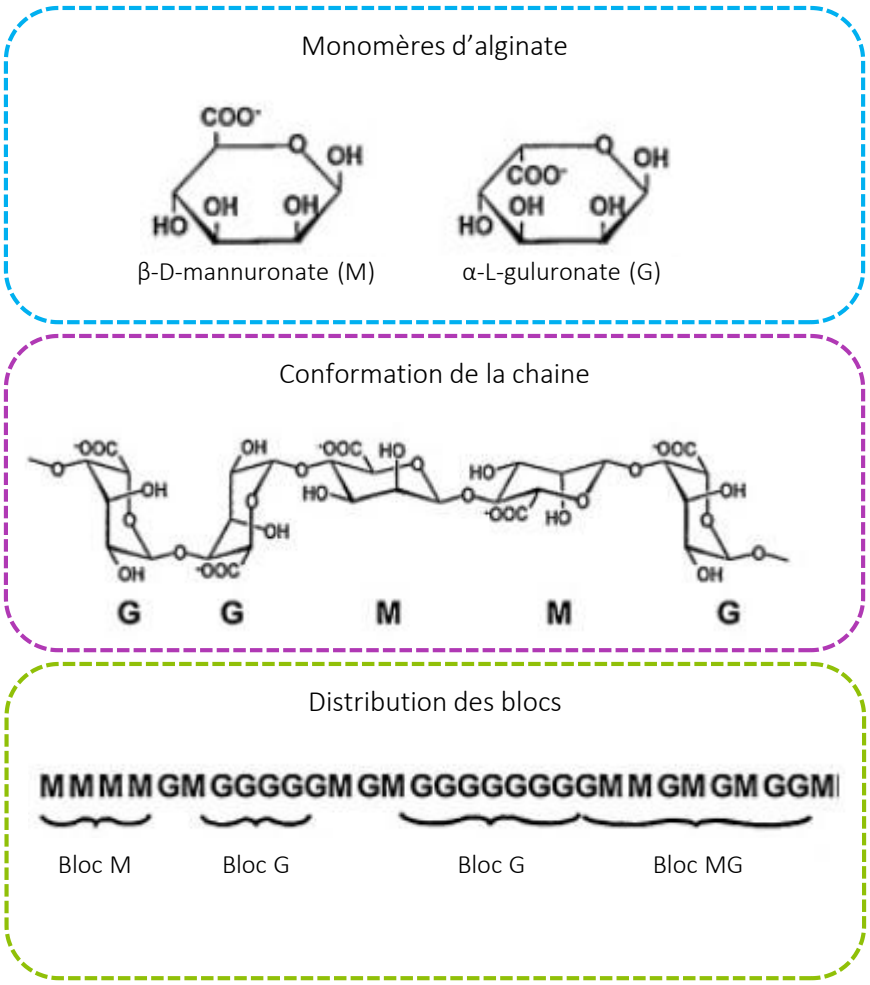


Figure 60 : Structure de l'alginate de sodium, adapté de Tavassoli-Kafrani *et al.* (2016)

Il est principalement connu pour ses capacités gélifiantes : en présence de cations di- ou trivalents, des liens s'établissent entre les blocs d'acide guluronique de différentes chaînes, créant ainsi un réseau (Prasad et Kadokawa, 2009). Ainsi, les alginates contenant un rapport acide guluronique/manuronique important sont les plus adaptés. Du fait de sa capacité à gélifier ioniquement (donc sans traitement thermique), l'alginate est un matériau intéressant pour l'encapsulation de molécules thermosensibles (Draget, 2009). Mais les gels d'alginate étant poreux, l'encapsulation de petites molécules, contrairement à l'encapsulation de bactéries et d'enzymes, n'est pas adaptée (Brownlee *et al.*, 2009). L'alginate est d'ailleurs largement utilisé pour améliorer la stabilité des bactéries durant les procédés de fermentation, le stockage et les conditions

gastro-intestinales (Annan *et al.*, 2008 ; Brinques et Ayub, 2011 ; Chandramouli *et al.*, 2004 ; Chávarri *et al.*, 2010 ; Gbassi *et al.*, 2009 ; Homayouni *et al.*, 2008 ; Jankowski *et al.*, 1997 ; Krasaekoopt *et al.*, 2004 ; Mandal *et al.*, 2006 ; Ortakci *et al.*, 2012 ; Sultana *et al.*, 2000). Les enzymes peuvent aussi être encapsulées dans des matrices à base d'alginate. L'une des principales applications est l'ajout de ces enzymes dans le fromage pour une libération lente et contrôlée durant l'affinage (Azarnia *et al.*, 2010, 2011). Aussi, le procédé traditionnel permettant de former les matrices à base d'alginate (l'extrusion) présente tout de même deux inconvénients majeurs : il est très difficilement extrapolable à l'échelle industrielle et ne permet pas le contrôle de certains paramètres (dont la taille des particules) (Burnside, 2014). Un procédé utilisable à l'échelle industrielle a récemment été développé (Bhandari, 2008) : il consiste à pulvériser l'alginate de sodium et le chlorure de calcium à travers 2 aérosols de façon à ce qu'ils entrent en contact et gélifient. Ce procédé permet aussi d'obtenir des matrices de petite taille (entre 10 et 40 µm), en deçà du seuil de détection sensorielle.

Les algues rouges renferment des polysaccharides naturels remplissant les vides de la structure de la cellulose de la plante. Les carraghénanes en font partie (Figure 61).

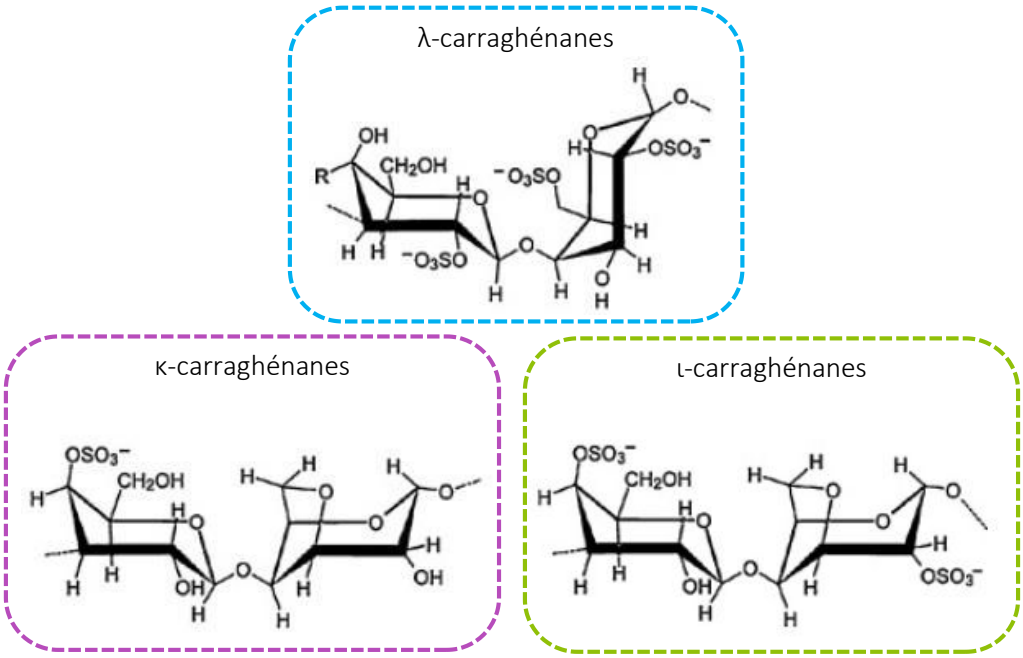


Figure 61 : Structure des différents types de carraghénanes, adapté de Abad *et al.* (2009)

Les carraghénanes sont principalement utilisés pour améliorer la viabilité de bactéries probiotiques dans des matrices laitières (yaourt et fromage notamment) durant leur stockage (Adhikari *et al.*, 2000, 2003 ; Dinakar et Mistry, 1994) mais les gels formés sont fragiles et résistent difficilement aux contraintes (Chen et Chen, 2007).

La gomme xanthane est un polysaccharide extracellulaire sécrété par la souche *Xanthomonas camprestris*. Il s'agit d'un polyélectrolyte anionique de haut poids moléculaire se présentant sous forme de sels mixtes de sodium, potassium et calcium (Mishra, 2015). Il se compose d'un squelette de résidus de glucose reliés entre eux par des liaisons β (1-4), ainsi que des chaînes latérales composées de mannose et d'acide glucuronique (Figure 62).

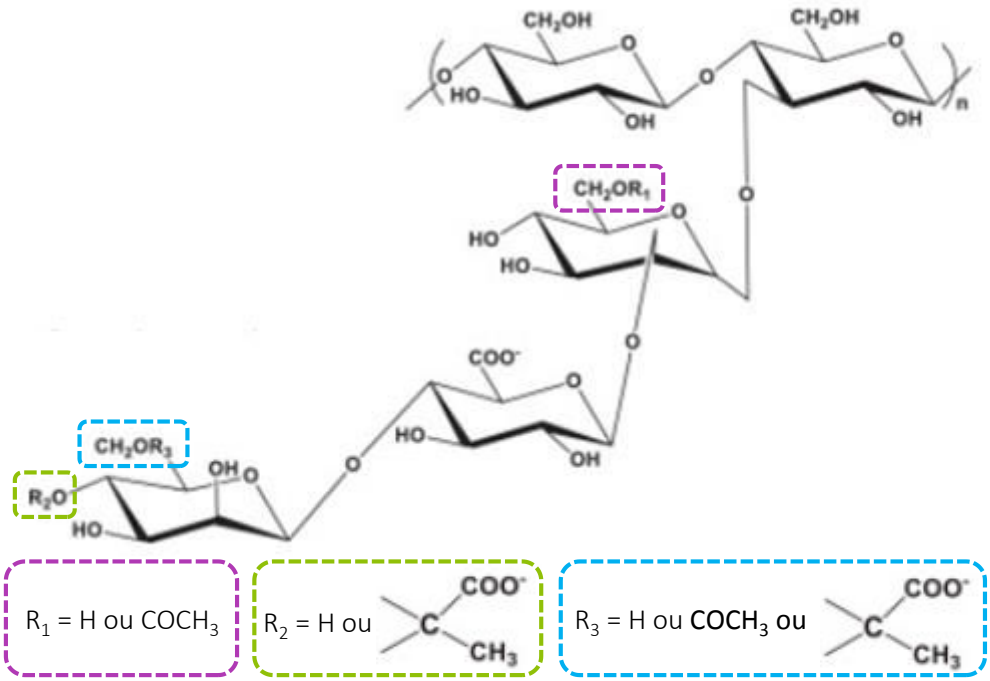


Figure 62 : Structure du xanthane, adapté de Kool *et al.* (2014)

La gomme xanthane est soluble à froid, présente une viscosité très stable sur une large gamme de pH et de température et elle est résistante aux dégradations enzymatiques. Elle présente une interaction synergique avec d'autres matériaux d'encapsulation (galactomannane notamment) (Sworn, 2009). Cette gomme est principalement utilisée pour encapsuler des bactéries probiotiques et les protéger durant le stockage, et surtout durant le passage gastro-intestinal (Ding et Shah, 2009 ; McMaster et Kokott, 2005 ; Nazzaro *et al.*, 2009 ; Papagianni et Anastasiadou, 2009 ; Sun et Griffiths, 2000).

La gomme laque (ou shellac) est une résine naturelle et biodégradable, synthétisée par un insecte (*Kerria lacca*) (Specht *et al.*, 1999). Chimiquement, la gomme laque est un mélange de polyesters constitués d'acides serquiterpéniques (dont le principal est l'acide jalarique) estérifiés avec des acides gras hydroxylés (le principal étant l'acide aleuritique). La résine est composée de deux fractions : une fraction constituée d'esters simples d'acides serquiterpéniques et d'acides gras hydroxylés et une seconde constituée d'esters simples polymérisés par des liaisons esters (Figure 63).

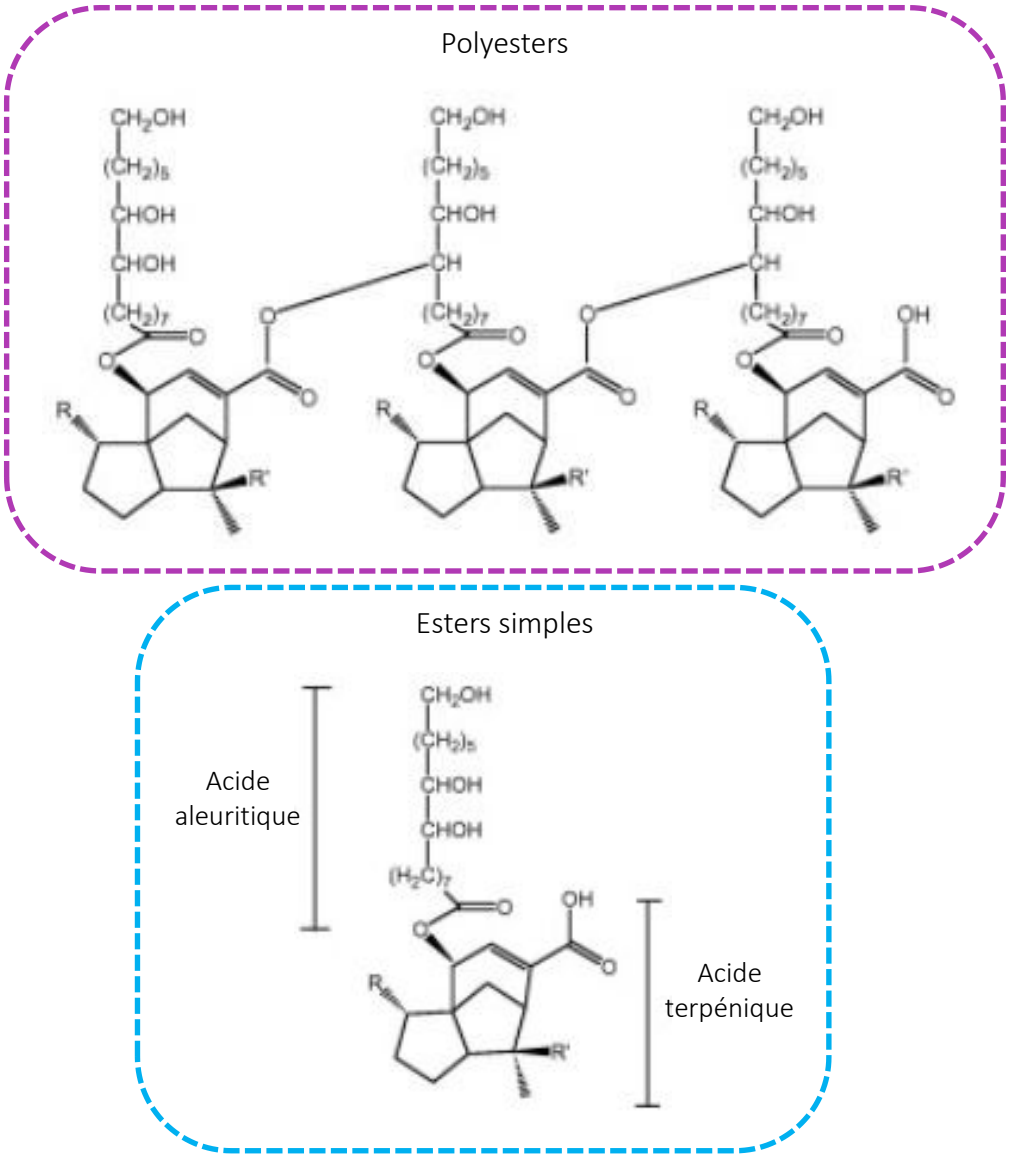


Figure 63 : Structure chimique de la gomme laque, adapté de Limmatvapirat *et al.* (2008)

Elle est insoluble dans l'eau à pH acide mais soluble à pH basique (Gardner et Whitmore, 1929). Cela en fait une substance intéressante pour des enrobages entériques. D'ailleurs, depuis peu, elle présente un intérêt grandissant dans les domaines nutraceutiques et des compléments alimentaires (Krause et Müller, 2001). Elle est utilisée depuis de très nombreuses années dans le domaine pharmaceutique, mais son utilisation décline. La gomme laque est en effet peu soluble au pH intestinal et présente une moins bonne stabilité que certains polymères entériques synthétiques ou semi-synthétiques (polyacrylates notamment) (Limmatvapirat *et al.*, 2004). Cette observation est d'autant plus valable pour les substances encapsulées hydrophobes. Cependant, certains moyens permettant d'améliorer les propriétés de la gomme laque comme agent entérique ont tout de même été développés (Limmatvapirat *et al.*, 2004).

3.1.4.2. Les protéines

3.1.4.2.1. Les protéines d'origine animale

Le lait bovin est un mélange complexe qui contient environ 3,5 % (en masse) de protéines. Ces protéines sont traditionnellement classées en deux catégories selon leur solubilité. Les caséines (environ 80 % de l'azote total du lait) précipitent à un pH proche de 4,6 (point isoélectrique de la caséine). Il s'agit de protéines non globulaires, présentes dans le lait sous forme de gros agrégats (micelles de caséine). Les propriétés des caséines diffèrent de celles de la plupart des protéines. Elles sont hydrophobes, très chargées et possèdent de nombreux résidus de proline et quelques résidus de cystéine. Elles ne sont formées que de courtes hélices α et possèdent une structure tertiaire restreinte. La dénaturation des caséines est ainsi très limitée (des températures inférieures à 100 °C ne provoquent aucune insolubilité de la caséine). De nombreux groupements hydrophobes sont exposés, de sorte que les molécules forment facilement des liaisons hydrophobes. Les caséines s'associent ainsi largement entre elles. Dans le lait, les caséines sont présentes sous forme d'associations colloïdales grandes et plutôt sphériques, ayant une taille de 30 à 600 nm : ce sont les micelles. Les micelles contiennent aussi du phosphate de calcium, du magnésium, du sodium, du potassium et des ions citrates. La caséine est un mélange de plusieurs types de protéines : α-S1, α-S2, β et κ. La plupart des molécules de κ-caséines sont glycosylées à divers degrés, une partie de la caséine β est clivée par des enzymes protéolytiques en γ-caséine et protéose peptone. Les caséines α-S et β sont des phosphoprotéines qui précipitent en présence d'ions Ca^{2+}, sauf en présence de caséines κ. La caséine est difficilement dénaturée : elle ne devient insoluble qu'à des températures supérieures à 120 °C par modifications chimiques.

La plupart des protéines sériques sont des protéines globulaires : elles sont relativement hydrophobes, possèdent des chaînes peptidiques compactes pliées, riches en hélices α et en feuillets β et deviennent insolubles par traitement thermique à un pH inférieur à 6,5. L'α-lactalbumine possède un site de liaison pour les ions calcium, qui permettent de stabiliser sa conformation. L'élimination du calcium ou l'abaissement du pH à environ 4 (qui engendre la perte des ions calcium) provoque le dépliage partiel de la protéine, qui devient sujette à une dénaturation irréversible à des températures relativement basses. La β-lactoglobuline est la protéine sérique majoritaire et le plus thermosensible. Face aux traitements thermiques, elle présente donc une précipitation et une agrégation plus rapide et plus importante. Sa solubilité dépend fortement du pH et de la force ionique mais elle ne précipite pas lors de l'acidification du lait. La structure secondaire et tertiaire de la β-lactoglobuline sont bien connues : elle possède deux ponts disulfures

et un groupe thiol libre. Le changement de pH et/ou de température modifie ses structures tertiaire et quaternaire. Elle se présente sous forme de monomère, de dimère ou d'octamère. La β-lactoglobuline tend à lier certaines molécules hydrophobes (vitamine A par exemple). L'albumine de sérum bovin est une protéine mineure, possédant 3 domaines globulaires, 14 ponts disulfures et un groupement thiol. Les immunoglobulines sont des anticorps synthétisés en réponse à la stimulation exercée par des antigènes. Il s'agit de grandes glycoprotéines de composition hétérogène (O'Regan *et al.*, 2009 ; Walstra *et al.*, 2006).

Les caséines et les protéines sériques peuvent être utilisées pour des applications de microencapsulation isolées ou en mélange, sous leur forme native ou modifiée. La plupart des procédés d'encapsulation sont utilisables pour former des matrices à base de protéines laitières (atomisation, lyophilisation, enrobage, extrusion, complexation, coacervation…). Elles présentent d'intéressantes propriétés pour l'encapsulation : solubilité dans l'eau, faible viscosité, propriétés émulsifiantes, filmogènes et gélifiantes. Ces protéines permettent ainsi de stabiliser les systèmes d'encapsulation par émulsification et de former une matrice qui supporte et protège le composé d'intérêt lors du séchage de l'émulsion par atomisation. Elles sont notamment utilisées pour protéger des composés hydrophobes contre l'oxydation (Jimenez *et al.*, 2004, 2006 ; Kim et Morr, 1996 ; López-Rubio et Lagaron, 2012 ; Moreau et Rosenberg, 1996 ; Partanen *et al.*, 2008) et améliorer la rétention de certaines molécules d'intérêt durant le séchage par pulvérisation (Baranauskienė *et al.*, 2006 ; Bayram *et al.*, 2008 ; Brückner *et al.*, 2007). Les protéines laitières sont aussi beaucoup utilisées pour l'encapsulation de bactéries probiotiques. Elles permettent notamment d'accroître leur viabilité durant le stockage dans des produits, mais aussi d'assurer leur survie dans les conditions gastriques (Fritzen-Freire *et al.*, 2013 ; Maciel *et al.*, 2014 ; Pinto *et al.*, 2015 ; Rajam *et al.*, 2012). Certaines matrices laitières permettraient même d'accroître la résistance thermique des bactéries (Fritzen-Freire *et al.*, 2013 ; Pinto *et al.*, 2015). L'utilisation de protéines sériques pour encapsuler une immunoglobuline et la protéger du passage gastrique et du traitement thermique a aussi été mise en évidence (Cho *et al.*, 2005).

La gélatine est un mélange de protéines obtenu par hydrolyse partielle du collagène issu de la peau, des tissus conjonctifs et des os (Figure 64) (Haug et Draget, 2011).

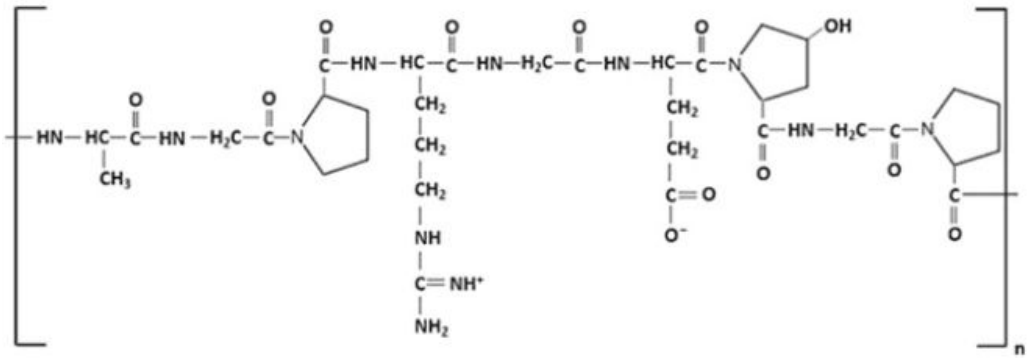


Figure 64 : Structure de la gélatine, d'après Zaman et Beg (2015)

Elle est insoluble dans l'eau froide mais gonfle à des températures supérieures à 40 °C et se dissout en formant une solution colloïdale. Lorsque la température diminue, les molécules de gélatine reprennent en partie la structure en triple hélice du collagène et certaines réticulations sont formées. Cette propriété permet l'utilisation de la gélatine comme matériau d'encapsulation (Meng et Cloutier, 2014). En général, elle est utilisée avec d'autres matériaux d'encapsulation (sucrose, mannitol, maltodextrines, gomme arabique…) pour la stabilisation de molécules hydrophobes (β-carotène, huile de thon, curcumine, huile de lin, lycopène, huiles essentielles…), notamment durant leur stockage (Fustier *et al.*, 2015 ; Gómez-Estaca *et al.*, 2015 ; Lam *et al.*, 2014 ; Silva *et al.*, 2012 ; Spada *et al.*, 2012 ; Sutaphanit et Chitprasert, 2014 ; Wang *et al.*, 2014)

3.1.4.2.2. Les protéines d'origine végétale

Le soja contient entre 35 et 40 % de protéines : 10 % sont des albumines (solubles dans l'eau) et environ 90 % sont des globulines (Fukushima, 2011). Le soja est notamment utilisé en industrie alimentaire pour sa valeur nutritionnelle, ainsi que ses propriétés fonctionnelles. Pour l'encapsulation, il est utilisé pour ses capacités émulsifiante, gélifiante, filmogène et de barrière (Meng et Cloutier, 2014). Mais son caractère allergène et son arrière-goût (herbeux, amer et astringent) en limitent l'utilisation (Okubo *et al.*, 1992). Le séchage par pulvérisation, la coacervation et la gélification sont les principales techniques utilisées pour l'encapsulation de molécules d'intérêt dans des matrices d'isolat de protéines de soja. Ces encapsulations permettent principalement de masquer l'arrière-goût de certaines molécules d'intérêt (Ortiz *et al.*, 2009), de protéger des arômes durant leur séchage ou encore de les stabiliser durant le stockage (Charve et Reineccius, 2009 ; Kim et Morr, 1996).

La zéine est la principale protéine de stockage du maïs et représente 50 % du total des protéines. Elle fait partie de la classe des prolamines qui sont des protéines insolubles dans l'eau mais solubles dans les solutions alcooliques aqueuses. Elles contiennent une part importante

d'acides aminés hydrophobes non polaires (Duodu *et al.*, 2003). Globalement, la zéine est riche en leucine, alanine, proline, phénylalanine et glutamine et présente une structure secondaire riche en hélices α. Elle présente d'autres caractéristiques intéressantes (résistance thermique élevée, faible absorption d'humidité, capacité barrière à l'oxygène et aux arômes). Malgré son insolubilité dans l'eau, la zéine est utilisée dans le domaine de l'encapsulation pour son caractère hydrophobe. Elle est notamment utilisée pour véhiculer des composés antimicrobiens dans des boissons et permettre leur libération prolongée (Zhong et Jin, 2009). La stabilisation d'arômes reste la principale application de la zéine (Parris *et al.*, 2005 ; Quispe-Condori *et al.*, 2011).

Le pois est une légumineuse riche en protéines (entre 20 et 30 %) qui se présentent principalement (65 à 80 %) sous forme de globulines. Les protéines de pois sont de plus en plus utilisées en industrie alimentaire dans la formulation de nouveaux produits du fait de leur caractère non allergène, leur importante valeur nutritionnelle et leurs propriétés fonctionnelles intéressantes (Gharsallaoui *et al.*, 2009). Du fait de la sensibilité des protéines de pois aux facteurs environnementaux tels que le pH ou la force ionique, elles sont généralement utilisées avec un autre émulsifiant/stabilisant (Gharsallaoui *et al.*, 2010). Elles permettent, tout comme les protéines de soja et la zéine, de stabiliser des composés hydrophobes (β-carotène, triglycérides…) durant les procédés de séchage et/ou le stockage (Gharsallaoui *et al.*, 2012). Elles sont aussi utilisées pour la formation d'émulsions qui sont ensuite séchées par atomisation (Ducel *et al.*, 2004 ; Karaca *et al.*, 2011).

3.1.4.3. Les lipides

3.1.4.3.1. Les cires

Les cires sont isolées de produits animaux ou végétaux. La cire d'abeille est sécrétée par les jeunes abeilles pour la construction de leur nid, la cire de carnauba est obtenue à partir de feuilles de palmier, tandis que la cire de candelia est extraite des feuilles de l'arbuste du même nom. Les cires sont des esters d'acides gras composés de triacontyl palmitate (environ 75 %), de triacontyl cerotinate (environ 10 %) et de paraffine (environ 15 %). Elles sont pratiquement insolubles dans l'eau et fondent à des températures proches de 62 - 64 °C (Wandrey *et al.*, 2010). Du fait du faible nombre de groupements polaires, les cires, et notamment celle d'abeille, sont particulièrement efficaces pour bloquer la migration de l'humidité. Elles sont par conséquent couramment utilisées pour l'encapsulation de composants alimentaires solubles (Shahidi et Pegg, 2007 ; Uddin et Hawlader, 2001).

3.1.4.3.2. Les liposomes

Les phospholipides contiennent 2 longues chaînes d'acides gras. Le troisième groupement hydroxyle de la glycérine est modifié par l'acide phosphorique lié à une base telle que l'éthanolamine ou la choline (Wandrey *et al.*, 2010). Le phospholipide le plus abondant est la phosphatidylcholine, aussi plus couramment appelé lécithine (Taylor *et al.*, 2005). Les phospholipides sont présents chez tous les animaux et les plantes, mais pour des applications commerciales, ils sont extraits du jaune d'œuf, de l'huile de colza et de la membrane des globules gras du lait (Wandrey *et al.*, 2010). Du fait de leur caractère amphiphile, les phospholipides jouent un rôle important dans la stabilisation d'émulsions (Weiner, 2002). Lorsqu'ils sont mélangés à l'eau, ils s'agrègent ou s'auto-assemblent en bicouches bien structurées et organisées. L'apport d'énergie durant le processus de mélange permet la formation de liposomes, qui ne se forment en général pas de façon spontanée (Taylor *et al.*, 2005). Les liposomes sont ainsi composés d'un cœur aqueux séparé du milieu extérieur par une ou plusieurs bicouches de phospholipides (Lasic, 1998). Ils ne sont cependant stables que dans un laps de temps donné : ils sont métastables (Reineccius, 1995). Ils permettent l'encapsulation de molécules hydrophiles et hydrophobes. Dans le domaine alimentaire, ils sont de plus en plus utilisés et permettent notamment d'encapsuler certaines enzymes (Kheadr *et al.*, 2003 ; Picon *et al.*, 1994 ; Soda *et al.*, 1989) mais aussi de stabiliser des édulcorants, des arômes ou des vitamines (Kirby *et al.*, 1991 ; Kosaraju *et al.*, 2006).

3.1.4.4. Choix des matrices

Il existe une multitude de composés utilisables pour l'encapsulation et autorisés dans le domaine alimentaire. Les principaux ont été décrits dans les paragraphes précédents. Pour rappel, l'objectif principal de cette étude serait de développer une matrice permettant la protection de la β-galactosidase AO vis-à-vis du traitement thermique en four à micro-ondes et sa libération dans l'estomac (produits de type 3 ou 4). Dans le cas où cet objectif ne puisse être atteint, l'encapsulation de l'enzyme KL serait étudiée. Cela nécessiterait le développement de deux matrices, la première permettrait une protection vis-à-vis du traitement thermique et une libération immédiate (produit 4) après traitement, tandis que la seconde permettrait une protection vis-à-vis du traitement thermique, ainsi que du passage gastrique (produit 3).

D'après l'étude bibliographique réalisée, il n'existerait pas de matrice précise permettant la protection de molécules d'intérêt vis-à-vis du traitement thermique en four à micro-ondes. Mais le mécanisme de chauffage par micro-ondes repose sur le changement d'orientation des molécules

dipolaires (principalement l'eau) qui conduit, à terme, à leur frissonnement (Paragraphe 3.5 du chapitre 1). Ainsi, le développement d'un enrobage rendant l'enzyme insoluble dans l'eau permettrait certainement de limiter sa dénaturation. Pour cela, le composé principal de la matrice doit lui-même être très peu soluble, voire insoluble dans l'eau.

Tableau 17 : Bilan des propriétés des différentes matrices utilisables

	Utilisable par enrobage ?	Peu soluble/insoluble dans l'eau ?	Résistance gastrique ?
MC	+		
HPMC	+		
EC	+	+	+
HPC	+		
NaCMC	+		
Amidon natif	+		
Amidon modifié	+		
Cyclodextrine	+		
Maltodextrine	+		
Gomme arabique	+		+
Pectine	+		+
Carraghénane	+		
Xanthane	+		+
Gomma laque	+	+	+
Alginate			
Protéines laitières	+	+	
Gélatine	+		
Protéines soja	+		
Zéine	+	+	
Protéines pois	+		
Cire			
Liposome			

D'après l'étude bibliographique réalisée, seuls quatre composés sont peu solubles voire insolubles dans l'eau : les caséines, la zéine, l'éthyl-cellulose et la gomme laque (Tableau 17). La zéine, riche en acides aminés non-polaires, est insoluble dans l'eau mais soluble dans l'éthanol. Elle ne présente pas de propriétés de rétention particulières étant donné qu'elle serait hydrolysée par les protéases gastriques. Cela en fait donc une matrice potentielle pour la protection de l'enzyme. Les caséines, du fait de leur hydrophobicité, présentent une réhydratation particulièrement lente en milieu aqueux (plusieurs heures) et sont potentiellement hydrolysées par les protéases gastriques. Elles pourraient par conséquent elles aussi permettre la protection de l'enzyme AO du

traitement thermique en four à micro-ondes et sa libération au niveau gastrique. Comme la zéine, l'éthyl-cellulose est insoluble dans l'eau mais soluble dans l'éthanol. Elle est d'ailleurs utilisée pour protéger certaines molécules d'intérêt du passage gastrique mais leur libération intestinale est très lente et seulement partielle. Elle n'est donc pas le candidat idéal pour la protection de l'une ou l'autre des enzymes étudiées. La gomme laque, insoluble dans l'eau à pH acide mais soluble à pH basique, est en revanche utilisée depuis de nombreuses années dans le domaine pharmaceutique comme enrobage gastro-résistant. Elle présente d'ailleurs un intérêt grandissant dans le domaine nutraceutique et des compléments alimentaires. Ce composé pourrait donc être idéal pour la protection de l'enzyme KL, dans le cas où la matrice développée pour l'enzyme AO ne permette pas de répondre à l'objectif fixé.

3.1.5. Conclusion

Plusieurs techniques (modifications chimiques, sélection d'enzymes issues d'organismes extrêmophiles…) permettent actuellement de stabiliser des enzymes vis-à-vis de conditions environnementales défavorables (température, pH…). Mais seule l'encapsulation est pour l'heure autorisée dans le domaine alimentaire. Les deux principaux procédés d'encapsulation, ainsi que les substances généralement utilisées pour l'encapsulation alimentaires ont par conséquent été considérés. Le séchage par pulvérisation permet l'encapsulation de molécules sous forme liquide mais reste potentiellement dénaturant pour des composés tels que les enzymes (perte de structure secondaire). En outre, les préparations enzymatiques sous forme liquide sont trop riches en glycérol pour être correctement séchées. À l'inverse, le séchage en lit fluidisé n'entraine théoriquement aucune dénaturation des enzymes et permet le recours à des matrices solubilisées dans l'éthanol. D'ailleurs, parmi les nombreux composés pouvant être utilisés dans le domaine alimentaire pour l'encapsulation de molécules d'intérêt, seuls trois ont été retenus. Le premier composé, la zéine, est insoluble dans l'eau et soluble dans l'éthanol. Elle présente aussi une résistance thermique élevée, une faible absorption d'humidité et une capacité barrière à l'oxygène et aux arômes. Cela en fait un composé potentiel pour la protection de l'enzyme AO contre le traitement thermique. La seconde substance sélectionnée, les caséines, présentent une hydrophobicité qui entraine une solubilisation aqueuse très lente. Ainsi, les caséines seront le second matériau utilisé pour protéger l'enzyme AO. Le troisième composé, la gomme laque, présente une solubilité aqueuse à pH acide et une insolubilité à pH basique et permet donc la protection des substances d'intérêt du passage gastrique. La gomme laque pourrait par conséquent être utilisée pour protéger l'enzyme KL, dans le cas où les deux matrices précédentes ne permettent pas l'obtention de résultats concluants.

3.2. Résultats et discussion

Avant enrobage en lit fluidisé, la propension des deux préparations enzymatiques à la fluidisation a tout d'abord été vérifiée. Les résultats étant positifs, plusieurs formulations d'enrobage ont été testées sur l'enzyme AO. L'enrobage a été réalisé à l'échelle laboratoire sur un Mini-Glatt. Les poudres obtenues ont été caractérisées d'un point de vue physico-chimique et l'efficacité de l'enrobage vis-à-vis du traitement thermique a été étudiée. Dans un dernier temps, l'hydrolyse du lactose par la formulation la mieux protégée du traitement thermique a été étudiée en conditions gastro-intestinales.

3.2.1. Étude de la propension des préparations enzymatiques à la fluidisation

Les caractéristiques physiques et physicochimiques des particules affectent leur capacité de fluidisation. La classification de Geldart (1973), basée sur la taille des particules et sur leur écart de masse volumique avec le gaz de fluidisation, permet d'évaluer cette aptitude (Figure 65).

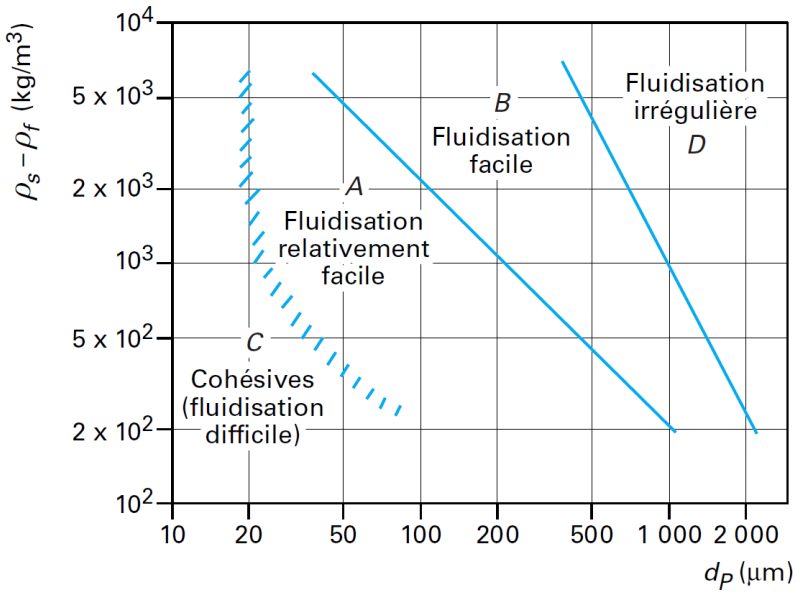


Figure 65 : Classification des particules selon le diagramme de Geldart (1973), d'après Shakourzadeh (2002)

La catégorie C regroupe les particules fines et cohésives dont la fluidisation est difficile. Les particules de la catégorie A sont fines et leur fluidisation est relativement facile. La catégorie B englobe les particules de type sable, qui sont très facilement fluidisées. Enfin, la catégorie D regroupe les particules de diamètre important dont la fluidisation nécessite une vitesse relativement importante.

Dans un premier temps, la taille des particules de l'enzyme AO a par conséquent été étudiée. Les résultats sont donnés en Figure 66.

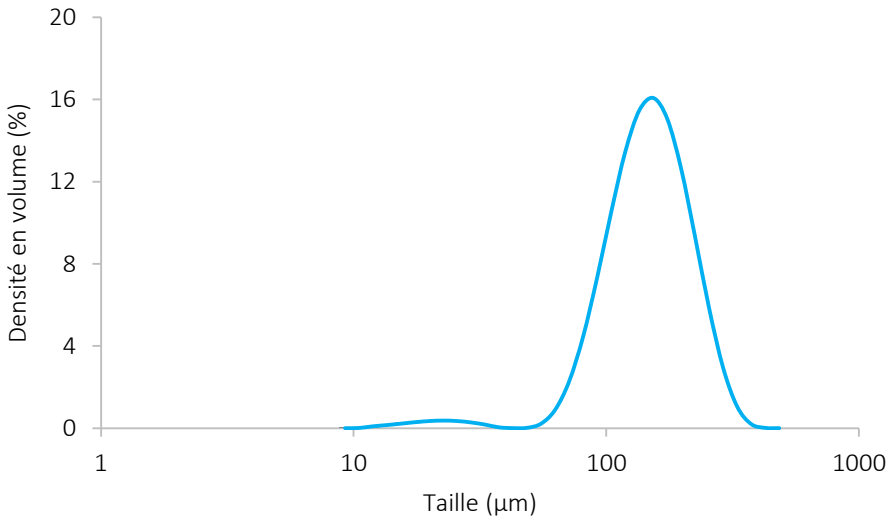


Figure 66 : Répartition de taille (en volume) de l'enzyme AO

D'après la Figure 66, la répartition de taille de la préparation enzymatique étudiée présente une répartition unimodale. Elle présente aussi une granulométrie comprise entre 50 et 400 µm et un diamètre médian de 147 µm. En tenant compte de la classification des particules (Figure 65), il est probable que cette dernière appartienne à la classe A et soit donc relativement facile à fluidiser. Mais si sa masse volumique est faible, il est aussi possible qu'elle appartienne à la classe des poudres cohésives, difficilement fluidisables. Or, la plus faible vitesse de fluidisation du Mini-Glatt étant relativement élevée (environ 100 mm.s^{-1}), il a déjà été mis en évidence que ce dernier n'était pas nécessairement compatible avec l'utilisation de poudres cohésives présentant un diamètre médian compris entre 40 et 70 µm (To et Davé, 2016). La poudre étudiée étant relativement fine et donc potentiellement cohésive, il convient de vérifier sa capacité à être fluidisée dans le « Mini-Glatt ».

L'évolution de la perte de charge à travers le lit peut aisément être reliée à l'évolution de son régime. En effet, à vitesse nulle, la perte de charge est nulle. Lorsque la vitesse de fluidisation est accrue, la perte de charge augmente jusqu'à une valeur maximale correspondant à l'obtention d'un lit bouillonnant. Cette valeur reste constante tant que le lit est sous régime bouillonnant. Ce phénomène est dû au fait que la pression nécessaire au maintien du lit fluidisé en suspension correspond au poids de la suspension par unité de surface du lit. Lorsque la vitesse est encore augmentée (lit transporté) le gradient de pression diminue du fait d'une ségrégation importante dans le système gaz/solide (Shakourzadeh, 2002). Ainsi, l'évolution de la perte de charge à travers le lit de poudre en fonction de la vitesse d'air de fluidisation a été étudiée à l'aide d'un rhéomètre à poudre (Figure 67).

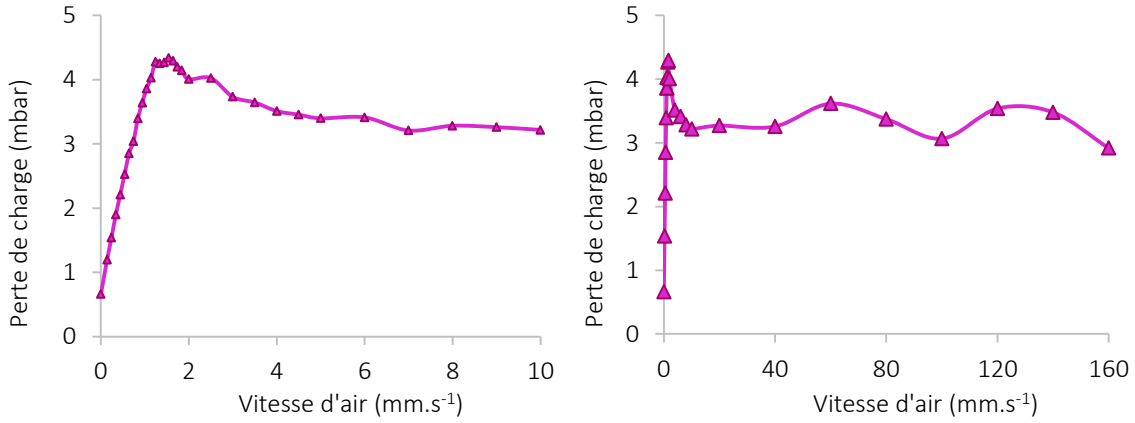


Figure 67 : Paramètres de fluidisation de l'enzyme AO

D'après la Figure 67, la perte de charge à travers le lit de poudre d'enzyme AO augmente rapidement entre 0 et 4 mm.s^{-1}, passant d'environ 0,7 à 4,5 mbar. La valeur de perte non nulle à une vitesse d'air nulle pourrait s'expliquer par un manque de calibration de l'appareil ou un défaut du disperseur d'air. Globalement, la perte de charge reste globalement stable jusqu'à la vitesse maximale d'air du rhéomètre à poudre, à savoir 160 mm.s^{-1}. Ainsi, la vitesse minimale de fluidisation de l'enzyme AO est d'environ de 4 mm.s^{-1}. Pour des vitesses d'air comprises entre le minimum de fluidisation et 160 mm.s^{-1}, le lit reste ainsi dans un régime bouillonnant. **La poudre étudiée semble donc pouvoir être fluidisée à l'aide du Mini-Glatt en le réglant au minimum de sa vitesse d'air de fluidisation (100 mm.s^{-1}).**

3.2.2. Étude des caractéristiques des particules obtenues par enrobage de l'enzyme AO

3.2.2.1. Teneur en eau et activité de l'eau des particules

L'activité de l'eau mesure, de façon globale, les forces de liaison entre l'eau et l'aliment. Elle se définit comme le rapport entre la pression partielle de vapeur d'eau de l'aliment et la pression de vapeur de l'eau pure. Sa valeur est donc comprise entre 0 et 1. Les produits présentant des valeurs inférieures à 0,2 sont considérés comme déshydratés, entre 0,2 et 0,8, des aliments à humidité intermédiaire, tandis que les produits présentant des valeurs supérieures à 0,8 sont des aliments présentant une importante quantité d'eau libre. Ces valeurs ont pu être corrélées aux réactions de dégradation les plus communes dans le domaine alimentaire. Pour les dégradations autres que l'oxydation des lipides, l'eau agit en qualité de réactif ou solvant. Lorsque sa concentration augmente, les dégradations qu'elle occasionne vont croissantes. Ainsi, une activité de l'eau inférieure à 0,7 permet de s'affranchir de tout risque de prolifération bactérienne et une activité inférieure à 0,2 permet quant à elle de limiter grandement les dégradations chimiques

(brunissement non enzymatique, hydrolyse enzymatique et non enzymatique). L'hydrolyse enzymatique est quant à elle quasiment inexistante en deçà d'une activité de l'eau de 0,4.

L'activité de l'eau et la teneur en eau des poudres obtenues après enrobage de l'enzyme AO avec les différentes matrices de protection sont présentées en Tableau 18.

Tableau 18 : Teneur en eau et activité de l'eau des poudres obtenues par enrobage

	Teneur en eau (%)	a_w
Enzyme seule	6,6 ± 0,4	0,48 ± 0,01
CM 20 %	8,2 ± 0,5	0,44 ± 0,01
CM 40 %	10,5 ± 0,4	0,54 ± 0,01
Zéine 20 %	7,8 ± 0,7	0,43 ± 0,01
Zéine 40 %	5,7 ± 0,3	0,33 ± 0,01
Zéine 40 % + glycérol	6,9 ± 0,4	0,31 ± 0,01

D'après le Tableau 18, les poudres obtenues par enrobage à l'aide de CM présentent une teneur en eau et une activité de l'eau particulièrement élevées. C'est d'ailleurs plus particulièrement le cas pour la poudre enrobée à 40 %. Ces dernières pourraient difficilement être intégrées telles quelles dans la formulation sèche. À l'inverse, **les poudres obtenues par enrobage à l'aide de zéine présentent des teneurs en eau et une activité de l'eau plutôt basses. Leur conservation durant le stockage sera donc bien meilleure.** Cela s'explique aisément par le fait que la poudre de zéine soit réhydratée dans de l'éthanol et non de l'eau comme celle de CM.

3.2.2.2. Aspect, taille et forme des particules

L'étude de l'aspect, de la taille et de la forme des particules obtenues vont permettre une première évaluation de l'homogénéité de l'enrobage. Ainsi, elles ont été caractérisées par microscopie électronique à balayage (Figure 68).

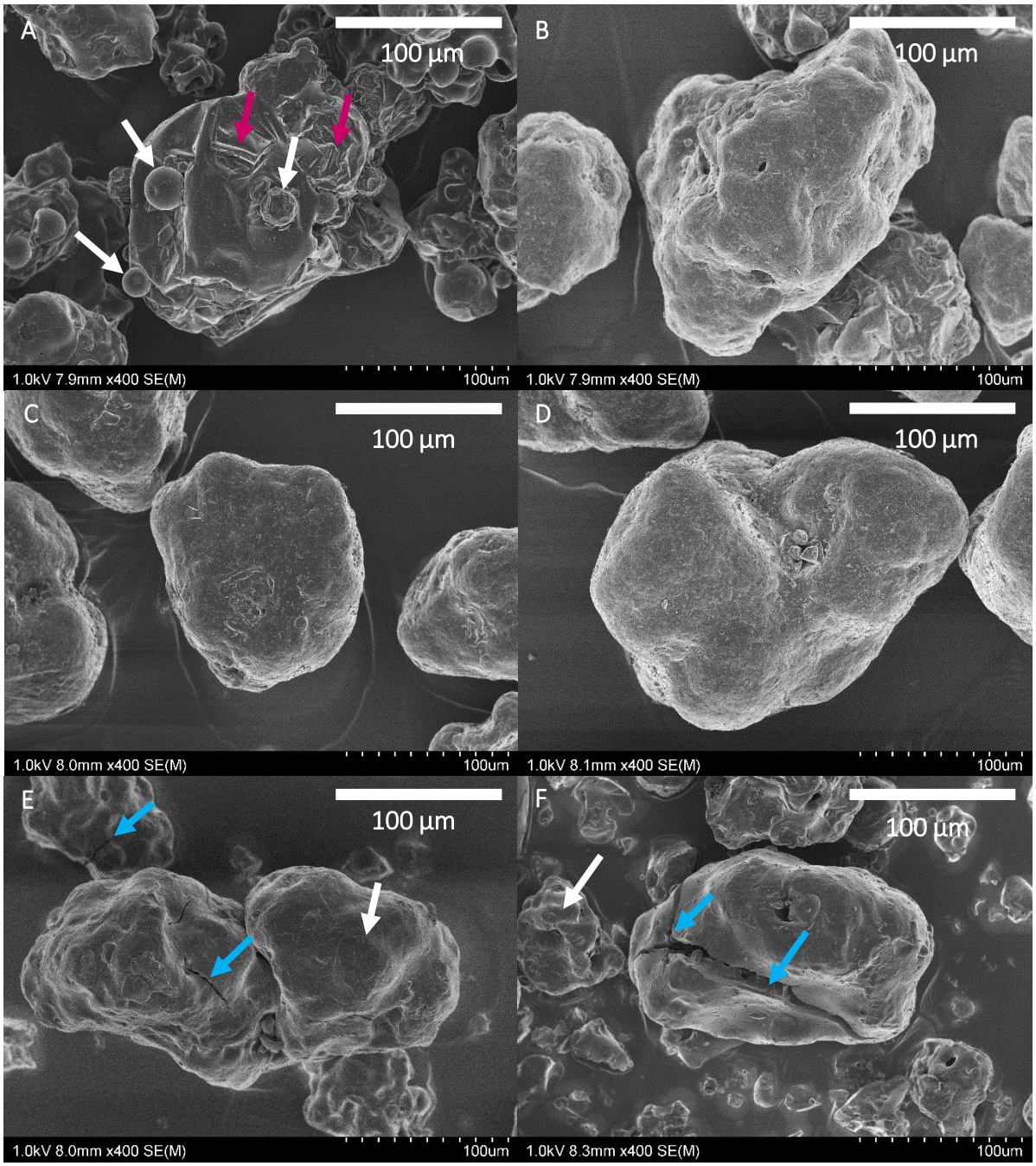


Figure 68 : Photographies de MEB des particules obtenues après enrobage (grossissement x 400)

A : sans enrobage, B : enrobage zéine 20 %, C : enrobage zéine 40 %, D : enrobage zéine 40 % + glycérol, E : enrobage CM 20 %, F : enrobage CM 40 %

D'après la Figure 68, la préparation enzymatique non enrobée (**A**) présente d'importantes irrégularités de surface. Cette dernière est particulièrement ridée (flèches roses) et possède de nombreuses protubérances sphériques (flèches blanches). À l'inverse, les particules enrobées à l'aide de zéine (**B, C et D**) présentent une surface relativement lisse. Les irrégularités de surface observées pour la préparation enzymatique non enrobée, et notamment la présence de protubérances, semblent être masquées et donc recouvertes par l'enrobage. Les particules

enrobées à l'aide de CM (**E et F**) semblent elles aussi plus lisses que les particules de départ mais certaines protubérances sont encore observables (flèches blanches). Elles présentent aussi un certain nombre de craquelures visibles (flèches bleues), potentiellement provoquées par la déshydratation de la solution de CM lors de l'enrobage ou entrainées par le faisceau d'électrons lors de l'analyse. De nombreuses particules de très petite taille (entre 4 et 20 µm) sont aussi observables pour ces deux préparations : une partie de la solution d'enrobage a probablement séché avant d'entrer en contact avec les particules de la préparation enzymatique. Visuellement, les particules enrobées à l'aide de zéine paraissent mieux protégées de l'environnement extérieur que les particules natives ou enrobées à l'aide de CM.

La Figure 69 présente la répartition de taille en volume des particules obtenues par enrobage.

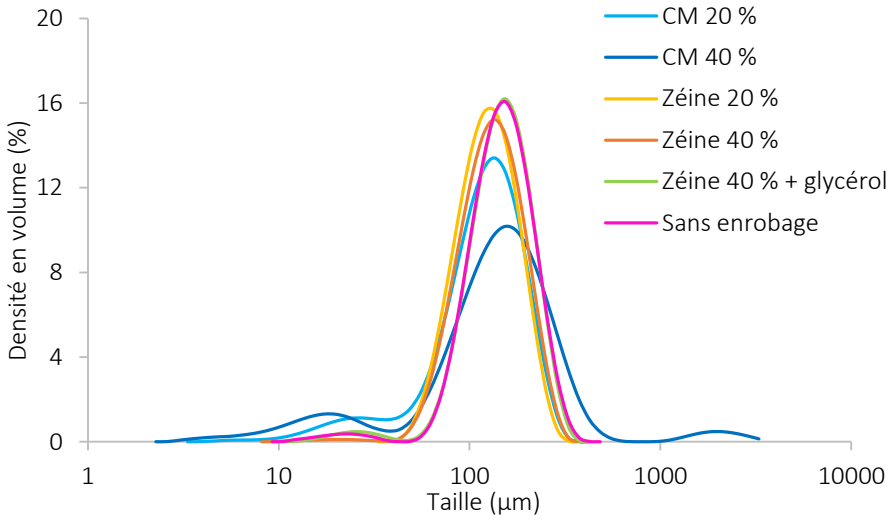


Figure 69 : Distribution granulométrique (en volume) des différentes particules obtenues par enrobage

Pour notre application, cette mesure permet principalement d'évaluer si l'enrobage provoque ou non une agglomération des particules entre elles. En effet, en assimilant grossièrement les particules non enrobées comme étant des sphères d'une densité de 1,25, ayant une valeur de sphéricité de 0,8 avec un diamètre moyen de 125 µm, leur enrobage tel que réalisé dans ce projet (20 et 40 % d'enrobage) entrainerait l'accroissement de leur taille de seulement environ 3 et 6 µm, respectivement. Cet accroissement est donc difficilement décelable lors d'une analyse granulométrique.

D'après la Figure 69, la préparation enzymatique non enrobée présente une granulométrie comprise entre 50 et 400 µm. Certaines particules présentent tout de même des diamètres plus faibles, compris entre 10 et 40 µm. Le diamètre médian des particules est d'environ 147 µm. Les

particules enrobées avec la solution de zéine à 40 % en présence de glycérol présentent exactement la même répartition que la poudre témoin. Ainsi, aucune agrégation des particules n'est observée. Il en est d'ailleurs de même pour les deux autres poudres enrobées avec les solutions de zéine. La poudre enrobée à 20 % à l'aide de CM présente quant à elle une distribution similaire à la préparation non enrobée, mais de nombreuses particules fines d'une taille comprise entre 5 et 10 µm sont observables. Cela corrobore les observations de MEB : ces particules sont probablement issues du séchage de la solution d'enrobage avant son entrée en contact avec les particules à enrober. Il s'agit donc probablement de poudres de CM. Ce phénomène est d'ailleurs encore plus visible avec la poudre enrobée à 40 % avec le CM. Cette dernière présente aussi une forte agrégation, confirmée par la présence de particules de plus de 1000 µm. Ainsi, ces résultats confirment les observations réalisées en MEB : **l'enrobage semble de meilleure qualité pour les particules enrobées à l'aide de la zéine.**

3.2.3. Évaluation de l'efficacité de l'enrobage de l'enzyme AO

3.2.3.1. Activité résiduelle après enrobage

Bien que l'enrobage en lit fluidisé soit un procédé globalement exempt de conditions néfastes à l'activité de l'enzyme (déshydratation, cisaillement, températures élevées…), il convient néanmoins de vérifier son activité après encapsulation (Tableau 19).

Tableau 19 : Activité résiduelle des préparations enzymatiques après enrobage

Matrice d'encapsulation	Activité résiduelle après enrobage (%)
Caséines 20 %	89,8 ± 6,5
Caséines 40 %	109,9 ± 14,6
Zéine 20 %	101,7 ± 4,5
Zéine 40 %	107,1 ± 6,4
Zéine 40 % + glycérol	109,9 ± 14,5

D'après le Tableau 19, les préparations enzymatiques enrobées à l'aide de la matrice caséinique présentent une activité résiduelle assez variable. Respectivement, les préparations enrobées à 20 et 40 % présentent une activité résiduelle d'environ 90 et 110 %. Cette variabilité pourrait s'expliquer par une agrégation des particules qui rendent la poudre obtenue assez hétérogène. Mais, globalement, aucune perte significative d'activité n'est cependant observée. Pour les enzymes enrobées à l'aide des trois matrices de zéine, leur activité se situe entre 101 et

110 %. Une variation d'activité assez importante est aussi observée pour la poudre enrobée à l'aide de zéine et de glycérol. Pourtant, cette dernière semble relativement homogène. Les valeurs d'activité supérieures à 100 % pourraient tout de même s'expliquer par une mauvaise répartition de l'enzyme enrobée. **Dans tous les cas, l'enrobage en lit fluidisé n'entraine aucune perte significative d'activité.**

3.2.3.2. Efficacité de l'enrobage vis-à-vis des traitements thermiques

L'objectif de l'enrobage étant de protéger l'enzyme vis-à-vis du traitement thermique en four à micro-ondes, l'étude menée sur l'activité des enzymes natives (résultats détaillés dans le paragraphe 2.2.4 de ce chapitre) a été déclinée pour chacune des préparations obtenues par enrobage. Néanmoins, aucune différence significative d'activité n'ayant alors été notée dans les différents milieux étudiés (eau, SMUF et lait), l'activité des préparations enrobées sera étudiée seulement dans le milieu le plus simple, à savoir l'eau, et avec la technique la plus rapide, à savoir l'ONPG. Les résultats sont présentés en Figure 70.

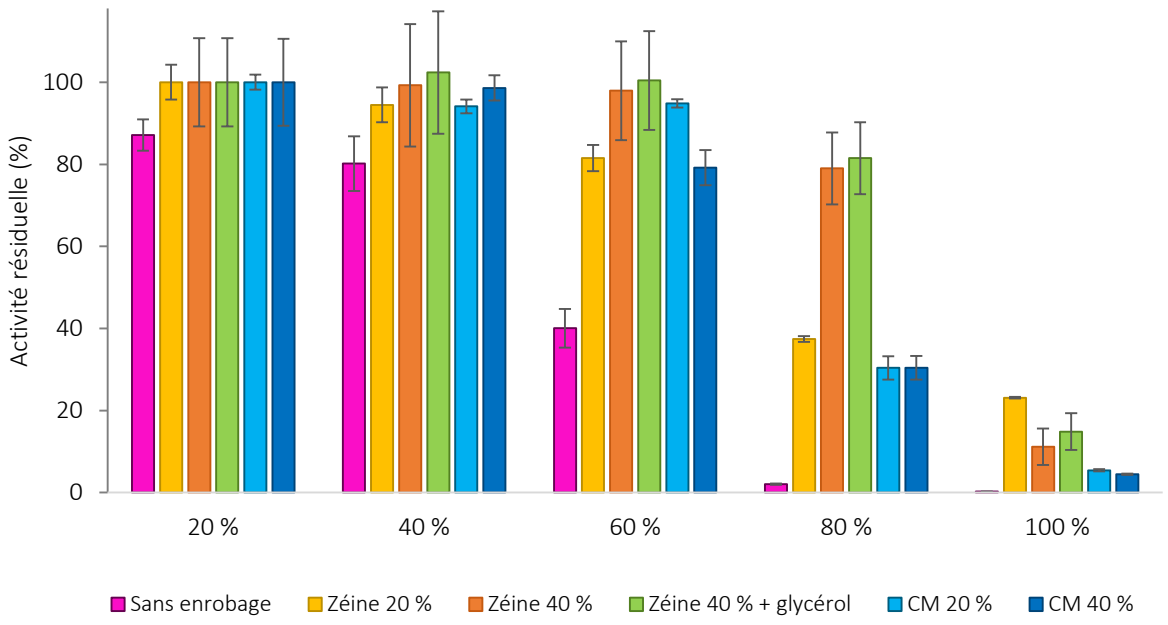


Figure 70 : Efficacité de l'enrobage de l'enzyme AO vis-à-vis des différents traitements thermiques

D'après la Figure 70, les cinq enrobages étudiés permettent à l'enzyme de conserver la totalité de son activité durant le traitement thermique à 20 %. Pour rappel, ce dernier entraine une température finale au cœur du produit de 29 °C (Figure 31). Malgré cette température particulièrement basse, sans enrobage, l'enzyme présentait alors une activité proche de 87 %. Pour le second traitement thermique étudié, la température atteinte par le produit en fin de traitement

thermique est proche de 40 °C. L'enzyme native présentait alors une activité résiduelle proche de 80 %. En l'enrobant à l'aide des matrices à 40 % (CM, zéine, zéine et glycérol), l'activité obtenue après traitement thermique est très proche de 100 %. Les deux matrices à 20 % permettent quant à elles de conserver environ 94 % de l'activité des enzymes. Suite au traitement thermique « 60 % », le produit atteint une température d'environ 52 °C. Cette température entrainait une perte de 60 % de l'activité de l'enzyme native. Enrobée avec les matrices « zéine 20 % » et « CM 40 % », l'enzyme conserve environ 80 % de son activité. Grâce aux trois autres enrobages, elle conserve environ 100 % de son activité. En atteignant 70 °C lors du traitement « 80 % », l'enzyme native perd la *quasi*-totalité de son activité. L'enrobage à base de zéine (20 %) permet d'en conserver à peine 40 %. Les deux autres enrobages à base de zéine (40 %) protègent encore mieux l'enzyme puisque cette dernière présente alors une activité résiduelle proche de 80 %. Les matrices à base de CM sont quant à elles moins protectrices puisque l'activité résiduelle mesurée n'est que de 30 %. Enfin, suite au traitement thermique « 100 % », le produit atteint une température de 86 °C. Cette température entraine une perte totale de l'activité de l'enzyme native. L'enrobage à l'aide de zéine permet de conserver entre 10 et 20 % de son activité contre environ 5 % pour les enrobages à base de CM.

Ces résultats, notamment pour les matrices à base de zéine, sont particulièrement encourageants. En effet, le traitement thermique recommandé au consommateur pour la cuisson des préparations industrielles est de 1 min 30 s à 750 W. Or, d'après les mesures de température réalisées grâce au four à micro-ondes Mars 6, ce traitement thermique entraine une température finale au cœur du produit de 64 °C. Cette température finale se situe donc entre celle atteinte lors du traitement « 60 % » (52 °C) et du traitement « 80 % » (70 °C). Or, lors de chacun de ces deux traitements, l'enzyme enrobée avec la matrice à base de zéine (40 %) permet de protéger l'enzyme à hauteur de 100 % et 80 %, respectivement. **Il est donc fort probable que l'enzyme enrobée à l'aide de cette matrice, même après le traitement thermique recommandé aux consommateurs, permette d'hydrolyser assez de lactose durant la digestion gastrique pour permettre de remplir l'objectif initialement fixé** (moins de 18 g de lactose par litre de formulation). Pour vérifier cette hypothèse, l'activité de l'enzyme enrobée à l'aide de zéine (40 %) sera étudiée en conditions gastriques après traitement thermique.

3.2.3.3. Etude de l'action de la β-galactosidase durant la digestion gastro-intestinale

D'après les résultats précédents, les matrices à base de zéine (40 %) et de zéine et glycérol (40 %) permettent de protéger très efficacement l'enzyme AO du traitement thermique en four à

micro-ondes. Ces deux matrices présentant une efficacité quasiment identique, seule celle sans glycérol sera par la suite étudiée. En effet, l'objectif étant à terme d'utiliser cet enrobage dans un produit alimentaire, autant limiter le recours aux additifs non indispensables.

Globalement, l'enzyme AO enrobée avec la matrice à base de zéine à 40 % a ainsi été étudiée dans des conditions *in vitro* mimant les conditions gastriques, après un traitement thermique en four à micro-ondes Mars 6 durant 1 min 30 s à 750 W. Dans un premier temps, l'action de l'enzyme sur l'hydrolyse du lactose a donc été étudiée durant 120 min, en solution SMUF, à 37 °C et selon la cinétique de diminution du pH gastrique donnée en Tableau 5. Les résultats sont présentés en Figure 71.

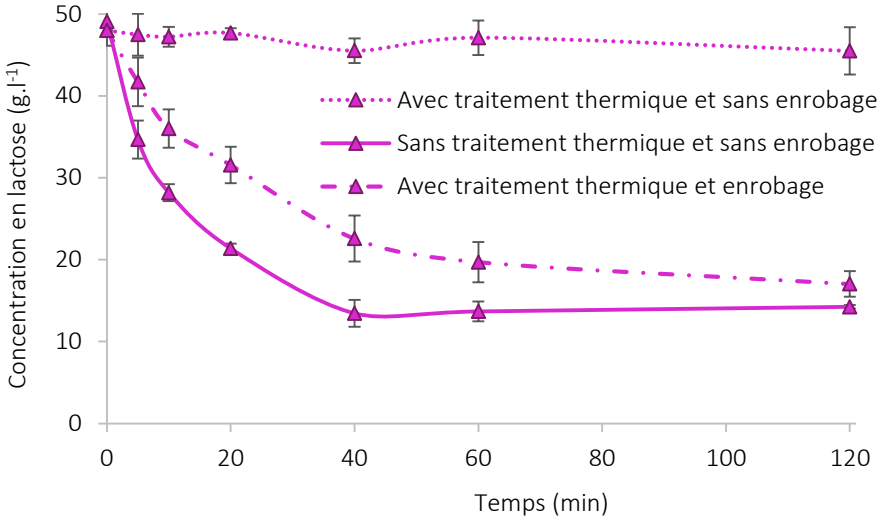


Figure 71 : Cinétique d'hydrolyse du lactose, par l'enzyme AO enrobée avec de la zéine (40 %) et traitée thermiquement, en solution SMUF dans les conditions de l'étape de digestion gastrique

Après le traitement thermique recommandé pour la cuisson des formulations, l'enzyme AO native ne permet aucune hydrolyse du lactose contenu dans le milieu réactionnel (Figure 71). Dans ces mêmes conditions mais sans traitement thermique préalable, l'enzyme permettait une hydrolyse correcte du lactose, aboutissant à une concentration d'environ 14 g de lactose par litre de produit. D'après la Figure 71, l'enrobage de l'enzyme AO lui procure bien une protection durant le traitement thermique et lui permet d'agir dans des conditions de température et de pH simulant le passage gastrique. Bien que l'hydrolyse du lactose soit légèrement moins efficace avec l'enzyme enrobée, cette dernière permet tout de même l'obtention d'un produit à environ 17 g de lactose par litre de formulation. Cela permettrait de remplir l'objectif initialement fixé.

Comme pour l'enzyme native, de façon à se rapprocher au mieux des conditions d'une digestion gastrique, le produit est étudié dans des conditions de digestion *in vitro*. L'enzyme

enrobée est donc placée dans la formulation sèche, puis réhydratée à l'aide de lait ½ écrémé. Après traitement thermique, l'hydrolyse du lactose par l'enzyme est suivie dans un milieu simulant les sécrétions gastriques et contenant de la pepsine. Les conditions de pH et de température sont les mêmes que précédemment. L'hydrolyse du lactose dans ces conditions est donnée en Figure 72.

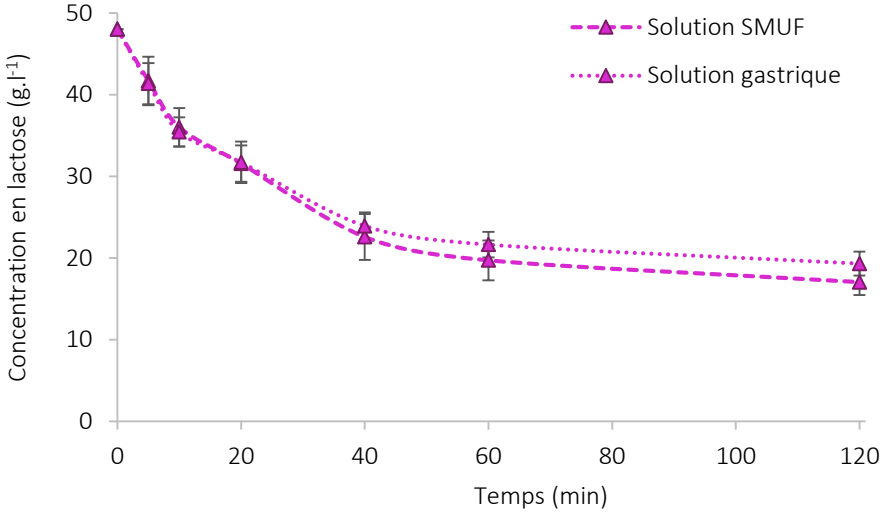


Figure 72 : Cinétique d'hydrolyse du lactose par l'enzyme AO enrobée avec de la zéine (40 %) et traitée thermiquement durant la digestion gastrique *in vitro* monocompartimentée

D'après la Figure 72, l'hydrolyse du lactose par l'enzyme AO dans le produit réhydraté et en présence de la solution gastrique semble identique à l'hydrolyse observée dans la solution SMUF. La présence de pepsine n'a, comme dans le cas de l'enzyme native, aucune influence sur son activité. De même, la matrice alimentaire ne semble pas influencer l'activité de l'enzyme. Ainsi, l'action de l'enzyme durant le passage gastrique semble permettre l'obtention d'un produit présentant une concentration en lactose de 19 $g.l^{-1}$. Bien que cela se situe légèrement au-dessus de l'objectif fixé, le résultat reste très satisfaisant. Pour définitivement valider ou invalider la possibilité de recourir à l'enzyme encapsulée pour les produits subissant un traitement thermique, une digestion gastro-intestinale dynamique est réalisée.

Pour rappel, l'une des principales modifications apportée au modèle monocompartimenté a été la simulation de la vidange gastrique, et l'apport séquentiel des solutions gastriques (pepsine et lipase) et intestinales (pancréatine, acides biliaires et trypsine). Contrairement aux précédentes cinétiques pour lesquelles il était aisé de pratiquer des prélèvements, dans le cas de ce modèle semi-dynamique, seul un prélèvement en fin de phase intestinale est réalisable. Ainsi, après passages gastrique et intestinal, la concentration finale en lactose du produit a été mesurée. Cette dernière est de 17,3 ± 2,3 $g.l^{-1}$. Or, pour répondre aux besoins de la majorité des intolérants au lactose, il a été mis en évidence que l'apport en lactose devait être inférieur à 18 g de lactose par

litre de produit. Les paramètres simulant la digestion gastro-intestinale ayant été choisis pour se placer dans les conditions les plus néfastes pour l'enzyme, il est envisageable de penser que **l'ajout de 4500 unités d'enzymes AO enrobée à l'aide de la matrice à base de zéine aux produits de type 3 et 4 permettrait l'obtention d'un produit traité thermiquement qui conviendrait à la majorité des personnes intolérantes au lactose.** Bien sûr, cette hypothèse nécessiterait une confirmation par des études *in vivo* mais les résultats obtenus sont particulièrement encourageants.

3.3. Conclusion

Dans l'optique de stabiliser l'enzyme AO vis-à-vis du traitement thermique, les procédés et les matrices généralement utilisés pour l'encapsulation de composés alimentaires ont été étudiés. Ainsi, le séchage par pulvérisation tend tout de même à altérer la structure secondaire des enzymes. L'enrobage en lit fluidisé a donc été sélectionné. De nombreuses matrices sont aussi utilisables dans le domaine alimentaire, mais aucune n'a été identifiée comme particulièrement efficace pour la protection de molécules d'intérêt vis-à-vis des traitements thermiques. Mais le mécanisme de chauffage par micro-ondes reposant sur le changement d'orientation des molécules dipolaires (principalement l'eau), le développement d'un enrobage rendant l'enzyme insoluble dans l'eau permettrait certainement de limiter sa dénaturation. C'est pourquoi la zéine, principale protéine du maïs, et la caséine, protéine majeure du lait, ont été sélectionnées.

L'enrobage de l'enzyme AO a été mené à l'échelle laboratoire dans un Mini-Glatt (Glatt GMbH, Allemagne). Cinq matrices, à base de zéine et de CM, ont ainsi été développées puis caractérisées. D'après les observations de MEB, les matrices à base de zéine semblent de meilleure qualité : elles présentent une surface plus lisse et sans craquelures. Il en est de même pour les observations granulométriques : les matrices à base de zéine ne présentent pas d'agglomération, ni de petites particules correspondant à de petites particules issues de la solution d'enrobage ayant séché. La teneur en eau et l'activité de l'eau de ces particules est aussi inférieure à celles obtenues avec la matrice à base de CM. Elles pourraient ainsi aisément être incorporées à la formulation sèche, sans crainte d'agglomération ou de perte d'activité. Dans le même temps, l'enrobage en lit fluidisé apparait comme un procédé « doux », n'entrainant pas de perte d'activité de l'enzyme. L'étude de l'efficacité de l'enrobage sur la résistance aux traitements thermiques de l'enzyme AO a, en outre, donné d'excellents résultats : les matrices à base de zéine (40 %) permettent de conserver l'intégralité de l'activité enzymatique après un traitement thermique « 60 % », 80 % de son activité après un traitement thermique « 80 % » et entre 10 et 15 % de son activité après un traitement thermique « 100 % ». Le traitement thermique de référence se situant entre le traitement « 60 % » et le traitement « 80 % », il est très probable que l'enzyme enrobée présente encore plus de 80 % de son activité après traitement. Pour s'en assurer, l'hydrolyse du lactose durant la digestion gastrique par l'enzyme enrobée avec la matrice à base de zéine (40 %) traitée thermiquement a été suivie. Ce suivi a été réalisé en solution SMUF simple, dans le produit réhydraté selon un modèle de digestion gastrique statique et monocompartimenté, ainsi que dans le produit réhydraté selon un modèle de digestion gastro-intestinale dynamique. Dans tous les cas,

le produit obtenu en fin de digestion présentait une concentration en lactose inférieure à 18 g.l^{-1}. Il apparait donc que la zéine est une matrice très intéressante pour la protection des β-galactosidases durant des traitements thermiques en four à micro-ondes. Elle permet ainsi, en protégeant efficacement l'enzyme AO, le développement de produits de type 3 et 4 qui sont adaptés aux intolérants au lactose (Figure 73).

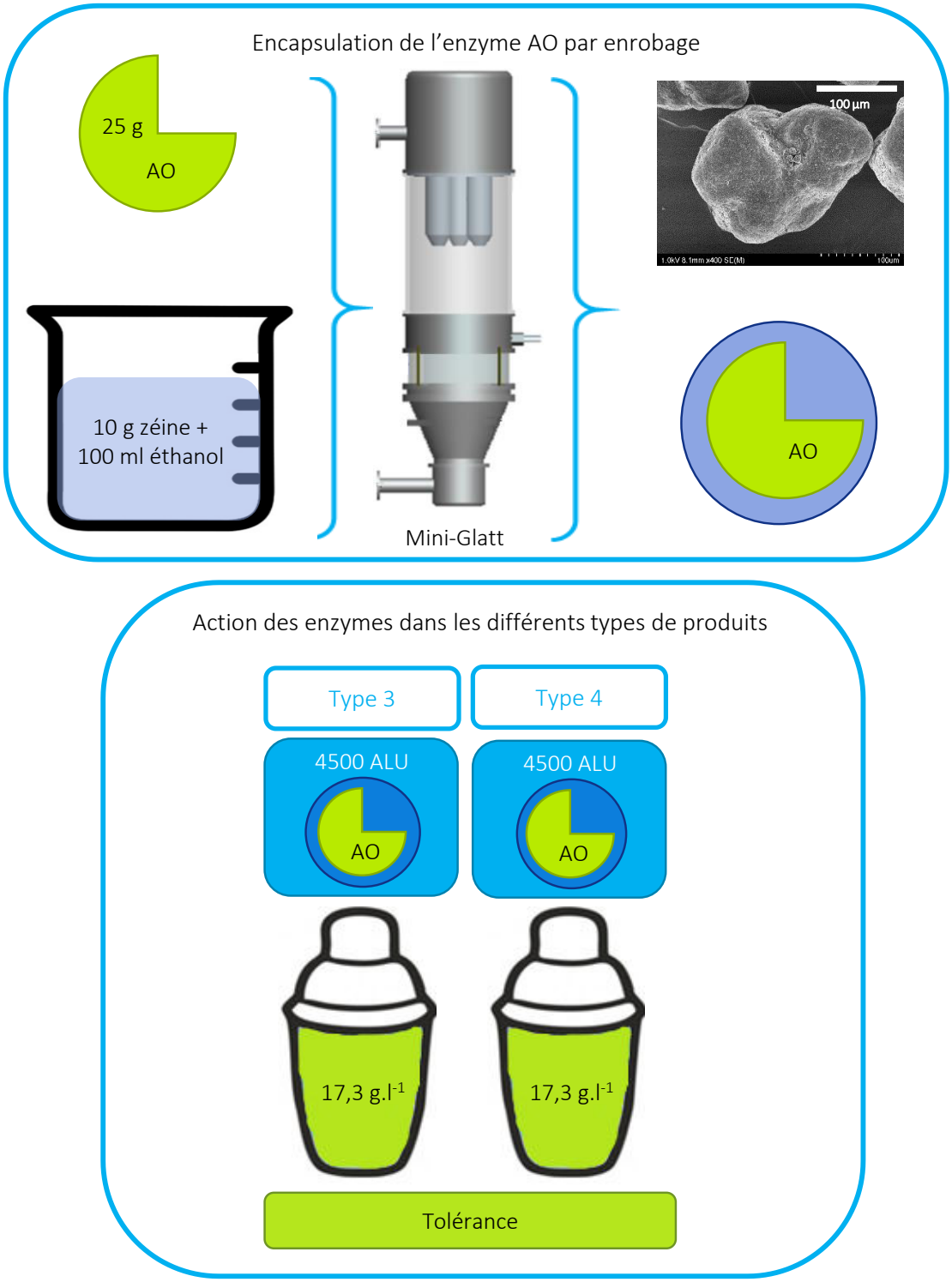


Figure 73 : Bilan de l'encapsulation de l'enzyme AO et de son incorporation dans les produits 3 et 4

4. Conclusion du chapitre

L'objectif de cette partie du projet était de développer quatre types de produits diététiques adaptés à la majorité des intolérants au lactose. Après une étude bibliographique approfondie, il a été décidé d'intégrer à la formulation sèche une, voire deux β-galactosidases dont la vocation était d'hydrolyser le lactose entre la phase de réhydratation du produit et son arrivée au niveau du côlon.

Pour le produit de type 1, directement consommé après sa réhydratation, l'ajout de 4500 unités d'enzyme issue de la moisissure *Aspergillus oryzae* permet l'obtention d'un produit adapté aux intolérants au lactose. En effet, dans les conditions gastriques acides et malgré la présence de pepsine, la β-galactosidase hydrolyse correctement le lactose et permet l'obtention d'un produit présentant une teneur en lactose inférieure à 18 $g.l^{-1}$ avant son arrivée colique.

Le produit de type 2 est quant à lui placé en conditions réfrigérées durant 30 à 240 min après sa réhydratation et avant sa consommation. L'addition de 4500 unités d'enzyme issue de la levure *Kluyveromyces lactis* permet là aussi l'obtention d'un produit convenant à la majorité des intolérants au lactose. Du fait de la neutralité du produit, et malgré le basse température de réfrigération, l'enzyme permet en effet une hydrolyse importante du lactose durant les 30 premières minutes de réfrigération. Ainsi, au bout de 30 min, la teneur en lactose du produit n'est plus que de 16,5 $g.l^{-1}$.

Du fait du traitement thermique qu'ils subissent directement après la réhydratation, le développement des produits de type 3 et 4 a été plus laborieux. Les deux enzymes étudiées, thermosensibles, n'étaient pas en mesure d'hydrolyser le lactose après le traitement thermique de référence. Des enrobages de protection à base de protéines peu solubles ou insolubles dans l'eau ont par conséquent été développés pour l'enzyme la moins thermosensible (enzyme AO). Les résultats obtenus après enrobage sont particulièrement satisfaisants, et l'enzyme AO permet, durant la digestion gastrique et après traitement thermique, l'obtention de produits présentant une teneur en lactose inférieure à 18 $g.l^{-1}$. Ainsi, l'addition de 4500 unités d'enzyme issue de la moisissure *Aspergillus oryzae* et enrobées à l'aide d'une matrice de zéine, permet aux produits de type 3 et 4 d'être adaptés à la majorité des intolérants au lactose.

Ainsi, l'objectif initialement fixé est pleinement rempli (Figure 74).

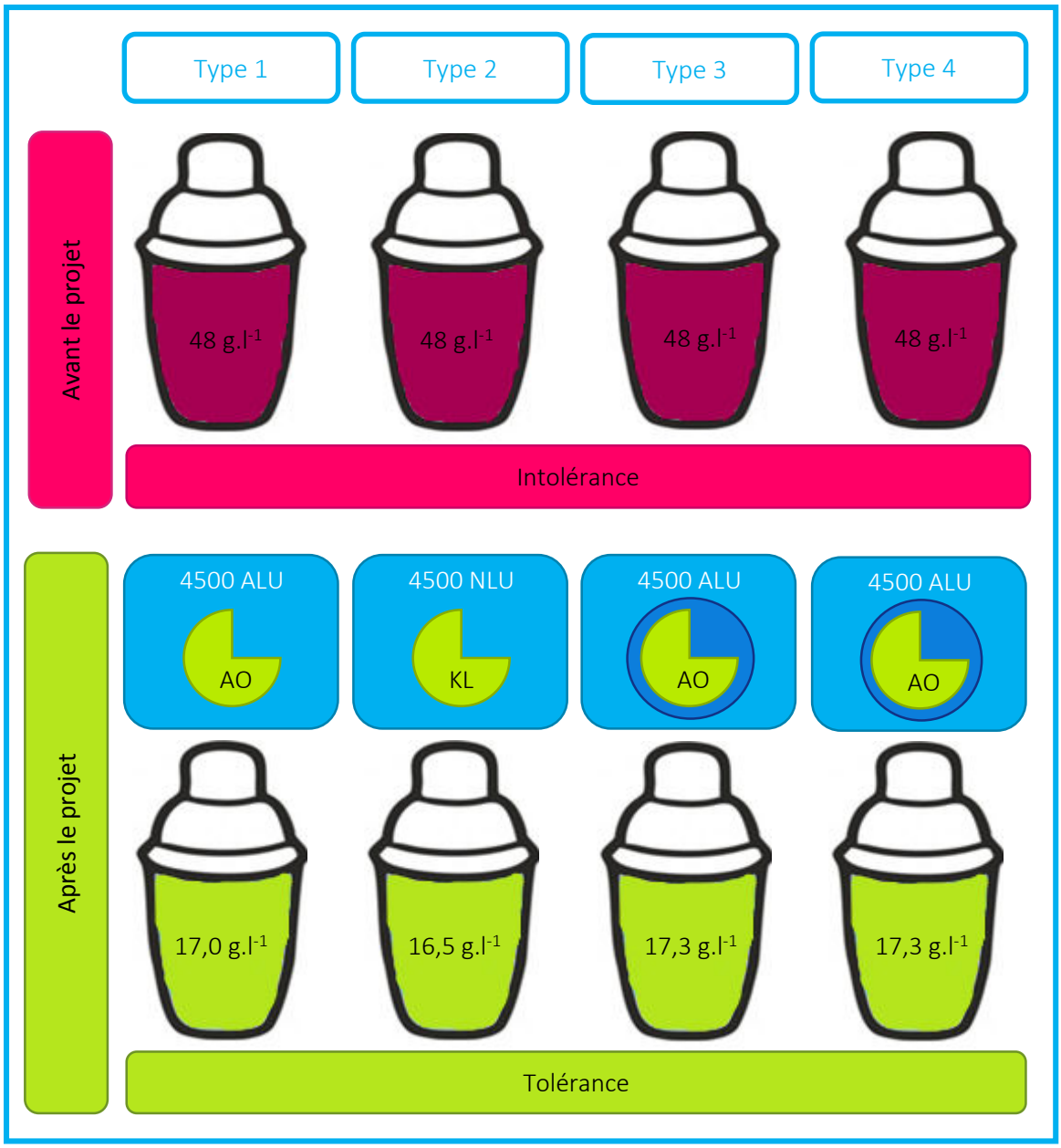


Figure 74 : Bilan de l'incorporation des enzymes AO et KL dans les 4 types de produits industriels

Chapitre 3 : Amélioration de la digestibilité d'une formulation alimentaire

1. Sélection d'une source d'amidon adaptée aux produits 179

1.1. Digestion de l'amidon : étude bibliographique..... 180

1.2. Résultats et discussion 198

1.3. Conclusion..... 218

2. Sélection d'une source de protéine adaptée aux produits..... 220

2.1. Digestion des protéines : étude bibliographique..... 221

2.2. Résultats et discussion 244

2.3. Conclusion..... 258

3. Conclusion du chapitre 260

1. Sélection d'une source d'amidon adaptée aux produits

L'amidon constitue la principale source d'énergie de la majorité de la population mondiale. Dans la formulation industrielle sèche, elle apporte une quantité théorique de glucose non négligeable. Mais malgré un processus de digestion complexe et efficace, une partie de l'amidon alimentaire peut rejoindre le côlon au niveau duquel il est métabolisé par la flore commensale. Outre la perte énergétique, cette métabolisation peut entrainer des inconforts digestifs. Mais la part d'amidon échappant à la digestion est très variable selon la source botanique et les traitements physiques, chimiques et thermiques subis. L'objectif de cette étude est donc de sélectionner, pour chacun des quatre types de produit, la ou les source(s) d'amidon présentant la teneur en amidon résistant la plus faible. Ainsi, dans un premier temps, une étude bibliographique permettra de mettre en évidence la composition et la structure de l'amidon, son processus de digestion et les implications santé, ainsi que les facteurs influençant sa digestibilité. Dans un second temps, la digestibilité de sept sources d'amidon sera étudiée et comparée expérimentalement.

1.1. Digestion de l'amidon : étude bibliographique

1.1.1. L'amidon : composition et structure

L'amidon est la principale substance glucidique de réserve pour les végétaux supérieurs et représente par conséquent une fraction pondérale importante des céréales (30 à 70 %), des tubercules (60 à 90 %) et des légumineuses (25 à 50 %). Il constitue aussi la principale source d'énergie pour la majorité de la population mondiale. Il s'agit d'un composé nutritionnel abondant, renouvelable, peu coûteux et qui présente des propriétés techno-fonctionnelles intéressantes (épaississant, gélifiant, liant…) (Boursier, 2005).

L'amidon natif se présente sous forme de granules relativement denses, insolubles dans l'eau froide et dont le diamètre varie entre 2 et 100 µm (Figure 75). Tout comme sa taille, la forme de l'amidon dépend de son origine botanique. Généralement, les granules de tubercules sont volumineux et de forme ovale, ceux de céréales polygonales ou sphériques et ceux de légumineuses sphériques ou réniformes (Liu, 2005).

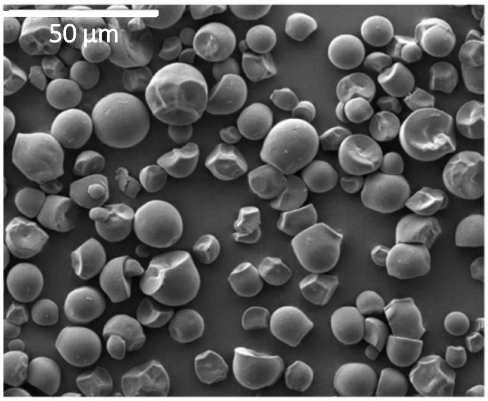


Figure 75 : Aspect microscopique d'un amidon de manioc (MEB grossissement x 280), d'après Boursier (2005)

L'amidon est essentiellement composé d'unités d'α-D-glucopyranosyl et renferme deux polymères de structures différentes : l'amylose, molécule linéaire, et l'amylopectine, molécule ramifiée. Le ratio entre ces deux polymères diffère selon l'origine botanique de l'amidon. Naturellement, il est composé d'environ 75 % d'amylopectine et 25 % d'amylose. Les amidons cireux sont quant à eux très riches en amylopectine (entre 92 et 100 %), tandis que les amidons à haute teneur en amylose atteignent 10 à 70 % d'amylose. Un amidon génétiquement modifié atteint même 90 % d'amylose (Case *et al.*, 1998). L'amidon renferme aussi une faible proportion de composants non glucidiques (lipides, protéines, phosphore…).

L'amylose est une macromolécule linéaire composée d'unités de D-glucose reliées entre elles par des liaisons α (1-4) (Figure 76) et de rares liaisons α (1-6) la rendant faiblement ramifiée (Takeda *et al.*, 1984). L'amylose se compose de plusieurs chaînes présentant des degrés de polymérisation compris entre 500 et 6000 unités de glucose.

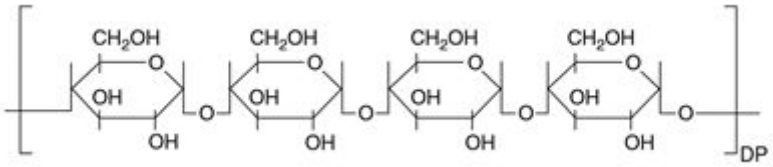


Figure 76 : Structure de l'amylose, d'après Liu (2005)

Sa masse moléculaire est comprise entre 10^5 et 10^6 Daltons. Chaque macromolécule possède une extrémité réductrice et une extrémité non réductrice. L'amylose peut adopter une conformation hélicoïdale comportant de 6 à 8 unités glucose par tour, stabilisée par la présence de liaisons hydrogènes entre les unités glycosyl. Cette hélice forme une cavité hydrophobe dans laquelle peuvent se complexer des alcools, des matières grasses, de l'iode… (Boursier, 2005). En raison de sa forte tendance à former des liaisons hydrogène intramoléculaires, donnant lieu à une transition pelote statistique-double hélice et à une forte tendance à la cristallisation par entassement de chaînes (première étape du phénomène appelé "rétrogradation"), les solutions d'amylose sont peu stables (Buléon *et al.*, 1990).

L'amylopectine est le constituant glucidique principal de la plupart des amidons. Il s'agit d'une molécule ramifiée, composée de multiples courtes chaînes d'unités glucose, reliées entre elles par des liaisons α (1-6) (Figure 77). Les liaisons α (1-6) représentent entre 5 et 6 % du total des liaisons (Whistler et Daniel, 1984).

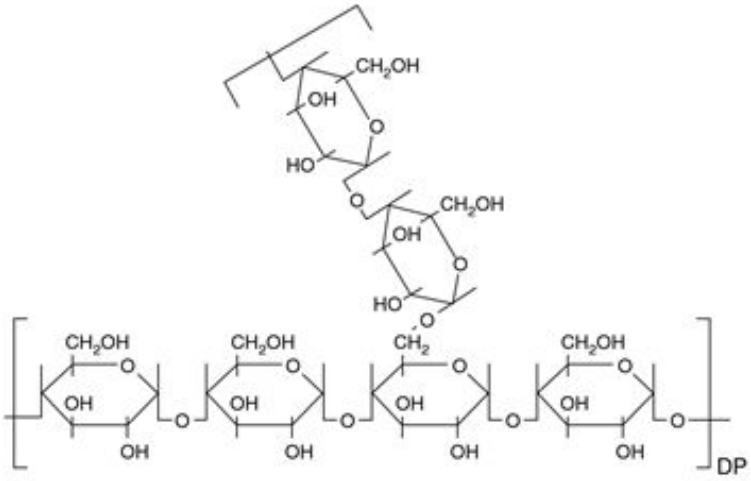


Figure 77 : Structure de l'amylose, d'après Liu (2005)

La masse moléculaire de l'amylopectine est comprise entre 10^7 et 10^8 Daltons. Sa structure est constituée de chaînes courtes, dont le degré de polymérisation (DP) est compris entre 12 et 20, de chaînes intermédiaires, dont le DP est compris entre 30 et 45 et de chaînes longues dont le DP moyen est supérieur à 60. Les chaînes longues forment l'ossature de la molécule, tandis que les chaînes courtes forment son arborescence. Les chaînes dont le DP est supérieur à 60 portent les extrémités réductrices. L'origine botanique de l'amidon influence le ratio chaînes longues/chaînes courtes. Alors qu'il est de l'ordre de 5 pour l'amylopectine de tubercules (Robin *et al.*, 1974), il est compris entre 8 et 10 pour l'amylopectine de céréales (Robin, 1976) et de légumineuses (Colonna et Mercier, 1984).

Les granules d'amidon présentent une structure semi-cristalline : environ 70 % de leur masse est sous forme amorphe, contre 30 % sous forme cristalline. La région amorphe contient la majeure partie de l'amylose et une importante quantité d'amylopectine, tandis que la région cristalline contient essentiellement de l'amylopectine. Des stries concentriques sont d'ailleurs observables après hydrolyse acide ou enzymatique de l'amidon (Jenkins *et al.*, 1993 ; Oostergetel et van Bruggen, 1989) (Figure 78).

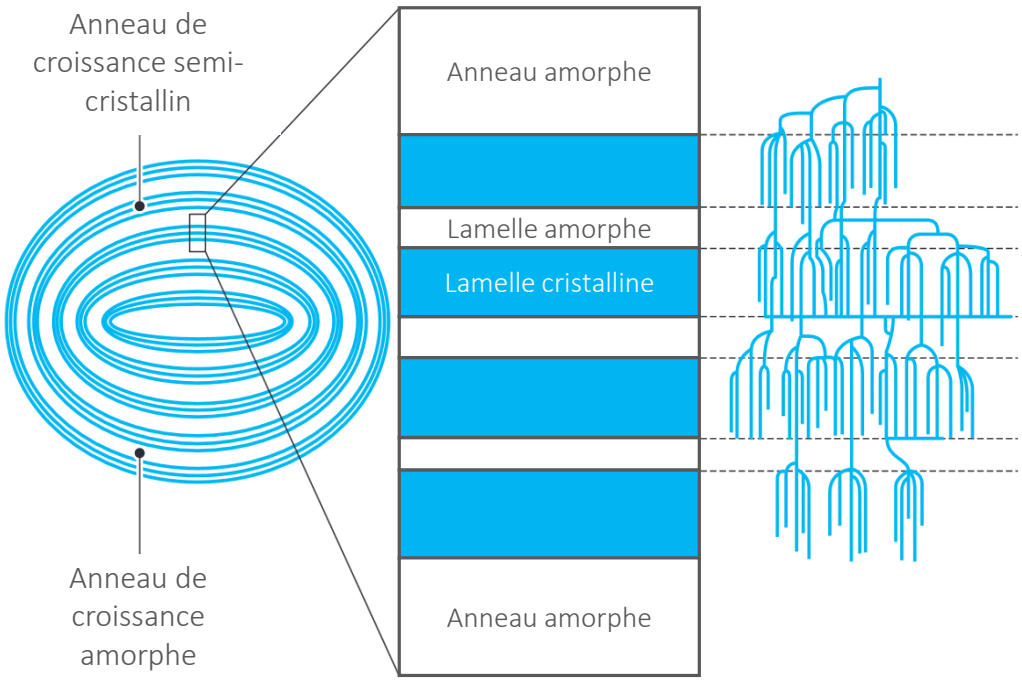


Figure 78 : Structure semi-cristalline d'un granule d'amidon, adapté de Boursier (2005)

La cuisson de l'amidon en milieu fortement hydraté provoque sa gélatinisation à une température toujours supérieure à 50 °C, variable en fonction de l'espèce botanique. Cette différence s'explique notamment par la variation de leur degré de cristallinité, de la structure

moléculaire de l'amylopectine (longueur de chaînes, degré de ramification, poids moléculaire et polydispersité), de la composition de l'amidon (ratio amylose/amylopectine et teneur en phosphore) et de la structure des granules (taille, forme) (Tester, 1997). Les granules absorbent de l'eau dans les zones amorphes du grain, ce qui provoque leur gonflement irréversible. Ce gonflement conduit à la rupture des liaisons hydrogènes dans les zones cristallines du grain et donc à sa déstructuration (Tomasik, 2004). Au fur et à mesure de la rupture des liaisons hydrogènes, les constituants de faible masse moléculaire (amylose, matériel intermédiaire) diffusent hors du grain. La solubilisation de l'amidon n'est totale qu'à des températures supérieures à 100 °C. L'empois d'amidon obtenu est composé de grains gonflés, constituant la phase dispersée, et de macromolécules constituant la phase solubilisée (il s'agit notamment de l'amylose). L'amidon gélatinisé est très peu résistant à l'hydrolyse enzymatique, il est donc facilement digéré (Boursier, 2005).

Le refroidissement de l'amidon gélatinisé entraine une insolubilisation des macromolécules et une séparation de phase liée à l'incompatibilité entre amylose et amylopectine. Cette séparation est suivie d'une recristallisation. Ce phénomène est appelé rétrogradation. Des doubles hélices se forment rapidement dans les parties riches en amylose, et celles-ci s'assemblent pour former des cristaux qui se relient pour former un réseau tridimensionnel. Les chaînes terminales de l'amylopectine peuvent aussi subir une recristallisation, mais celle-ci est lente (plusieurs jours) (Boursier, 2005). Ainsi, l'amylose est responsable de sa rétrogradation à court terme (moins d'un jour), tandis que l'amylopectine est responsable de sa rétrogradation à long terme (plusieurs semaines) (Lii *et al.*, 2004). La température de rétrogradation de l'amidon est de 10 à 26 °C inférieure à la température de gélatinisation (le réseau cristallin est plus faible que celui de l'amidon natif). Ces légères différences inter-espèces s'expliquent principalement par une variation du ratio amylose/amylopectine, de la taille et de la forme des granules et de la présence ou l'absence de lipides. La longueur des chaînes d'amylopectine joue aussi un rôle, et c'est d'ailleurs ce paramètre qui confère aux amidons cireux leur moindre propension à la rétrogradation (Bao et Bergman, 2004).

1.1.2. La digestion de l'amidon et ses implications santé

1.1.2.1. Processus de digestion

La digestion de l'amidon débute dans la cavité orale par la sécrétion d'une α-amylase salivaire par les glandes parotides. Cette enzyme clive les liaisons α (1-4) glycosidiques, tandis que

la mastication permet la désintégration des aliments et donc l'accroissement de la surface spécifique du bol alimentaire. Les substrats de réaction deviennent alors plus accessibles pour l'enzyme. Malgré les conditions acides de l'estomac, l'amylase salivaire semble conserver une légère activité durant son passage gastrique. L'activité de l'α-amylase salivaire représente 15 % du total de l'activité amylasique durant la digestion (Skude et Ihse, 1976).

L'estomac ne joue aucun rôle majeur dans la digestion directe des glucides, mais il permet d'importantes modifications physicochimiques des aliments (Southgate, 1995). La taille des particules solides est réduite progressivement sous l'effet de la motricité stomacale et, à moindre degré, de la sécrétion acido-peptidique gastrique. Pour être évacués, la plupart des solides doivent être sous forme de particules de moins de 1 mm de diamètre (Malagelada, 1977). C'est la raison pour laquelle la vidange gastrique est ralentie par les solides (comparativement aux liquides), et notamment ceux de grandes tailles et insolubles. Après broyage, les solides se retrouvent progressivement sous forme de solution colloïdale ou de suspension plus ou moins homogène. Ces transformations physicochimiques facilitent leur digestion et leur absorption intestinale (Bernier *et al.*, 2010).

L'activité amylasique est principalement due à l'α-amylase sécrétée par le pancréas dans la lumière de l'intestin grêle. Malgré quelques différences de structure et de stabilité, les α-amylases salivaires et pancréatique sont très similaires, notamment en ce qui concerne la spécificité du substrat. La dégradation de l'amylose par les amylases permet l'obtention de maltose et de maltotriose. Les α-amylases ne pouvant cliver les liaisons α (1-6), les produits de dégradation de l'amylopectine sont des molécules de maltose, de maltotriose et des dextrines limites (Wursch, 1989). L'enzyme n'étant pas capable de cliver les liaisons α-1-6 et présentant une faible action sur les liaisons α-1-4 adjacentes aux branchements α-1-6, les dextrines sont des molécules glucidiques renfermant de 5 à 10 molécules de glucose, qui ne sont pas libérées par l'amylase. Du fait du grand nombre d'extrémités attaquables, l'amylopectine est par ailleurs dégradée beaucoup plus rapidement que l'amylose. Les produits de dégradation diffusent du lumen vers la bordure en brosse de la muqueuse intestinale, où la digestion finale a lieu.

Le maltose, le maltotriose et les dextrines limites sont dégradés en glucose sous l'action de disaccharidases et d'oligosaccharidases (sucrase-isomaltase et glucoamylase) ayant des activités isomaltase, maltase, glucoamylase et dextrinases limites. Ces enzymes sont « immobilisées » dans la bordure en brosse des entérocytes et sont situées à proximité des sites de transport du glucose (Figure 79).

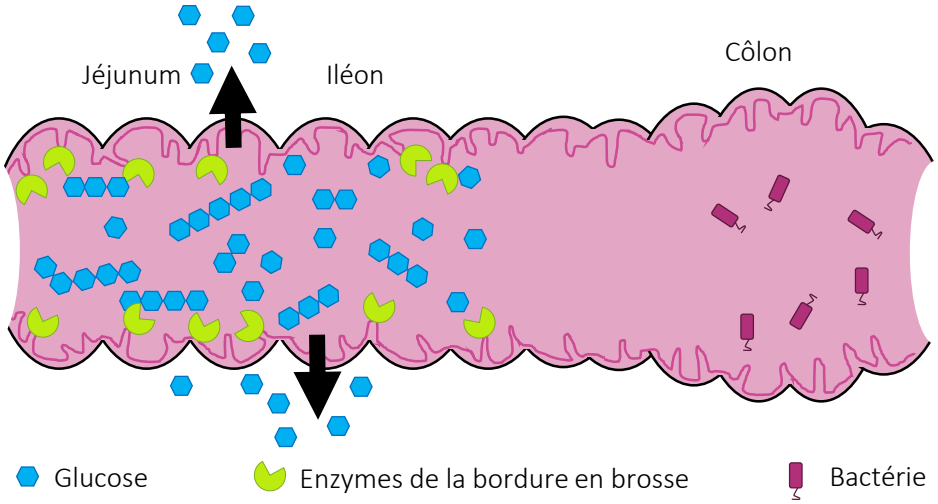


Figure 79 : Devenir intestinal d'un amidon non résistant

Tout au long de l'intestin grêle sont répartis des chémorécepteurs sensibles aux glucides (Lin *et al.*, 1989). Selon la longueur d'intestin grêle en contact avec du glucose, un frein énergétique (ralentissement de la vidange gastrique) sera ou non appliqué. Ainsi, la vidange gastrique est ralentie de façon plus intense après l'absorption d'un amidon peu digestible (libérant donc des glucides en grande quantité jusque dans l'iléon) qu'après ingestion d'un amidon facilement digestible. Cela permet, à partir d'apports alimentaires discontinus, notamment en volume et en teneur énergétique, d'aboutir à une présentation relativement homogène de ces nutriments à l'intestin grêle (Bernier *et al.*, 2010). Le glucose obtenu par l'hydrolyse enzymatique de l'amidon rejoint la circulation sanguine porte grâce à un processus Na^+ dépendant. Le glucose est ensuite transporté jusqu'au foie et rejoint la circulation sanguine pour accéder aux tissus périphériques grâce à l'action de l'insuline.

L'amidon est constitué de différentes fractions digérées plus ou moins rapidement. L'amidon rapidement digestible correspond à la fraction convertie en glucose au bout de 20 min de digestion intestinale. Il s'agit généralement d'amidon sous forme amorphe et dispersée, retrouvé dans les produits alimentaires ayant subi un traitement thermique humide (pomme de terre ou pain par exemple). La fraction d'amidon lentement digestible est elle aussi intégralement digérée dans l'intestin grêle, mais de façon plus lente que la précédente. Il s'agit généralement d'amidon amorphe physiquement inaccessible, d'amidon natif ou d'amidon rétrogradé à la suite d'un traitement thermique. Cette fraction correspond à la part d'amidon hydrolysé en glucose entre 20 et 120 min de digestion (Sajilata *et al.*, 2006). Enfin, une partie de l'amidon ingéré peut être résistante aux enzymes digestives. N'étant pas dégradé au niveau de l'intestin grêle, il ne peut être absorbé au niveau de la muqueuse intestinale et rejoint donc le côlon (Figure 80). L'amidon

résistant est une source glucidique potentielle pour la flore colique. Les polysaccharides sont donc fermentés par les bactéries, ce qui apporte l'énergie nécessaire à leur croissance. Chez l'homme adulte, les principaux produits de réactions sont des AGCC (acétate, propionate et butyrate notamment) et des gaz (CO_2, H_2 et CH_4) (Topping et Clifton, 2001). La présence intra-colique de glucose et de métabolites aurait un effet de ralentissement sur la vidange gastrique (Lin *et al.*, 1989).

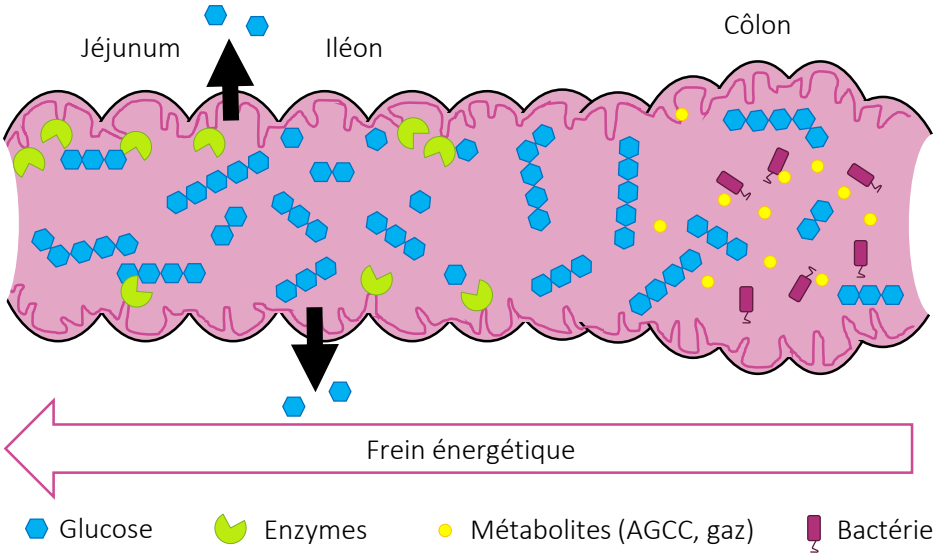


Figure 80 : Devenir digestif d'un amidon résistant

Les amidons résistants sont généralement classés selon leur origine. Les amidons résistants de type 1 sont sous une forme physiquement inaccessible pour les enzymes digestives. Cette forme est notamment retrouvée dans les céréales et les graines partiellement broyées, ainsi que dans des matrices alimentaires amylacées très denses (Sajilata *et al.*, 2006). Les amidons résistants de type 1 sont stables à la plupart des procédés de cuisson classique. Les amidons résistants de type 2 correspondent à des granules d'amidon compacts et structurés d'une manière qui empêche les enzymes digestives d'agir. Ce type d'amidon est notamment présent dans la pomme de terre crue, la banane non mûre ou l'amidon de maïs très riche en amylose (Amylomaïs) (Nugent, 2005). L'amidon résistant de type 3 représente l'amidon rétrogradé à la suite d'un traitement thermique suivi d'un refroidissement (Sajilata *et al.*, 2006). Enfin, les amidons modifiés chimiquement qui ne peuvent être hydrolysés par les enzymes digestives (phosphate esters de diamidon…) correspondent aux amidons résistants de type 4 (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2010).

1.1.2.2. Indice glycémique : effet sur la santé et la satiété

Durant longtemps, les glucides ont été classés comme « simples » ou « complexes » selon leur degré de polymérisation. Cependant, leurs effets sur la santé peuvent être mieux décrits sur la base de leurs effets physiologiques (capacité à faire augmenter la glycémie) qui dépendent à la fois du type de constituant (glucose, fructose…) et de sa forme physique (taille des particules, hydratation…). Cette classification correspond au concept d'indice glycémique (IG) (Augustin *et al.*, 2002). L'IG est une évaluation quantitative des aliments fondée sur la réponse glycémique postprandiale d'un aliment donné exprimée en pourcentage de la réponse d'une quantité équivalente d'un aliment de référence (Jenkins *et al.*, 1981). En pratique, un sujet consomme 50 g d'un aliment à tester et sa glycémie est relevée toutes les 15 min durant 2 h. Ce même sujet consomme ensuite 50 g de glucose ou de pain blanc et sa glycémie est enregistrée de la même façon. Dans les deux cas, la courbe de la glycémie en fonction du temps sera tracée, et le rapport entre l'aire sous la courbe obtenue avec le produit à tester et celle obtenue avec le produit de référence donnera la valeur de l'indice glycémique du produit testé (FAO/WHO, 1998). En général, l'indice glycémique varie de 20 à 90 pour les aliments riches en glucides. Trois classes d'aliments ont par ailleurs été mis en évidence (Miller *et al.*, 1995) : les amidons avec un faible indice glycémique (IG < 55), avec un indice glycémique intermédiaire (55 ≤ IG ≤ 70) et avec un indice glycémique élevé (IG ≥ 70). L'indice glycémique d'un aliment dépend de sa composition et des modifications physiques qu'il a subies. D'autres paramètres tels que la présence de fibres solubles, de protéines, de matières grasses ou d'anti nutriments modulent l'IG. Ainsi, les produits à faible indice glycémique sont considérés comme étant lentement digérés et absorbés, tandis que les aliments à indice glycémique élevé sont rapidement digérés et absorbés (Brouns *et al.*, 2005). La pratique d'un régime à IG bas aurait une influence positive sur la santé. Il entrainerait une diminution de la demande en insuline, une amélioration du contrôle de la glycémie ou encore une réduction de la teneur sanguine en lipides qui jouent eux-mêmes un rôle important dans la prévention ou la gestion de plusieurs maladies chroniques occidentales telles que le diabète, les maladies coronariennes ou certains cancers (Augustin *et al.*, 2002). L'IG aurait aussi un effet positif sur la satiété.

L'effet de l'indice glycémique sur la satiété a été étudié dans de nombreux travaux. Dans une revue bibliographique (Bornet *et al.*, 2007), 25 études ont été reprises et étudiées. Plus de la moitié d'entre elles montrent un effet bénéfique des régimes à faible IG sur la satiété. La seconde moitié des études ne permettait pas l'établissement de conclusions claires. Tous les mécanismes

impliqués dans ces observations ne sont pas encore clairement identifiés. Globalement, les aliments à faible IG restent plus longtemps dans l'intestin grêle et stimulent donc durant une période plus longue les récepteurs de nutriments présents dans le tractus gastro-intestinal. Cela entraine une rétroaction prolongée du centre responsable de la faim au niveau cérébral. Plus précisément, une multitude de peptides sont libérés en réponse à la présence d'aliments dans l'intestin grêle et peuvent agir comme des signaux de satiété. Ils exercent leur effet en activant les neurones du noyau du faisceau solitaire dans le cerveau postérieur (Woods, 2004). Un signal particulier de satiété (glucakon-like peptide-1) est par exemple libéré par les cellules L de l'intestin grêle lorsque ces dernières sont en contact avec du glucose (Holst, 1994). Pour conclure, la pratique d'un régime à indice glycémique bas semblerait permettre d'augmenter la sensation de satiété. Suite à la mise en évidence de l'effet satiétogène d'un aliment à IG bas, des questions se sont posées quant à l'utilisation d'un tel régime comme régulateur du poids corporel. D'après plusieurs revues bibliographiques (Bornet *et al.*, 2007 ; Sloth et Astrup, 2006), aucun consensus n'a été mis en évidence quant à l'effet d'un tel régime sur la masse corporelle. Outre pour les diabétiques, un régime à indice glycémique bas semblerait bénéfique pour les sujets en bonne santé. Il permettrait de limiter les risques de développement d'un diabète non insulinodépendant ou de maladies liées au syndrome métabolique, tout en limitant le vieillissement des cellules. Chez les sportifs, un régime à indice glycémique bas permettrait d'augmenter les performances d'endurance.

1.1.3. Les facteurs influençant la biodisponibilité de l'amidon

1.1.3.1. Les caractéristiques physico-chimiques de l'amidon

Les caractéristiques morphologiques des amidons varient en fonction de leur origine botanique : c'est notamment le cas de la taille et de la forme des granules (Singh *et al.*, 2006, 2007). Ces caractéristiques influencent notamment la digestibilité de l'amidon. Ainsi, très tôt, Langworthy et Deuel (1922) ont mis en évidence une corrélation négative directe entre la taille des granules et leur digestibilité. Cette relation a par la suite largement été vérifiée : pour une même espèce, en séparant les granules selon leur taille, la vitesse d'hydrolyse des plus fins est significativement plus rapide (Lovedeep Kaur *et al.*, 2007 ; Lindeboom *et al.*, 2004). Cette observation a été attribuée à leur surface spécifique plus grande, qui favorise la fixation des enzymes, ainsi que leur accès à l'intérieur de la particule (Tester *et al.*, 2006).

L'aspect de la surface des granules d'amidon diffère selon leur origine botanique : les granules d'amidon de maïs de grande taille présentent par exemple des cavités et des rainures (Li

et al., 2001) alors que les granules de pomme de terre présentent seulement de petits nodules et protubérances allant jusqu'à 1 µm de diamètre (Singh *et al.*, 2006). Ces caractéristiques ont un impact significatif sur la digestibilité enzymatique. Globalement, la présence de nombreux orifices à la surface des granules d'amidon de céréales facilite l'entrée des amylases durant la digestion. Faute de tels orifices, les amidons issus de tubercules et de légumineuses sont moins facilement digestibles (Dreher *et al.*, 1984). Ainsi, les granules natifs de pommes de terre, dépourvus de pores ou cavités et présentant une surface très lisse, sont connus pour être particulièrement résistants à l'hydrolyse enzymatique. Cette dernière n'est en effet possible qu'après érosion de leur surface (Singh *et al.*, 2010).

La surface des granules d'amidon peut aussi être occupée par des constituants non amylacés tels que des protéines ou des lipides. Ces composés, en limitant l'accès aux amylases digestives et en bloquant leur site de liaison, tend à limiter la vitesse d'hydrolyse enzymatique (Oates, 1997). Le phosphore, notamment présent sous forme de phospholipides, est l'un des principaux composés à être impliqué dans ce ralentissement (Singh *et al.*, 2008). Il a tendance à former un complexe avec l'amylose et les longues chaînes branchées de l'amylopectine, ce qui tend à limiter le gonflement des granules. Ainsi, les hydrolyses enzymatique et acide s'en trouvent ralenties (Sitohy et Ramadan, 2001). À l'inverse, les groupements phosphates des granules gélatinisés ou partiellement gélatinisés se repoussant entre eux, l'hydrolyse enzymatique est facilitée (Slaughter *et al.*, 2001).

Le contenu en amylose varie lui aussi en fonction de l'origine botanique de l'amidon et module sa digestibilité. La surface d'une molécule d'amylose étant moins importante que celle d'une molécule d'amylopectine, cette dernière est un substrat préférentiel des amylases digestives. De même, les résidus de glucose de l'amylose sont liés avec plus de liaisons hydrogènes que ceux de l'amylopectine. Cela les rend moins sujets à l'hydrolyse enzymatique que les chaînes très branchées de l'amylopectine. Les légumineuses, qui contiennent généralement une teneur importante en amylose (30 à 40 %) sont ainsi moins digestibles que le maïs qui en contient entre 25 et 30 % (Hoover et Zhou, 2003). Cela a notamment été observé *in vivo* chez le rat (Thorne *et al.*, 1983).

1.1.3.2. Les traitements industriels

Les différents traitements utilisés industriellement pour la production d'aliments tendent à modifier leur structure et leurs caractéristiques nutritionnelles. La digestibilité de l'amidon est par

conséquent elle aussi influencée. Par exemple, lorsque les molécules d'amidon sont chauffées en présence d'un excès d'eau, leur structure cristalline est perturbée et les molécules d'eau se lient par liaisons hydrogènes aux groupements exposés de l'amylose et de l'amylopectine. Cela entraine la gélatinisation de l'amidon et sa solubilisation : l'eau est ainsi plus disponible pour les α-amylases. Leur K_m est par conséquent accru d'un facteur compris entre 2,5 et 4. Une augmentation est aussi observée pour la vitesse initiale maximale de la réaction (Slaughter *et al.*, 2002). Globalement, ce type de traitement thermique permet d'augmenter la digestibilité de céréales comme le blé, l'orge ou l'avoine à des valeurs proches de 90 % après une incubation en présence de pancréatine (Anguita *et al.*, 2006). Le principal procédé permettant de faciliter la pénétration de l'eau au sein du granule d'amidon reste le traitement thermique à une température de 100 °C durant plusieurs minutes.

La cuisson-extrusion est une technique industrielle largement utilisée dans le domaine alimentaire. Elle consiste en un traitement mécanique (cisaillement combiné à une pression, une détente et un mélange) en parallèle d'un traitement thermique (chauffage, refroidissement ou une combinaison des deux) (Roustel *et al.*, 2000). Du fait du cisaillement et de la température maintenue au sein de l'extrudeuse, les granules d'amidon perdent leur intégrité structurale et présentent une taille réduite (Anguita *et al.*, 2006). Ce traitement entraine ainsi une susceptibilité accrue vis-à-vis des α-amylases digestives, et par conséquent une augmentation de la digestibilité *in vitro* des amidons (Alonso *et al.*, 2000). À l'inverse, la formation de complexes amylose-lipides et d'interactions amidon-protéines liée au procédé peut aussi provoquer un ralentissement de cette même hydrolyse (Guha *et al.*, 1997). Mais, globalement, la cuisson-extrusion semble être l'un des procédés permettant d'augmenter au mieux la digestibilité des amidons (Alonso *et al.*, 2000).

Outre les traitements thermiques classiques et la cuisson-extrusion, les amidons peuvent subir un certain nombre d'autres traitements industriels visant à améliorer leurs propriétés. Les amidons de céréales subissent par exemple des traitements de dépelliculage, de trempage et de germination. Ces derniers, en entrainant l'élimination de l'acide phytique, des tannins et des polyphénols qui gênent l'action des α-amylases, permettent d'améliorer leur digestibilité (Rehman et Shah, 2005). De la même façon, la digestibilité de l'amidon d'amarante est améliorée par des traitements tels que la floconisation, la torréfaction ou l'extrusion (Capriles *et al.*, 2008).

L'assimilation de l'amidon peut aussi être améliorée grâce à un certain nombre de traitements thermiques domestiques : ces derniers, en provoquant la gélatinisation de l'amidon, favorisent en effet l'action des α-amylases digestives (Goñi *et al.*, 1997). L'effet de plusieurs types

de traitements thermiques (cuisson en four à micro-ondes, cuisson traditionnelle et cuisson à la vapeur) sur la vitesse d'hydrolyse et l'indice glycémique de différents amidons a ainsi été étudié (Singh *et al.*, 2010). La vitesse d'hydrolyse des amidons étudiés est plus rapide après cuisson, notamment dans le cas d'une cuisson micro-ondes. Cela s'explique par une pénétration plus importante de la chaleur au sein du produit : le changement du degré de susceptibilité de l'amidon vis-à-vis des amylases est en effet dépendant de la modification de sa structure cristalline (Anderson et Guraya, 2006).

Durant la gélatinisation de l'amidon, la structure cristalline de l'amylopectine se désintègre et la chaîne polysaccharidique prend une configuration qui entraine le gonflement et la rupture des granules (Singh *et al.*, 2007). Après refroidissement de l'amidon gélatinisé, une recristallisation des chaînes d'amidon apparait. L'agrégation et la recristallisation des chaînes d'amylose surviennent de manière complète quelques heures après cuisson. Ce mécanisme apparait beaucoup plus tardivement pour les chaînes d'amylopectine (Singh *et al.*, 2006, 2008). En effet, contrairement aux chaînes branchées de l'amylopectine, les chaînes linéaires d'amylose facilitent la réticulation via des liaisons hydrogènes. Les propriétés de rétrogradation de l'amidon sont aussi influencées par l'arrangement structural des chaînes d'amidon au niveau des régions amorphes et cristallines. Cet arrangement influence d'une part la rupture des granules et d'autre part les interactions se produisant durant le stockage d'un amidon gélatinisé (Lovedeep Kaur *et al.*, 2007). La formation d'amidon résistant après cuisson et stockage à température réfrigérée est largement influencée par l'importance de la rétrogradation. L'amylose rétrogradée issue du pois, du blé et de la pomme de terre est ainsi fortement résistante à l'hydrolyse enzymatique. De même, après cuisson et stockage à température réfrigérée, l'amidon de riz est moins digestible et son indice glycémique diminue (Frei *et al.*, 2003 ; Hu *et al.*, 2004). Le même phénomène est aussi observé avec l'amidon de pomme de terre : après deux jours de stockage à température réfrigérée, seuls 45 % de l'amidon sont considérés comme rapidement digestibles contre 95 % pour un amidon fraichement cuit (Mishra *et al.*, 2008). Globalement, la rétrogradation de l'amidon conduit à la formation de structures semi-cristallines résistantes à l'hydrolyse par les α-amylases (Singh *et al.*, 2010).

1.1.3.3. Les amidons modifiés

L'utilisation d'amidons natifs dans le domaine alimentaire est notamment limitée par son insolubilité à froid, sa tendance à perdre son pouvoir épaississant durant la cuisson et sa tendance à la rétrogradation. Les amidons modifiés, obtenus après traitement chimique et/ou physique d'amidons alimentaires dans le but de leur conférer des propriétés particulières, s'adaptent mieux

aux besoins technologiques des industriels agro-alimentaires. Les modifications chimiques des amidons incluent notamment la réticulation et la substitution de fonctions hydroxyles. De telles modifications altèrent profondément le comportement de l'amidon à la gélatinisation et à la rétrogradation (Singh *et al.*, 2007).

La réticulation des amidons consiste à renforcer les liaisons hydrogènes responsables de l'intégrité des granules par l'ajout de nouvelles liaisons (Wurzburg, 1973) (Figure 81).

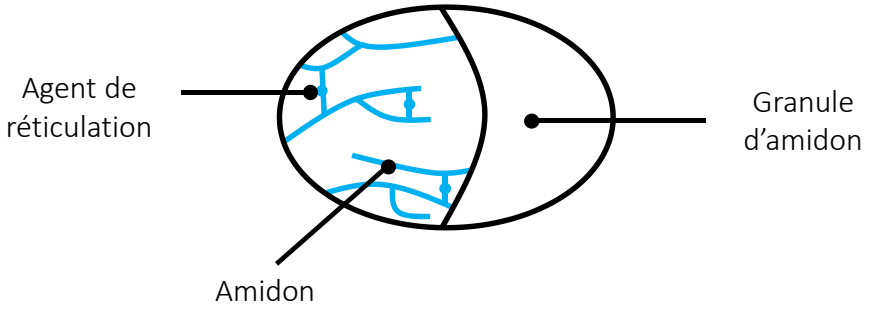


Figure 81 : Réticulation d'un granule d'amidon, adapté de Boursier (2005)

Les amidons réticulés ont été développés pour prévenir la rupture des granules lors de la cuisson et obtenir un empois très semblable à un microgel (Wurzburg, 2006). Le gonflement des granules réticulés a toujours lieu à une température proche de la température de gélatinisation de l'amidon natif, mais la solubilisation du contenu granulaire est très faible, voire absente. Selon la résistance recherchée, le nombre de réticulation est compris entre 1 pontage pour 300 unités de glucose et 1 pontage pour 3000 unités. Les amidons réticulés sont de plus en plus utilisés en industrie alimentaire comme épaississants, stabilisants et texturants. En plus de modifier les propriétés finales du produit, la réticulation facilite le process et le stockage (Wurzburg, 2006).

Le greffage de groupements acétate, phosphate ou hydroxypropyle sur les molécules d'amidon augmente les phénomènes de répulsion inter-chaînes (Figure 82).

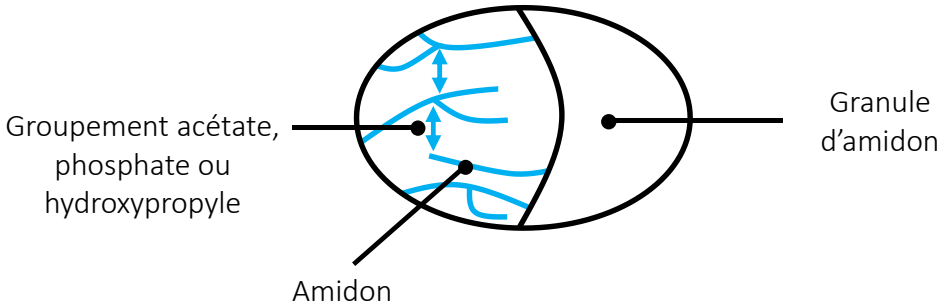


Figure 82 : Greffage de groupements acétate, phosphate ou hydroxypropyle sur un granule d'amidon, adapté de Boursier (2005)

Cela permet de minimiser, voire de supprimer la réassociation de ces molécules après cuisson, ce qui limite les phénomènes liés à la rétrogradation (augmentation de la viscosité, opacification au refroidissement, gélification, synérèse).

Des groupements hydrophobes (groupement octényl succiniques), peuvent aussi être greffés (par substitution d'autres groupements) sur une molécule d'amidon pour la rendre amphiphile (Figure 83). Cela permet de rendre l'amidon émulsifiant.

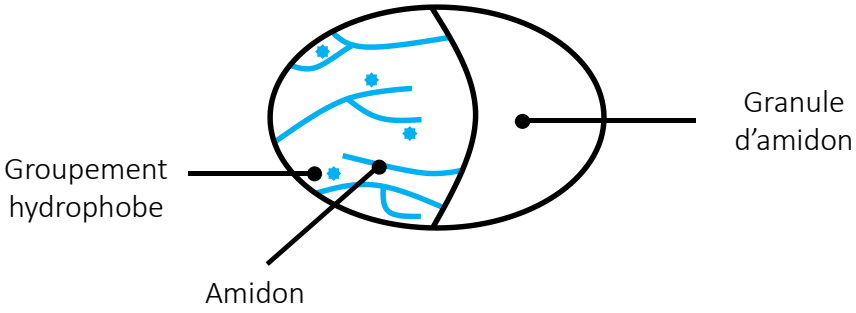


Figure 83 : Greffage de groupements hydrophobes sur un granule d'amidon, adapté de Boursier (2005)

Globalement, il semblerait que les modifications chimiques de l'amidon telles que les substitutions, les réticulations, les greffages de groupements tendent à limiter son hydrolyse enzymatique (Han et BeMiller, 2007). Mais ces observations varient en fonction des études. Par exemple, la substitution et l'oxydation de granules d'amidon de maïs contribuent à l'augmentation de la teneur en amidon résistant, tandis que la réticulation ne semble pas avoir d'effets significatifs (Chung *et al.*, 2008). Dans une autre étude, l'hydroxypropylation et la réticulation d'amidons cireux et non cireux ne présentent pas d'influence significative quant à leur teneur en amidon résistant et leur digestibilité *in vitro* (Hwang *et al.*, 2009). À l'inverse, certains dérivés d'amidon sont totalement ou partiellement non digestibles et sont d'ailleurs utilisés par l'industrie alimentaire comme substitut acalorique de matière grasse (Tharanathan, 2005). L'acétylation de l'amidon entraine aussi une amélioration de la satiété, ainsi que des propriétés glycémique et insulinémique d'un repas (Raben *et al.*, 1997).

1.1.3.4. La viscosité de la matrice alimentaire

La viscosité de la matrice alimentaire figure parmi les différents facteurs influençant la digestibilité de l'amidon et la réponse glycémique en résultant. Les gommes alimentaires, qui sont des polyosides non amylacés solubles dans l'eau, provoqueraient par exemple une réduction de la glycémie postprandiale après ingestion d'amidon (Kaur et Singh, 2009). Elles sont généralement utilisées comme agent épaississant, émulsifiant ou stabilisateur dans les produits à base d'amidon.

Chez le porc, l'addition au repas de gomme de guar entraine la diminution de l'absorption de glucose (Ellis *et al.*, 1995). Cet effet postprandial résulte de la capacité de la gomme à entrainer l'augmentation de la viscosité du digestat dans le tractus gastro-intestinal, du fait de l'expansion de ses chaînes hydratées. Ce phénomène diminue significativement la vitesse de digestion et d'absorption des glucides, et donc la glycémie postprandiale. Dans le même temps, en s'hydratant, la gomme entraine une baisse de la quantité d'eau nécessaire à la gélatinisation de l'amidon (Kaur *et al.*, 2008). Cela provoque une gélatinisation incomplète des granules d'amidon et donc une résistance accrue vis-à-vis de l'hydrolyse enzymatique. La gomme xanthane a par exemple démontré une activité inhibitrice sur la gélatinisation de l'amidon (Chaisawang et Suphantharika, 2005). Les gommes ont d'ailleurs une influence significative, même à de faibles concentrations (Singh *et al.*, 2010). Par exemple, l'addition d'une très faible concentration de galactomannane (0,5 %) entraine une inhibition significative des amylases digestives (Slaughter *et al.*, 2002).

L'augmentation de la viscosité du digestat peut aussi affecter les fonctions de motilité gastriques : la puissance propulsive et la force de mélange générées par les mouvements péristaltiques sont inhibées. Dans ces conditions, les interactions entre le substrat et les enzymes digestives sont moins fréquentes. Dans le même temps, la vitesse de transport des produits amylolytiques (maltose et dextrines notamment) à travers la muqueuse intestinale est ralentie en présence de gommes (Brennan *et al.*, 1996). Outre les gommes, certaines fibres visqueuses issues de céréales influencent également significativement la digestion et l'absorption des glucides. Du fait de leur différence structurale et fonctionnelle, la réponse postprandiale peut toutefois légèrement différer de celle observée pour les gommes (Singh *et al.*, 2010). Les gommes alimentaires pourraient aussi limiter la digestibilité de l'amidon en agissant comme une barrière physique. Cela a notamment été observé avec la gomme de guar et du pain blanc (Brennan *et al.*, 1996). L'influence de l'ajout d'alginate de sodium sur la digestibilité *in vitro* d'une pâte de riz a elle aussi été étudiée (Koh *et al.*, 2009). L'alginate forme un réseau continu dans lequel les granules d'amidon sont en suspension dans un gel homogène qui agit comme une barrière lorsque les enzymes tentent d'accéder à l'amidon.

1.1.3.5. La présence de protéines et de lipides dans la matrice alimentaire

La digestibilité de l'amidon et des protéines contenus dans des produits céréaliers est significativement influencée par les interactions existant entre ces deux composés. Les propriétés fonctionnelles de la matrice, y compris la digestibilité de l'amidon, sont même affectées par la présence de très petites quantités de protéines (Ezeogu *et al.*, 2008). Les fractions protéiques telles

que l'albumine, les globulines et les gluténines aident les protéines à se fixer sur le pourtour des granules d'amidon et jouent le rôle de barrière à la digestion de l'amidon. La présence d'une telle barrière a été mise en évidence par l'ajout de protéases à un produit contenant de l'amidon et des protéines : les protéases, en dégradant la membrane protéique, ont permis d'accroître la digestibilité *in vitro* de l'amidon (Rooney et Pflugfelder, 1986). En entrainant des changements conformationnels au niveau des protéines, et notamment la création de liaisons disulfures, certains traitements thermiques ou physiques tendent aussi à réduire la digestibilité de l'amidon (Oria *et al.*, 1995). La digestibilité de l'amidon peut d'ailleurs être améliorée par l'ajout d'un agent réducteur permettant de prévenir la formation de liaisons disulfures résistantes à l'hydrolyse enzymatique (Choi *et al.*, 2008). L'influence de ces interactions sur la digestibilité de l'amidon a notamment été étudiée sur de la farine de blé. Ainsi, la quantité d'interactions amylose/protéines modulerait la réponse glycémique et réduirait la digestibilité de l'amidon (Jenkins *et al.*, 1987). Grâce à un test à l'hydrogène, il a d'ailleurs été possible de mettre en évidence que 10 à 20 % de la farine était généralement malabsorbée (Liener, 1980). D'autres études ont d'ailleurs validé la présence d'amidon dans le côlon (Wolever *et al.*, 1986). Il a aussi été observé que l'élimination du gluten de la farine de blé supprimait la malabsorption de l'amidon mais que cet effet n'était pas réversible par ajout de gluten à une farine exempte de gluten (Jenkins *et al.*, 1987). La digestibilité *in vitro* de pain fabriqué à partir de farines sans gluten est meilleure que celle observée pour du pain classique. Cela confirmerait l'existence d'interactions naturelles entre amidon et protéines responsables de la diminution de la digestibilité de l'amidon.

La chaîne d'amylose de l'amidon présente une conformation hélicoïdale avec 6 unités d'anhydroglucose par tour (Zobel, 1988). Les groupements hydroxyles des résidus de glucose sont présents à la surface extérieure de l'hélice, tandis que la cavité interne est hydrophobe (Zhou *et al.*, 2007). Certains composés hydrophobes peuvent par conséquent se complexer à l'intérieur de la cavité via des liaisons de van der Waals (Godet *et al.*, 1993 ; Zhou *et al.*, 2007). L'effet de la présence d'acides gras libres (acides laurique, myristique, palmitique, stéarique et oléique) sur l'hydrolyse de l'amidon total, de l'amylopectine et de l'amylose a été étudié en utilisant une α-amylase et une amyloglucosidase (Crowe *et al.*, 2000). En l'absence d'acides gras, 60 % de l'amylose sont convertis en glucose en une heure contre 95 % au bout de 6 h. En présence d'acides laurique, myristique, palmitique et oléique, l'hydrolyse enzymatique est réduite de 35 %. L'acide stéarique n'a quant à lui aucun effet. En comparant ces résultats avec la digestibilité de l'amidon et de l'amylopectine, l'amylose semble être la fraction la plus sujette à inhibition. Elle peut en effet lier une molécule d'acide laurique par 20 unités de glucose, alors que très peu d'acide laurique se lie à l'amylopectine

dans les mêmes conditions (Crowe *et al.*, 2000). Les complexes entre les acides gras et l'amylose peuvent se former très rapidement en conditions physiologiques. Ils entrainent une modification du comportement de l'amidon et notamment une diminution de la solubilité, une augmentation de la température de gélatinisation, un retard à la rétrogradation et une augmentation de la résistance aux enzymes digestives (Crowe *et al.*, 2000).

1.1.3.6. La présence de facteurs antinutritionnels

La présence de fibres alimentaires a été considérée comme l'un des principaux facteurs influençant négativement la vitesse d'hydrolyse de l'amidon via l'augmentation de la viscosité du digestat et donc le ralentissement de la vidange gastrique. Pourtant, à teneur égale en fibres, certaines sources d'amidon (légumineuses notamment) sont digérées à des vitesses bien inférieures à d'autres (pain complet par exemple) (Jenkins *et al.*, 1980). Ces différences s'expliquent en partie par la présence de concentrations importantes en facteurs antinutritionnels tels que l'acide phytique, les lectines ou encore les inhibiteurs enzymatiques des légumineuses (Thorne *et al.*, 1983). Ces inhibiteurs forment un complexe avec les amylases, causant une réduction de la digestion de l'amidon. Ils sont généralement spécifiques à une α-amylase (Singh *et al.*, 2010). Les inhibiteurs et les lectines tendent à provoquer une hypoglycémie et à réduire la vitesse de croissance chez le rat (Thorne *et al.*, 1983). Bien que certains micro-organismes possèdent la capacité de produire de telles molécules, la plupart est sécrétée par des végétaux. Ainsi, les haricots, le seigle, le blé et l'avoine contiennent des inhibiteurs des amylases en quantités variées. Ces inhibiteurs sont pour la plupart actifs contre les amylases animales. Ainsi, ceux issus du blé sont inactifs vis-à-vis de ses amylases endogènes mais inhibent les α-amylases salivaires et pancréatiques (Lankisch *et al.*, 1998). Les inhibiteurs issus du haricot blanc réduisent quant à eux significativement le pic de glucose postprandial chez les sujets en bonne santé et les diabétiques de type 2 (Boivin *et al.*, 1988). De la même façon, certaines molécules de bas poids moléculaire dérivées de plantes (lutéoline, extraits de fraise, polyphénols de thé vert…) tendent à inhiber les α-amylases et à réduire l'hyperglycémie postprandiale (He *et al.*, 2007 ; McDougall *et al.*, 2005). L'acide phytique est l'un des principaux composés de réserve en phosphate chez les plantes. Il peut former des complexes avec les protéines (et donc avec les amylases) et/ou avec les ions métalliques (catalyseurs de l'activité des α-amylases). L'addition d'acide phytique après une pré-incubation en présence de salive entraine d'ailleurs une baisse significative de la libération de glucose (Yoon *et al.*, 1983). Mais certains traitements tendent à limiter l'action de ces inhibiteurs (Alonso *et al.*, 2000 ; Rehman et Shah, 2005). L'acide phytique est par exemple largement dénaturé après 72 h de

germination. La cuisson-extrusion, tout comme les traitements thermiques, peuvent aussi significativement diminuer la teneur en acide phytique, en tannins et en polyphénols (Rehman et Shah, 2005).

1.2. Résultats et discussion

Des amidons issus de différentes espèces botaniques et présentant par conséquent des propriétés physico-chimiques et thermiques variables ont été sélectionnés pour cette étude. Ces produits sont par ailleurs issus de végétaux riches en amidon et sont communément utilisés dans le secteur agro-alimentaire. Ainsi, les amidons de blé, de manioc, de maïs, de pomme de terre et de riz seront étudiés. Deux amidons cireux, issus de programme de sélection conventionnels, ont aussi été sélectionnés pour l'étude. Cette dernière consiste à comparer la digestibilité de ces différents amidons à l'état natif (formulations de type 1 et 2), après un traitement thermique (formulation de type 3) en four à micro-ondes et après un refroidissement durant 12 h à 4 °C (formulation de type 4). Bien que de nombreuses données existent dans la littérature, l'objectif de ce projet était de simuler précisément les conditions de la vie du produit industriel étudié.

1.2.1. Comparaison de la digestibilité des amidons natifs

Parmi les 4 formulations proposées par la société, deux d'entre elles sont consommées sans traitement thermique préalable. La digestibilité de différents amidons à l'état natif est par conséquent comparée.

1.2.1.1. Caractéristiques chimiques des amidons natifs

Pour rappel, certains constituants non amylacés tels que les protéines ou les lipides, en limitant l'accès aux amylases digestives et en bloquant leur site de liaison, tend à limiter la vitesse d'hydrolyse enzymatique de l'amidon. Ainsi, la teneur en protéines, en lipides et en minéraux a été déterminée pour chacune des 7 espèces botaniques sélectionnées. Les résultats sont présentés en Tableau 20.

Tableau 20 : Composition chimique des différents types d'amidon

Origine	Eau (%)	Lipides (%)	Protéines (%)	Glucides* (%)	Amidon (%)	Minéraux (%)
Blé	10,5 ± 0,1	< 0,01	0,02 ± 0,00	89,3 ± 0,1	80,5 ± 2,0	0,17 ± 0,01
Manioc	12,0 ± 1,6	< 0,01	< 0,01	87,8 ± 1,6	80,6 ± 0,6	0,17 ± 0,00
Maïs	10,4 ± 0,2	< 0,01	0,04 ± 0,01	89,5 ± 0,2	81,0 ± 0,0	0,08 ± 0,02
Maïs cireux	9,7 ± 0,0	< 0,01	0,02 ± 0,01	90,2 ± 0,0	83,6 ± 0,4	0,16 ± 0,01
Pomme de terre	13,4 ± 0,2	< 0,01	< 0,01	86,6 ± 0,2	80,8 ± 1,4	0,29 ± 0,01
Riz	10,0 ± 0,1	< 0,01	0,04 ± 0,01	89,7 ± 0,1	80,1 ± 0,2	0,27 ± 0,03
Riz cireux	10,6 ± 0,6	< 0,01	0,02 ± 0,01	89,3 ± 0,6	79,5 ± 1,5	0,12 ± 0,01

*Dont amidon

D'après le Tableau 20, la teneur en lipides des différents amidons est inférieure à 0,01 %. Il est donc peu probable que la digestion soit ralentie par la présence d'acides gras libres ou de phospholipides. De la même façon, la teneur en protéines des amidons est particulièrement faible : le riz, qui présente la teneur en protéines la plus élevée, en est constitué d'environ 0,045 %. Là encore, il est peu probable qu'une quantité aussi faible de protéines puisse jouer un rôle significatif dans la digestion des amidons. Et quand bien même ce serait le cas, les amidons ne présentent pas des teneurs en amidons et en protéines significativement différentes. D'autre part, tous les échantillons étudiés présentent des teneurs en amidon très proches, comprises entre 79,5 % (amidon de riz cireux) et 83,6 % (amidon de maïs cireux).

La vitesse d'hydrolyse de l'amidon est aussi influencée par le ratio amylose/amylopectine des granules. Pour rappel, la structure hautement branchée de l'amylopectine la rend plus sujette à l'hydrolyse enzymatique et en fait un substrat préférentiel des amylases digestives (Hoover et Zhou, 2003 ; Thorne *et al.*, 1983). Les teneurs en amylose et en amylopectine sont présentées dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Teneur en amylose et en amylopectine des différents amidons

	Amylopectine (%)	Amylose (%)
Blé	73	27
Maïs	77	23
Maïs cireux	95	5
Manioc	73	27
Pomme de terre	78	22
Riz	80	20
Riz cireux	95	5

D'après le Tableau 21, l'amidon de blé et de manioc présentent la teneur en amylopectine la plus faible (73 %). Les amidons de maïs, de pomme de terre et de riz sont quant à eux composés de 77 à 80 % d'amylopectine. Enfin, les amidons cireux présentent une teneur particulièrement élevée, proche de 95 %. Ces résultats sont en adéquation avec ceux de la littérature (Boursier, 2005 ; Jane *et al.*, 1999). Ainsi, au regard des résultats, la vitesse d'hydrolyse enzymatique des amidons cireux pourrait être significativement plus rapide que celle des autres amidons.

Le dernier paramètre lié à la composition de l'amidon et influençant la digestibilité de l'amidon correspond à sa teneur en amidon résistant. En effet, une partie de l'amidon ingéré peut être résistant aux enzymes digestives. N'étant pas dégradé dans l'intestin grêle, il n'est pas absorbé au niveau de la muqueuse intestinale et rejoint alors le côlon. Il y est fermenté par les bactéries

commensales. Dans le cas de granules natifs, il s'agit d'amidon résistant de type 2. Les granules sont compacts et structurés d'une manière qui empêche les enzymes digestives d'agir. La teneur en amidon résistant des différents types d'amidon sont présentés en Tableau 22.

Tableau 22 : Teneur en amidon résistant des différents amidons

	Amidon résistant (%)
Blé	0,4 ± 0,1
Maïs	2,6 ± 0,9
Maïs cireux	1,2 ± 0,0
Manioc	2,3 ± 0,5
Pomme de terre	49,0 ± 2,2
Riz	0,7 ± 0,1
Riz cireux	0,6 ± 0,4

D'après le Tableau 22, la plupart des amidons natifs étudiés (blé, maïs, maïs cireux, manioc, riz et riz cireux) présentent des teneurs relativement faibles en amidon résistant. Ces dernières sont comprises entre 0,4 et 2,6 %. À l'inverse, l'amidon de pomme de terre natif est particulièrement résistant à l'hydrolyse enzymatique puisqu'il présente quant à lui une teneur de 49 %. Ces observations sont en accord avec celles de la littérature : les granules d'amidon de pomme de terre, compacts et structurés d'une manière qui empêche les enzymes digestives d'agir, sont connus pour être particulièrement résistants à l'hydrolyse enzymatique.

Globalement, au regard des différentes données liées à la composition des amidons, il est possible de supposer que les amidons de maïs cireux et de riz cireux, très riches en amylopectine, seront plus rapidement dégradés enzymatiquement, et donc assimilés, que les autres. Excepté l'amidon de pomme de terre, tous les amidons étudiés seront cependant probablement hydrolysés et assimilés avant leur arrivée dans le côlon. En ce qui concerne l'amidon de pomme de terre, seulement 50 % seront potentiellement assimilés sous forme de glucose.

1.2.1.2. Caractéristiques physiques des amidons natifs

La taille, la forme et l'aspect de surface des particules sont d'autres paramètres pouvant influencer la digestibilité d'amidons natifs. En effet, les particules présentant un plus gros diamètre ou une surface très lisse et sphérique possèdent une surface spécifique plus faible, ce qui limite l'accès des enzymes à l'intérieur du granule. Dans le même temps, la présence d'orifices à la surface des granules d'amidon facilite l'entrée des amylases durant la digestion. Ainsi, pour évaluer ces caractéristiques, les granules d'amidon ont été analysés par granulométrie laser (Figure 84), par

granulomorphométrie (Figure 85 et Figure 86) et par microscopie électronique à balayage (Figure 87).

D'après la Figure 84, les granules d'amidon des différentes espèces présentent des diamètres compris entre 2 et 200 µm. La plupart des distributions sont monomodales : seules celles du riz et du riz cireux font exception. Ces deux espèces d'amidon présentent par ailleurs le diamètre nominal (D10) le plus faible : il est proche de 5 µm. Leur diamètre médian (D50), compris entre 15 et 20 µm, est plus élevé que celui des amidons de maïs et de maïs cireux, qui sont respectivement de 15,8 et 14,6 µm. Les granules d'amidon de manioc, tout comme ceux de blé, présentent quant à eux un diamètre médian légèrement supérieur à celui des amidons de maïs et de maïs cireux : il est proche de 20 µm. Enfin, les granules d'amidon de pomme de terre présentent un diamètre significativement plus important que les autres granules : leur diamètre nominal est proche de 20 µm, tandis que leur diamètre médian est proche de 40 µm. Ces observations sont globalement en accord avec la littérature (Boursier, 2005 ; Dhital *et al.*, 2010 ; Jane *et al.*, 1994 ; Wilson *et al.*, 2006). Seuls les granules de riz et de riz cireux sont généralement d'un diamètre moindre que celui observé en Figure 84 (Devi *et al.*, 2009 ; Kim *et al.*, 2008). Ce diamètre particulièrement important, ainsi que la répartition non monomodales, pourraient donc s'expliquer par une agrégation des granules. Globalement, d'après la granulométrie des granules, ceux d'amidon de pomme de terre pourraient être hydrolysés significativement plus lentement que les autres.

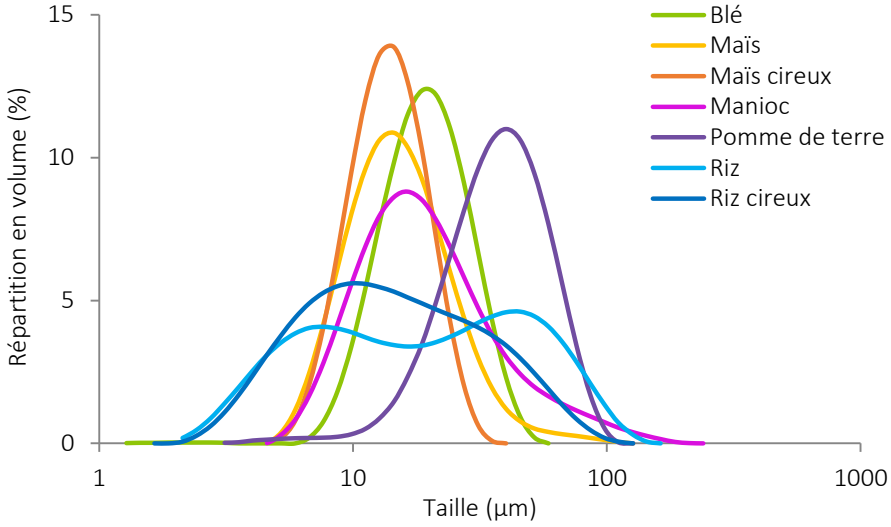


Figure 84 : Répartition de taille (en volume) des granules d'amidon

D'après la Figure 85, la sphéricité des granules d'amidon des différentes espèces est comprise entre 0,75 et 0,85. Globalement, la sphéricité est stable. Entre les différentes espèces, assez peu de différences sont observées. Les granules d'amidon de pomme de terre ayant un diamètre compris entre 20 et 60 µm présentent une sphéricité supérieure à celle des autres

espèces botaniques. À l'inverse, dans cette même gamme de taille, les granules d'amidon de maïs cireux présentent une sphéricité moindre que la plupart des autres amidons. Pour des diamètres inférieurs et supérieurs, les différentes sources présentent une sphéricité très similaire. Ainsi, à la vue des résultats, il est peu probable que la forme des granules des 7 espèces étudiées ait un impact significatif sur la vitesse de leur hydrolyse.

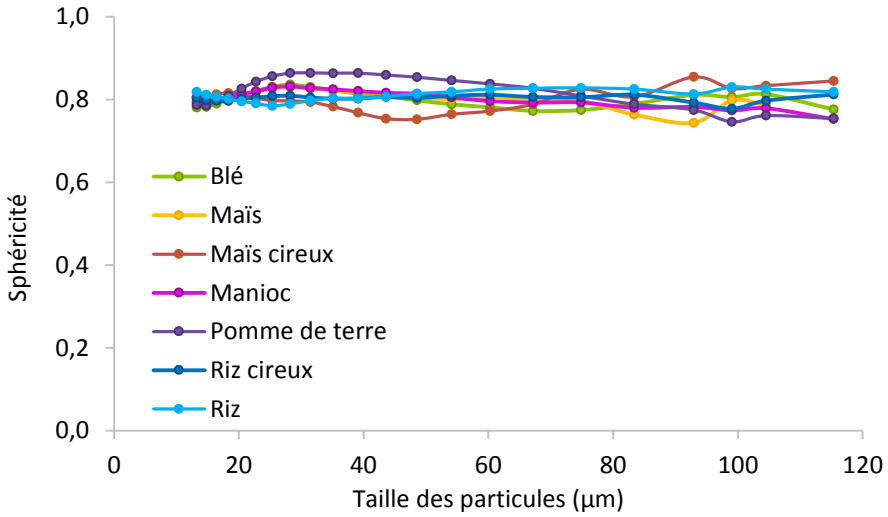


Figure 85 : Sphéricité des granules d'amidon en fonction de leur taille

D'après la Figure 86, la convexité des granules est comprise entre 0,75 et 1. Elle présente grossièrement la même évolution que la sphéricité : pour des diamètres compris entre 15 et 30 µm, les granules gagnent en convexité jusqu'à atteindre une valeur stable à partir de 140 µm.

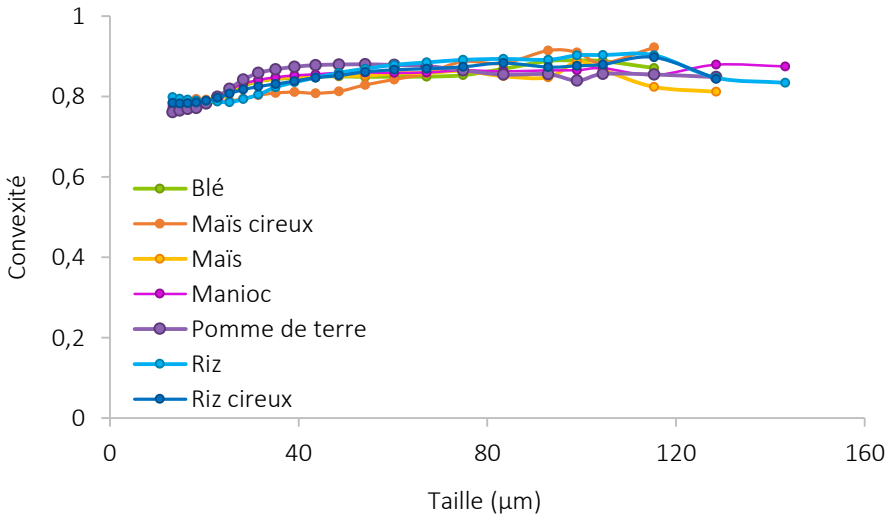


Figure 86 : Convexité des granules d'amidon en fonction de leur taille

De même que pour la sphéricité, peu de différences sont observées entre les différentes espèces. Une fois encore, les granules d'amidon de pomme de terre semblent plus convexes que ceux des autres espèces, tandis que les granules de maïs cireux semblent moins convexes que les

autres. Mais globalement, assez peu de différences sont observables. La convexité des granules ne devrait donc pas nécessairement jouer un rôle significatif sur la vitesse de leur hydrolyse.

Les observations des granules d'amidon par MEB nous permettent d'évaluer visuellement leur taille, leur forme (Figure 87), ainsi que l'aspect de leur surface (Figure 88).

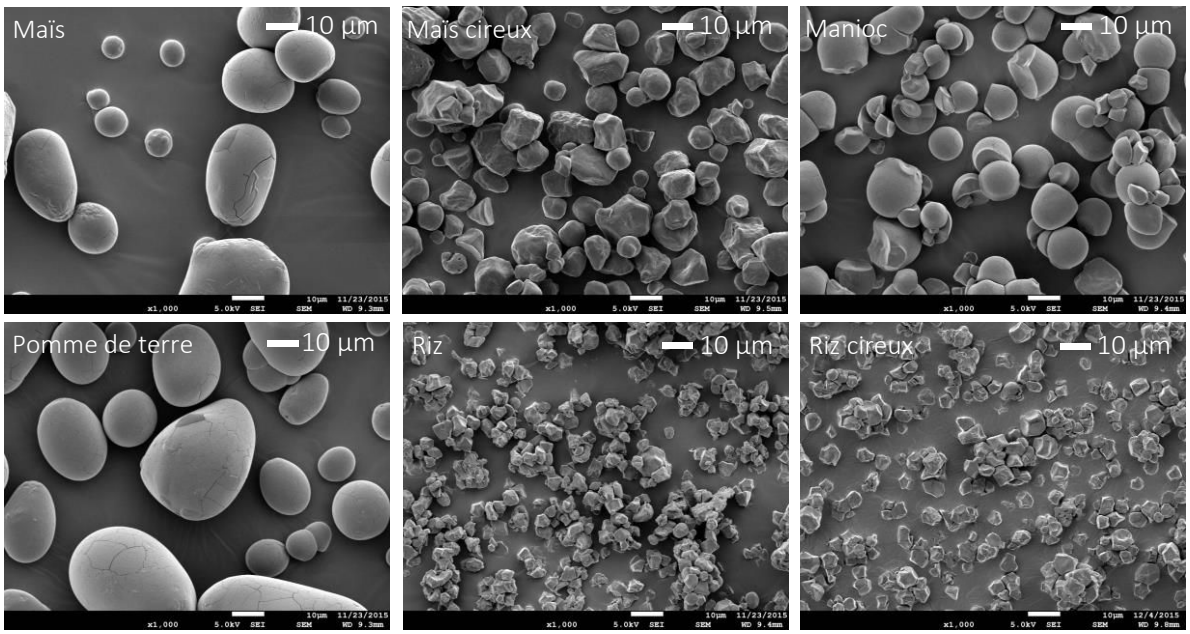


Figure 87 : MEB des granules d'amidon (grossissement x 1000)

Ainsi, les observations sont proches de celles réalisées en granulométrie et granulomorphométrie. En termes de taille, les amidons de riz et de riz cireux présentent des granules de très petites tailles, avec un diamètre généralement inférieur à 10 µm. Mais pour ces deux variétés, la présence d'agrégats est largement observable sur les images. Cela expliquerait donc bien leur répartition non monomodale, ainsi que la valeur élevée de leur diamètre médian (Figure 84). Le maïs, le maïs cireux et le manioc présentent quant à eux une taille comparable, tandis que la pomme de terre présente un diamètre légèrement plus important. Ces observations sont en accord avec les données obtenues grâce au granulomètre laser (Figure 84). D'après les images, les granules d'amidon de riz et de riz cireux semblent présenter une sphéricité et une convexité significativement moindre que celles de pomme de terre ou de manioc. Ainsi, les amidons de riz, de riz cireux et de maïs cireux, du fait de leur taille et de leur forme, pourraient être plus facilement attaquables enzymatiquement par les α-amylases salivaires et pancréatiques. Un autre paramètre physique joue aussi un rôle dans la facilité d'hydrolyser un granule d'amidon : il s'agit de l'aspect de la surface. Pour rappel, les granules natifs dépourvus de pores ou cavités et présentant une surface très lisse, sont connus pour être particulièrement résistants à l'hydrolyse enzymatique. La Figure 88 présente l'aspect de surface des différents granules. D'après les images MEB, l'amidon

de maïs cireux présente des pores, tandis que celui de maïs présente certains nodules. Seules des craquelures sont observables pour les autres sources botaniques. Mais ces observations sont en accord avec la littérature puisque seuls les amidons de céréales présentent de réelles cavités (Dreher *et al.*, 1984).

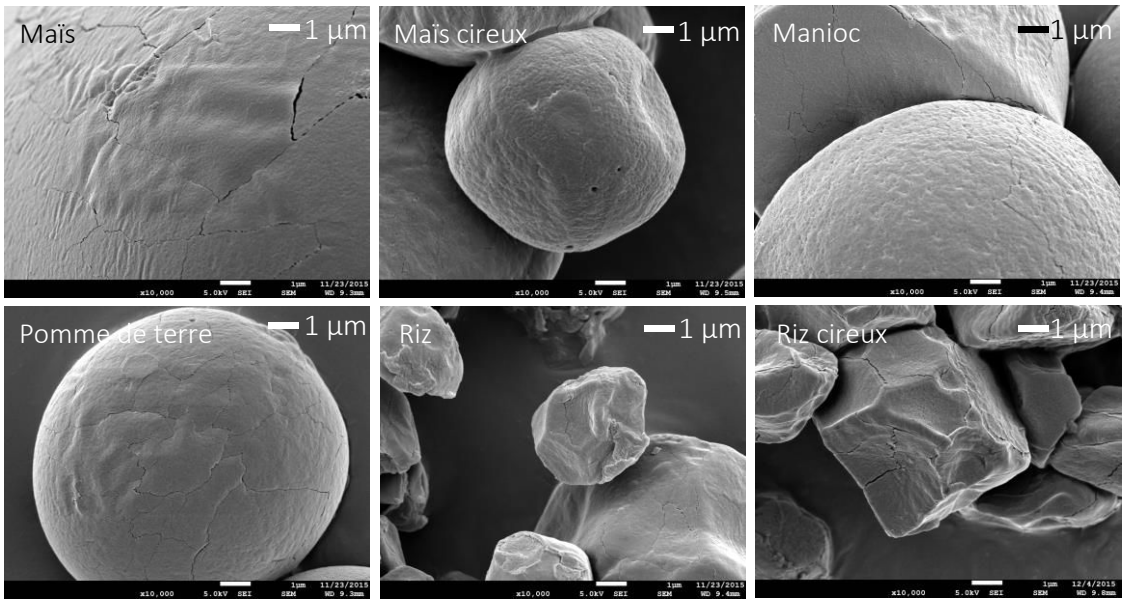


Figure 88 : Observation par MEB des granules d'amidon (grossissement x 10000)

D'après les différentes caractéristiques physiques étudiées pour les 7 sources botaniques d'amidon, certaines semblent plus enclines à l'hydrolyse enzymatique. Les granules d'amidon de riz et de riz cireux présentent par exemple un diamètre particulièrement faible et une géométrie anguleuse. Cela entraine l'augmentation du ratio surface/volume et rend l'hydrolyse enzymatique plus aisée et donc plus rapide. À l'inverse, les granules d'amidon de pomme de terre présentent un diamètre particulièrement élevé ainsi qu'une forme plutôt arrondie et une surface très lisse. Leur ratio surface/volume est alors moindre et leur propension à être rapidement hydrolysé aussi. Enfin, les amidons de maïs, de maïs cireux et de manioc semblent présenter des caractéristiques intermédiaires : leur diamètre est compris entre celui de l'amidon de riz et de l'amidon de pomme de terre. D'après les images MEB, la forme des amidons de maïs cireux et de manioc semblent aussi intermédiaire. La forme de l'amidon de maïs se rapproche quant à elle plutôt de celle de l'amidon de pomme de terre.

1.2.1.3. Digestibilité des amidons natifs

L'étude des caractéristiques chimiques et physiques des différents amidons a permis la formulation de premières hypothèses quant à leur digestibilité. Globalement, l'amidon de riz cireux pourrait être digéré très rapidement : il est riche en amylopectine (95 %), pauvre en amidon

résistant (0,6 %), présente un diamètre réduit et une forme anguleuse qui augmentent son ratio surface/volume. Mise à part la forme anguleuse, les observations sont similaires pour l'amidon de maïs cireux. Ce dernier présente en plus des cavités qui pourraient faciliter l'hydrolyse enzymatique. L'amidon de pomme de terre présente une teneur élevée en amidon résistant (49 %), un diamètre particulièrement important, une forme arrondie et une surface lisse : sa digestion pourra être particulièrement lente et incomplète. Les amidons de blé, de maïs, de manioc et de riz pourraient quant à eux présenter des profils de digestion intermédiaires à celui du riz cireux et de la pomme de terre. Leur teneur en amidon résistant est presque nulle, mais leur teneur élevée en amylose, leur diamètre plus important et leur surface relativement lisse pourraient les rendre moins propices à la digestion enzymatique que l'amidon de riz cireux.

Pour valider ces hypothèses, la digestibilité des amidons natifs a été étudiée selon la méthode de Englyst *et al.* (2011). Cette dernière permet de caractériser les amidons en fonction de la rapidité de leur hydrolyse enzymatique. La teneur en amidon rapidement digestible (ARD), en amidon lentement digestible (ALD) et en amidon résistant (AR) est déterminée. Ces fractions correspondent respectivement à la part d'amidon hydrolysée au bout de 20 min de digestion, entre 20 et 120 min de digestion et non hydrolysée aux termes de 120 min. Les résultats sont présentés en Figure 89.

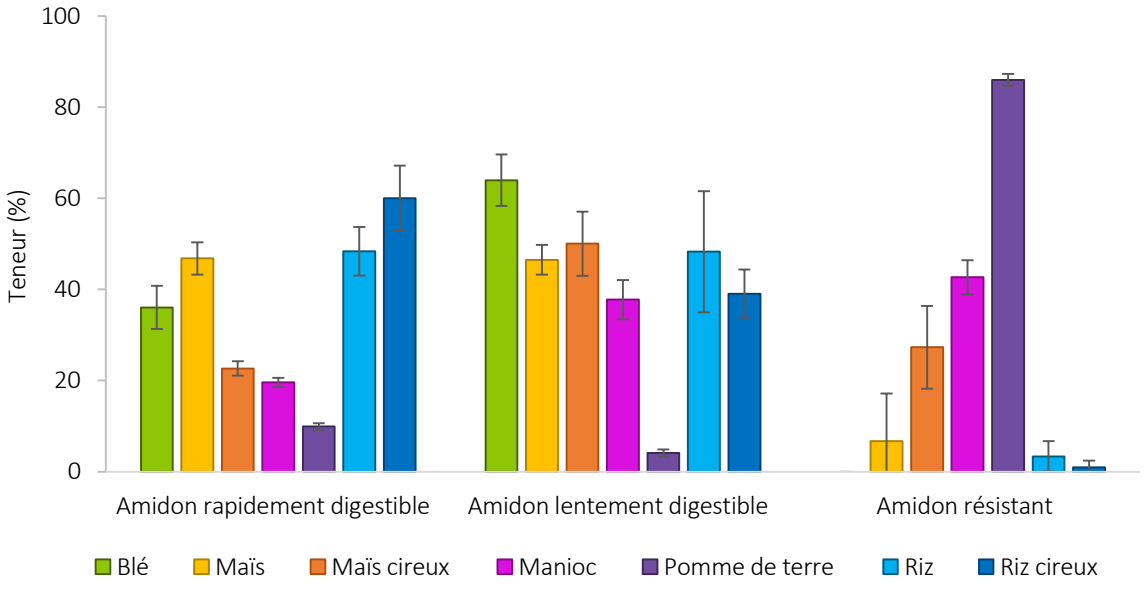


Figure 89 : Digestibilité *in vitro* des différentes sources d'amidon à l'état natif

D'après la Figure 89, l'amidon de pomme de terre présente les teneurs en amidon rapidement et lentement digestibles les plus faibles (respectivement 10 et 4 %). Sa teneur en amidon résistant (86 %) est par conséquent significativement plus importante que les autres

sources. L'ordre de grandeur des teneurs en ARD, ALD et AR sont confirmées par d'autres auteurs (Adeleye *et al.*, 2014 ; Kim et Huber, 2013 ; Mishra *et al.*, 2008). Ces observations sont aussi en accord avec les hypothèses formulées dans le paragraphe précédent : cet amidon présentant un diamètre important, une forme sphérique, une surface très lisse, il est peu sensible à l'hydrolyse enzymatique. Outre les aspects de taille et de forme, les granules d'amidon de pomme de terre sont connus pour être agencés de manière compacte et sont relativement peu hydratés. Cela en fait des granules riches en amidon résistant de type 2 (Sajilata *et al.*, 2006).

L'amidon de manioc présente, après l'amidon de pomme de terre, les valeurs d'ARD (environ 19 %) et d'ALD (environ 38 %) les plus faibles et la valeur d'AR la plus élevée (43 %). En tenant compte de la taille (inférieure à celle de l'amidon de pomme de terre), de la forme (relativement sphérique) et de l'aspect de surface (lisse) des granules d'amidon de manioc, les résultats de digestibilité obtenus paraissent tout à fait cohérents. Ces granules d'amidon sont aussi particulièrement riches en amylose, ce qui ralentit l'action des enzymes hydrolytiques et pourrait expliquer la faible teneur d'ARD et d'ALD. Dans la littérature, assez peu d'études se sont intéressées aux teneurs en ARD, ALD et AR de l'amidon de manioc mais elles ont permis de montrer que ce type d'amidon présente généralement des valeurs d'ARD plus élevées, aux alentours de 80 %, et des valeurs d'ALD et d'AR plus faibles, respectivement proches de 20 et 2 % (Mei *et al.*, 2015 ; Remya et Jyothi, 2015). Mais les protocoles de digestibilité utilisés dans ces études ne sont pas identiques à celui d'Englyst *et al.* (1992), ce qui pourrait expliquer cette différence.

Les deux amidons de maïs étudiés (cireux et non cireux) présentent une digestibilité assez différente. Le comportement de l'amidon de maïs cireux se rapproche plutôt de celui de l'amidon de manioc. Ses teneurs en ARD, ALD et AR sont respectivement de 23, 50 et 27 %. L'amidon de maïs non cireux présente quant à lui une teneur en ARD largement supérieure (47 %), une teneur en ALD similaire (46 %) et une teneur en AR plus faible (environ 7 %). Son comportement se rapproche ainsi plutôt de celui des amidons de blé ou de riz, digérés plus rapidement. Pourtant, d'après l'étude des propriétés physico-chimiques des différents amidons natifs, il a été mis en évidence que l'amidon de maïs cireux présentait des granules de plus petites tailles et moins sphériques que l'amidon de maïs, ainsi qu'une teneur en amylopectine largement supérieure. Or, théoriquement, ces propriétés tendent à faire augmenter la digestibilité en facilitant l'action des enzymes. Mais d'autres paramètres, notamment liés au procédé d'extraction de l'amidon, peuvent jouer un rôle non négligeable sur la digestibilité et expliquer ces différences. Dans la littérature, ces mêmes

valeurs sont retrouvées pour les deux types d'amidon (Chung *et al.*, 2008, 2009 ; Koo *et al.*, 2010 ; Miao *et al.*, 2011).

Les deux amidons de riz étudiés, non cireux et cireux, présentent une digestibilité relativement semblable : leur teneur en ARD est particulièrement élevée (respectivement 48 et 60 %), leur teneur en ALD est modérée (respectivement 48 et 39 %), tandis que leur teneur en AR est quasiment nulle. Globalement, ces résultats sont en accord avec les observations précédentes : de par sa petite taille et de sa forme convexe, l'amidon de riz est plus rapidement digéré que la plupart des autres amidons. L'amidon de riz cireux, probablement du fait de sa teneur plus importante en amylopectine, présente tout de même une meilleure digestibilité que l'amidon de riz non cireux. Ces mêmes résultats ont été obtenus par d'autres auteurs (Chung *et al.*, 2006, 2011 ; Zhu *et al.*, 2011).

Enfin, l'amidon de blé présente une teneur en ARD moyenne (36 %) et une teneur élevée en ALD (64 %). Il ne présente par ailleurs aucune part d'amidon résistant. Ces données sont en accord avec ses propriétés physico-chimiques : l'amidon de blé présente un diamètre plutôt faible, une convexité et une sphéricité moyenne et une teneur en amidon résistant quasiment nulle (0,4 %). Ces données sont par ailleurs en accord avec celles d'autres auteurs (Zhang *et al.*, 2006).

Ainsi, d'après les résultats obtenus, les amidons de riz cireux, de riz, de maïs et de blé présentent des valeurs d'amidon rapidement digestible particulièrement élevées (supérieures à 36 %). À l'inverse, les amidons de maïs cireux, de manioc et de pomme de terre présentent des valeurs plus basses (inférieures à 23 %). Or, Englyst *et al.* (1999) ont démontré que la teneur en glucose rapidement digestible (qui correspond à la part de glucose libérée au bout de 20 min) est positivement corrélée à la réponse glycémique. Parallèlement à cela, il semblerait que les régimes alimentaires à indices glycémiques élevés, qui entrainent une augmentation de la glycémie et des réponses insuliniques, seraient préjudiciables à la santé. En effet, ces derniers seraient reliés à l'apparition de diabète, de maladies cardio-vasculaires et d'obésité. Ainsi, pour la formulation de produits alimentaires, il sera préférable de privilégier les amidons présentant de faibles valeurs d'ARD.

D'après certaines études, l'incorporation d'amidon lentement digestible dans les formulations alimentaires serait plus souhaitable que celle d'amidon rapidement digestible. Globalement, d'après les résultats obtenus, il semble que les amidons de céréales et ceux issus de tubercules présentent un comportement différent lors de la digestion : les amidons de céréales présentent une part d'ALD plus importante. Cette observation pourrait s'expliquer par leur

différence de structure moléculaire : les amidons de céréales présentent une structure cristalline de type A, tandis que les fécules présentent une structure de type B. Or, les chaînes d'amylopectine de type A sont généralement plus longues mais moins nombreuses que celles de type B. Ainsi, les cristallites de type B possèdent des clusters ayant un degré de polymérisation plus important, moins de chaînes et moins de lamelles branchées amorphes. Les structures cristallines de type A présentent aussi des imperfections liées à leurs chaînes très courtes (DP < 10) qui entrainent la formation de doubles hélices peu stables (Zhang, Venkatachalam, *et al.*, 2006). Ainsi, les amidons de céréales, mais aussi la fécule de manioc, permettraient l'obtention d'un produit riche en ALD.

La teneur en AR des différents amidons est elle aussi particulièrement importante : elle module leur digestibilité globale. Or, les résultats obtenus par la méthode d'Englyst et al. (1992) (Figure 89) diffèrent grandement de ceux obtenus par la méthode de McCleary et Monaghan (2002) (Tableau 22). Cela s'explique aisément par de nombreuses différences entre les protocoles expérimentaux, et notamment par la durée d'incubation de l'amidon en présence d'α-amylase et d'amyloglucosidase : alors qu'elle est de 120 min pour la méthode d'Englyst et al. (1992), elle est de 16 h pour la méthode de McCleary et Monaghan (2002). Aussi, il semblerait que la seconde méthode permette d'obtenir des résultats plus proches de l'*in vivo* que les autres méthodes jusqu'alors développées pour étudier la digestibilité. Il est donc probable que les données présentées dans le Tableau 22 correspondent bien à la teneur en amidon résistant des échantillons, tandis que celles de la Figure 89 engloberaient l'amidon résistant et une partie d'amidon non-résistant mais très lentement hydrolysé (après 120 min). Ainsi, seul l'amidon de pomme de terre présente une teneur significative en amidon résistant, les autres sources d'amidon présentent des valeurs comprises entre 0,4 et 2,6 %. Selon la définition donnée ci-dessus, les amidons de manioc et de maïs cireux présenteraient quant à eux une teneur relativement élevée en amidon « très lentement digestible ». Respectivement, cette dernière serait de 40 et 26 %. Les amidons de riz présentent quant à eux une teneur quasiment nulle.

1.2.1.4. Conclusion

D'après les propriétés physico-chimiques et la digestibilité des différentes sources d'amidon à l'état natif, certaines paraissent plus appropriées à la formulation de produits alimentaires que d'autres. Pour rappel, l'objectif est de sélectionner un amidon natif présentant une digestibilité totale (teneur nulle en amidon résistant) mais lente. D'après les résultats obtenus précédemment, l'amidon de pomme de terre, du fait de sa teneur importante en amidon résistant, ne pourra pas être utilisé. Les amidons de riz (cireux ou non), bien qu'exempts d'amidon résistant, tendent à être

trop rapidement digérés (ARD) pour être retenus : leur indice glycémique serait trop élevé pour un aliment « santé ». Il en est d'ailleurs de même pour les amidons de blé et de maïs étudiés. Ainsi, d'après notre étude, **les amidons les mieux adaptés à la formulation de nos produits de types 1 et 2 sont les amidons de manioc et de maïs cireux.**

1.2.2. Comparaison de la digestibilité des amidons après traitement thermique

En milieu fortement hydraté et à une température au moins supérieure à 50 °C, les granules d'amidon absorbent de l'eau dans leurs zones amorphes, ce qui provoque la rupture de leurs liaisons hydrogènes, leur gonflement et leur déstructuration. La suspension ainsi obtenue est très peu résistante à l'hydrolyse enzymatique des amylases, donc facilement digérée. La formulation industrielle de type 3 subissant un traitement thermique avant consommation, l'amidon pourrait subir une gélatinisation et la digestibilité pourrait ainsi être facilitée. Dans un premier temps, la température de gélatinisation des différents amidons est mesurée par deux méthodes analytiques et dans un second temps, la digestibilité des amidons après traitement thermique est étudiée.

1.2.2.1. Mise en évidence de la température de gélatinisation

Plusieurs techniques analytiques sont couramment utilisées pour mettre en évidence les paramètres de gélatinisation de l'amidon. L'une des plus courantes reste la calorimétrie différentielle à balayage qui permet de déterminer la température de début de gélatinisation, la température du pic de gélatinisation, la température de fin de gélatinisation, ainsi que l'enthalpie de gélatinisation. Elle permet aussi de mettre en évidence le degré de rétrogradation de l'amidon après refroidissement. Pour notre application, l'un de ses seuls inconvénients réside dans le fait qu'elle nécessite le recours à une suspension très concentrée en amidon : entre 20 et 80 % (m/m). Cela ne reflète pas la concentration de notre produit final, qui se situe aux alentours de 2,5 %. Or, la concentration pourrait légèrement influencer les valeurs des paramètres de gélatinisation. C'est la raison pour laquelle des mesures rhéologiques sont effectuées en parallèle : ces dernières, qui peuvent être réalisées à une concentration de 2,5 %, permettront de vérifier l'ordre de grandeur des données obtenues par calorimétrie différentielle à balayage.

Ainsi, dans un premier temps, la température de gélatinisation de l'amidon a été déterminée par mesures rhéologiques. Pour cela, le module élastique de stockage (G'), le module visqueux de perte (G''), ainsi que l'angle de phase (δ) ont été suivis sur une plage de température comprise entre 30 et 90 °C. Un graphique, présentant les modules élastiques et visqueux, ainsi que

l'angle de phase en fonction de la température est ensuite réalisé pour chacune des sources botaniques d'amidon. Un exemple est donné en Figure 90.

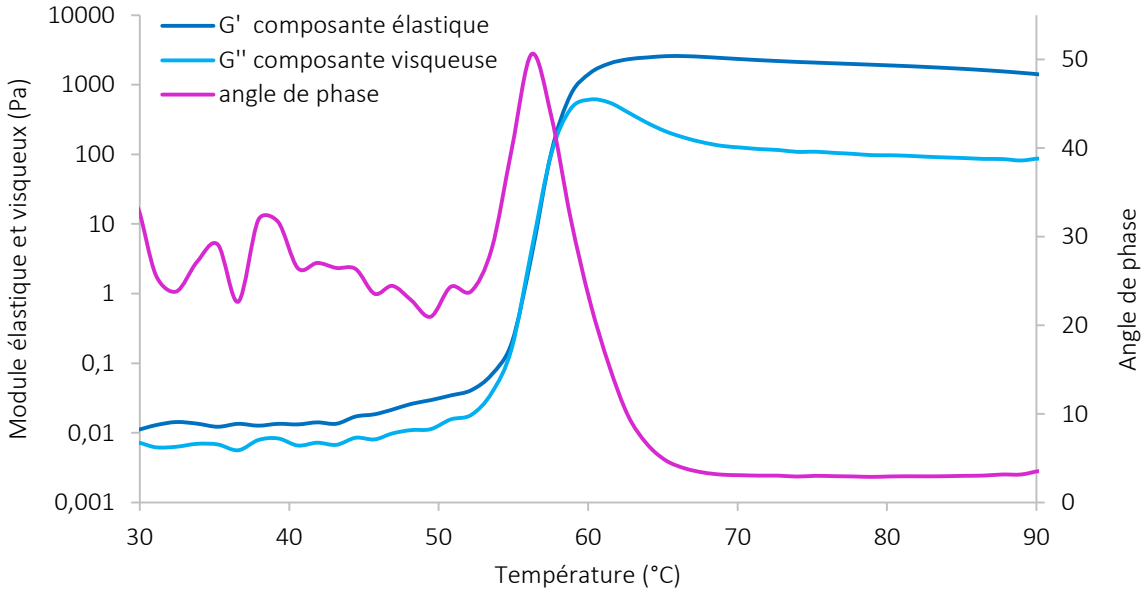


Figure 90 : Paramètres rhéologiques obtenus pour l'amidon de blé

Sur une plage de température donnée (plage de gélatinisation), les granules d'amidon gonflent très rapidement pour atteindre plusieurs fois leur taille initiale et perdre leur structure semi-cristalline. Tous les grains d'une suspension seront gonflés sur un intervalle de température de l'ordre de 5 à 10 °C. Un réseau tridimensionnel, composé des grains gonflés (qui forment une phase dispersée) et de molécules dispersées (amylose principalement) qui épaississent la phase continue aqueuse, est alors formé. La viscosité maximale de la suspension est ainsi atteinte. Si le traitement thermique se poursuit au-delà de la plage de gélatinisation, les grains éclatent, le matériel se disperse dans le milieu et entraine une diminution de la viscosité. Ainsi, le module élastique de stockage, qui mesure l'énergie disspée dans le matériau, ainsi que le module visqueux de perte, qui mesure l'énergie dissipé durant le traitement thermique, vont commencer à croître lors du début du gonflement des granules. Ces deux paramètres vont atteindre leur maximum lorsque l'intégralité des granules de la suspension sont gonflés. Ils subiront par la suite une diminution progressive lors de la destructuration du gel par augmentation de la température.

Ainsi, à partir de la Figure 90, il est aisé de déterminer la température de gélatinisation de l'amidon de blé : cette dernière correspond à l'intersection entre les courbes de la composante élastique et de la composante visqueuse. Elle est donc comprise entre 56 et 57 °C. La température de gélatinisation des différents amidons, déterminée selon la méthode détaillée ci-dessus, est

donnée en Tableau 23. Ces valeurs seront comparées à celles obtenues par calorimétrie différentielle à balayage.

Tableau 23 : Température de gélatinisation des amidons déterminée par rhéologie

	Température de gélatinisation (°C)
Blé	56,2
Maïs	68,5
Maïs cireux	70,0
Manioc	64,0
Pomme de terre	62,0
Riz	67,5
Riz cireux	65,0

Dans un second temps, le comportement thermique des sept sources d'amidon a donc été étudié par calorimétrie différentielle à balayage en présence d'un excès d'eau (25 % d'amidon (m/m)), de 30 à 90 °C. Un thermogramme est ainsi obtenu pour chacun des échantillons. Un exemple est donné en Figure 91.

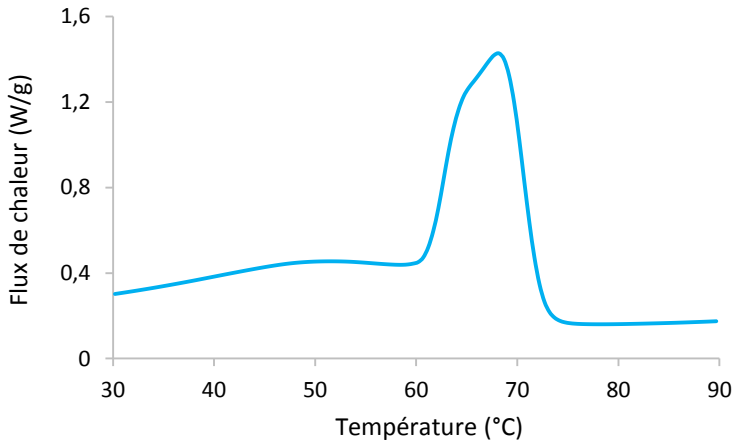


Figure 91 : Thermogramme obtenu par calorimétrie différentielle à balayage pour l'amidon de pomme de terre

Pour tous les thermogrammes obtenus, un pic endothermique est visible entre 60 et 70 °C. Il a largement été mis en évidence que ce dernier correspondait à la gélatinisation de l'amylopectine (Donovan, 1979 ; Evans et Haisman, 1982). Pour certains amidons, un second pic endothermique est observé à une température proche de 90 °C : il s'agit de la dissociation du complexe amylose/lipides (Biliaderis et al., 1985). À partir des thermogrammes, il est possible de déterminer la température de début de gélatinisation (T_0), la température du pic de gélatinisation (T_p) et la température de fin de gélatinisation (T_f) et de calculer l'enthalpie de gélatinisation (ΔH, $J.g^{-1}$ d'échantillon anhydre). Ces données sont présentées dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Propriétés thermiques des amidons déterminées par calorimétrie différentielle à balayage

	T_o (°C)	T_p (°C)	T_f (°C)	ΔH ($J.g^{-1}$)
Blé	52,8	59,3	67,5	6,0
Maïs	60,5	68,5	75,5	9,0
Maïs cireux	63,9	71,9	79,2	10,9
Manioc	58,8	66,5	76,0	7,9
Pomme de terre	59,6	64,5	71,9	8,2
Riz	58,2	67,7	76,9	8,4
Riz cireux	59,2	66,5	76,0	11,5

D'après les Tableau 23 et Tableau 24, les températures de gélatinisation obtenues par les deux méthodes analytiques sont très proches. Ainsi, la concentration en amidon de la suspension ne semble pas avoir un réel impact sur la cinétique de gélification. Globalement, l'amidon de blé présente une température de gélatinisation particulièrement basse : son pic de gélatinisation est observable à une température comprise entre 56,2 et 59,3 °C. Les amidons de maïs et de maïs cireux présentent quant à eux des températures de gélatinisation plus élevées : leurs pics de gélatinisation se situent respectivement à une température d'environ 68,5 et 72 °C. Les amidons de manioc, de pomme de terre, de riz et de riz cireux présentent quant à eux un comportement intermédiaire : leurs pics de gélatinisation apparaissent entre 64,0 et 67,7 °C. Globalement, l'enthalpie de gélatinisation évolue de façon similaire aux températures de gélatinisation : ainsi, l'amidon de blé présente là encore la valeur la plus basse (6 $J.g^{-1}$), suivi des amidons de manioc, de pomme de terre, de riz et de maïs. Les amidons cireux de maïs et de riz présentent quant à eux les enthalpies les plus importantes, avec des valeurs respectives de 10,9 et 11,5 $J.g^{-1}$.

D'après les observations effectuées, la température et l'enthalpie associées au phénomène de gélatinisation varient en fonction de la source d'amidon. Cela s'explique principalement par des différences de cristallinité : plus le degré de cristallinité d'un amidon est important, plus sa structure est stable et plus il est résistant à la gélatinisation (Barichello *et al.*, 1990). Plus précisément, le phénomène de gélatinisation est contrôlé par la structure moléculaire de l'amylopectine (longueur de chaîne, degré de ramification, poids moléculaire et polydispersité), la composition de l'amidon (ratio amylose/amylopectine et présence de phosphore) et l'architecture des granules (ratio cristallin/amorphe) (Tester, 1997). Ainsi, la température du pic de gélatinisation permet d'évaluer la longueur des doubles hélices du granule, tandis que l'enthalpie donne une information plus globale quant à la cristallinité de l'amidon et à la perte de sa structure (Cooke et Gidley, 1992). Comparé aux autres amidons, l'amidon de blé étudié présente par conséquent une structure

cristalline peu stable et donc encline à la gélatinisation. Au contraire, les amidons cireux, particulièrement riches en amylopectine, présentent des enthalpies et des températures de gélatinisation plus importantes que les autres amidons. Cela s'explique aisément : les amidons riches en amylose présentent plus de régions amorphes et moins de régions cristallines, ce qui tend à diminuer la température de gélatinisation. L'initiation de la fusion nécessite donc plus d'énergie en l'absence de régions riches en amylose. Ainsi, les résultats obtenus sont tout à fait concordants avec les données de la littérature.

Initialement, les paramètres de gélatinisation des différents amidons ont été étudiés afin d'évaluer grossièrement l'état physique de l'amidon après le traitement thermique initial de référence. Pour rappel, il s'agit d'un traitement en four à micro-ondes ménager de 2 min à 800 W induit, en fin de traitement thermique, une température d'environ 86 °C au cœur du produit (Figure 92).

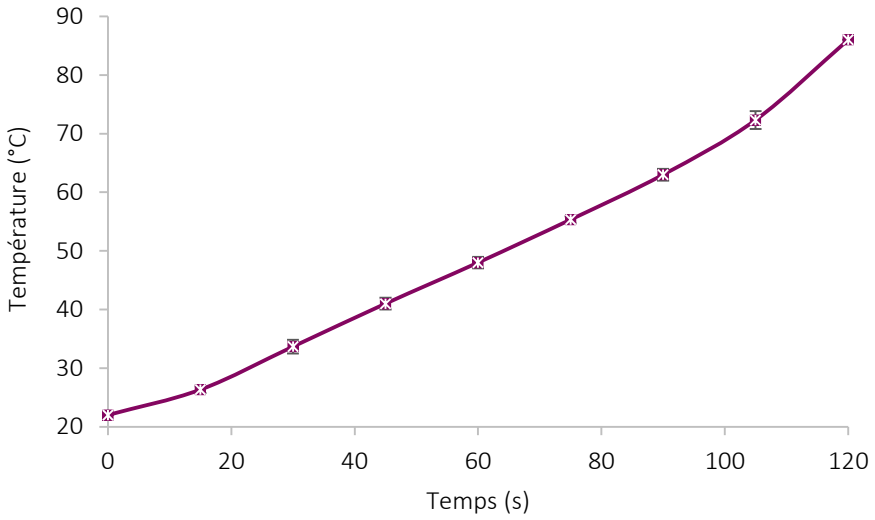


Figure 92 : Évolution de la température au cœur du produit (250 ml) durant un traitement de 2 min à 800 W

D'après les résultats obtenus précédemment (Tableau 23 et Tableau 24), il semblerait que cette température dépasse celle nécessaire à la gélatinisation de tous les types amidons. En effet, même l'amidon de maïs cireux, qui présente la température de gélatinisation la plus élevée, possède une température de fin de pic de gélatinisation inférieure à celle atteinte au cœur du produit à la fin du traitement thermique. Il est donc très probable que l'amidon contenu dans le produit alimentaire soit gélatinisé après le traitement thermique étudié, et que sa digestibilité soit donc améliorée. Ainsi, la digestibilité des amidons a été étudiée après le traitement thermique de référence.

1.2.2.2. Digestibilité des amidons traités thermiquement

D'après l'étude des paramètres de gélatinisation, il semblerait que le traitement thermique recommandé par l'industriel permette aux différents amidons de gélatiniser. Il est donc probable que leur digestibilité soit améliorée. Pour confirmer ou non cette hypothèse, la digestibilité des différentes sources d'amidon a été étudiée après traitement thermique (800 W - 2 min) selon le protocole d'Englyst *et al.* (1992), utilisé précédemment pour l'étude de la digestibilité des amidons natifs. Les résultats sont présentés en Figure 93. La digestibilité de l'amidon de pomme de terre n'a cependant pas pu être étudiée : la suspension formée après le traitement thermique ne permettait pas de prélèvement homogène. Cela est certainement dû à la gélatinisation de l'amidon.

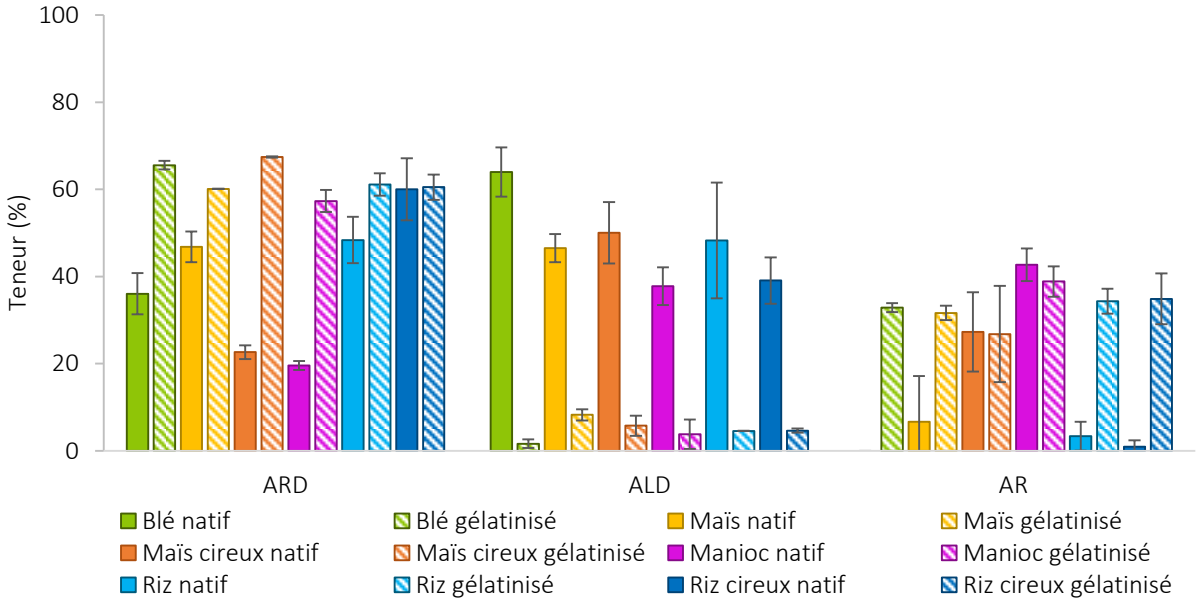


Figure 93 : Digestibilité *in vitro* des différentes sources d'amidon après traitement thermique

D'après la Figure 93, l'amidon de blé présente, après traitement thermique, une augmentation significative de sa teneur en ARD et en AR, ainsi qu'une baisse significative de sa teneur en ALD. Cette même évolution est globalement observée pour l'amidon de maïs. L'amidon de maïs cireux et de manioc présentent quant à eux une augmentation importante de l'ARD, et une baisse significative de l'ALD. La part d'AR reste quant à elle stable. Enfin, les amidons de riz et de riz cireux présentent une teneur en ARD stable, une baisse significative de la teneur en ALD et une augmentation significative de l'AR.

Ainsi, contrairement à l'hypothèse formulée précédemment, il semble que l'amidon de blé n'ait pas intégralement gélatinisé durant le traitement thermique : bien que la proportion d'ARD ait augmenté, il en est de même pour la part d'AR. Cette même observation peut d'ailleurs être faite pour l'amidon de maïs, qui présente une température de gélatinisation largement supérieure.

D'après les données obtenues, il semblerait que les amidons de manioc et de maïs cireux se comportent comme des amidons partiellement gélatinisés : leur teneur en ARD a fortement augmenté, tandis que leur part d'AR est restée stable. Pourtant, leur température de gélatinisation est en deçà de la température atteinte durant le traitement thermique : respectivement 64 et 70 °C. Enfin, à l'inverse, les amidons de riz et de riz cireux se comportent comme des amidons rétrogradés : leur teneur en ALD a significativement baissé, au profit de la teneur en AR.

Dans la littérature, de nombreuses études se sont intéressées à l'influence des traitements thermiques sur la structure et la digestibilité de l'amidon. Bien que, généralement, les traitements thermiques permettent d'accroître la digestibilité des amidons, certains font exception. Ainsi, la cuisson-vapeur de légumineuses est par exemple connue pour augmenter leur teneur en amidon résistant, via un mécanisme de rétrogradation (Tovar et Melito, 1996). Ce même phénomène a été mis en évidence pour une variété d'amidon (blé, maïs, pomme de terre, légumineuses…) après un traitement à l'autoclave (Björck *et al.*, 1987 ; Sievert et Pomeranz, 1990 ; Siljeström *et al.*, 1989 ; Siljeström et Björck, 1990). À l'inverse, l'influence de traitements thermiques en four à micro-ondes sur la digestibilité de l'amidon semble assez variable. Par exemple, Anderson et Guraya (2006) ont mis en évidence que des amidons de riz et de riz cireux présentaient une digestibilité similaire à l'état natif ou après un traitement de 60 min à leur température de gélatinisation. D'après Emami *et al.* (2011), un traitement thermique à 90 °C de plusieurs heures entraine une amélioration significative de la digestibilité de l'amidon d'orge : la part d'ARD augmente fortement, contrairement à l'ALD et à l'AR qui diminuent sensiblement. Dans le même temps, Marconi *et al.* (2000) ont mis en évidence une amélioration de la digestibilité de l'amidon de pois et de haricot, après un traitement à 105 °C jusqu'à cuisson. À contrario, après un traitement à 1000 W durant 30 min, un amidon de *Canna edulis* présente une digestibilité réduite : la teneur en AR a fortement augmenté, au détriment de l'ARD (Zhang *et al.*, 2010). Les auteurs mettent en avant la faible teneur en eau de la suspension d'amidon pour expliquer ce phénomène.

Ainsi, d'après la littérature, les traitements thermiques en four à micro-ondes n'entrainent pas exclusivement une amélioration de la digestibilité : dans certains cas, la teneur en amidon résistant peut augmenter au détriment de celle en amidon rapidement digestible. Les résultats obtenus dans cette étude pour la majorité des amidons, à savoir une baisse de l'ALD au profit de l'AR et de l'ARD, ne paraissent donc pas aberrants. Globalement, après traitement thermique, les amidons étudiés présentent tous un comportement quasiment identique : leur teneur en ARD est proche de 60 %, celle en ALD est proche de 5 %, tandis que l'AR représente environ 30 %. **Les**

amidons peuvent donc être sélectionnés pour leurs propriétés autres que nutritionnelles (propriétés texturantes, liantes…). Lors de la formulation du produit, il faudra cependant prendre en compte que la totalité de la fraction amylacée n'est pas digérée. Pour conclure, l'amidon de blé, de maïs, de maïs cireux, de manioc, de riz ou de riz cireux pourra être utilisé pour la formulation des produits de type 3.

1.2.3. Comparaison de la digestibilité des amidons après traitement thermique et refroidissement

Après traitement thermique, l'abaissement de la température d'une suspension d'amidon entraine une insolubilisation des macromolécules et une séparation de phases liée à l'incompatibilité entre l'amylose et l'amylopectine. En quelques heures, l'amylose forme des doubles hélices qui s'associent pour former des cristaux de type B. Cela donne lieu, par l'intermédiaire de zones de jonctions, à la naissance d'un réseau tridimensionnel. Parallèlement à cela, en quelques jours, les chaînes d'amylopectine les plus externes vont recristalliser pour former là aussi des cristaux de type B. L'amidon ainsi obtenu est alors généralement en partie résistant à l'hydrolyse enzymatique. La formulation industrielle de type 4 subissant un traitement thermique suivi d'un refroidissement à température réfrigérée, il est possible que l'amidon subisse une rétrogradation. Pour valider ou non cette hypothèse, la propension des différents amidons à la rétrogradation a été étudiée par calorimétrie différentielle à balayage, et leur digestibilité a par la suite été étudiée selon le protocole d'Englyst *et al.* (1992).

1.2.3.1. Mise en évidence de la propension à la rétrogradation

L'étude de la propension des différents amidons à la rétrogradation a été menée par calorimétrie différentielle à balayage. Pour cela, les creusets ayant subi la montée en température de 30 à 90 °C pour l'étude de la gélatinisation des amidons ont été stockés durant 24 h à 4 °C. Au bout des 24 h, ces derniers ont subi une nouvelle rampe de température de 30 à 90 °C, et les paramètres suivis lors de la gélatinisation ont de nouveau été étudiés. Par comparaison des différentes valeurs, la propension à la rétrogradation des amidons peut être calculée. Mais d'après les sept thermogrammes obtenus, aucun pic de gélatinisation n'est observable. Il semblerait donc qu'après un stockage de 24 h à 4 °C, les amidons étudiés ne subissent aucune rétrogradation. Dans la réalité de consommation du produit, son refroidissement à température réfrigérée n'excède pas 4 h : il est donc très probable qu'une rétrogradation ait lieu. Pour valider ou non cette hypothèse, la digestibilité des amidons a été étudiée.

1.2.3.2. Digestibilité des amidons après traitement thermique et refroidissement

D'après les résultats obtenus par calorimétrie différentielle à balayage, il semblerait qu'après gélatinisation, un refroidissement des amidons à 4 °C durant 24 h n'entraine aucune rétrogradation. Ainsi, après avoir subi le traitement thermique de référence, les suspensions d'amidon ont été stockées durant 24 h à 4 °C. Au bout de ces 24 h, leur digestibilité a été étudiée selon le protocole précédemment utilisé. Les résultats sont présentés en Figure 94.

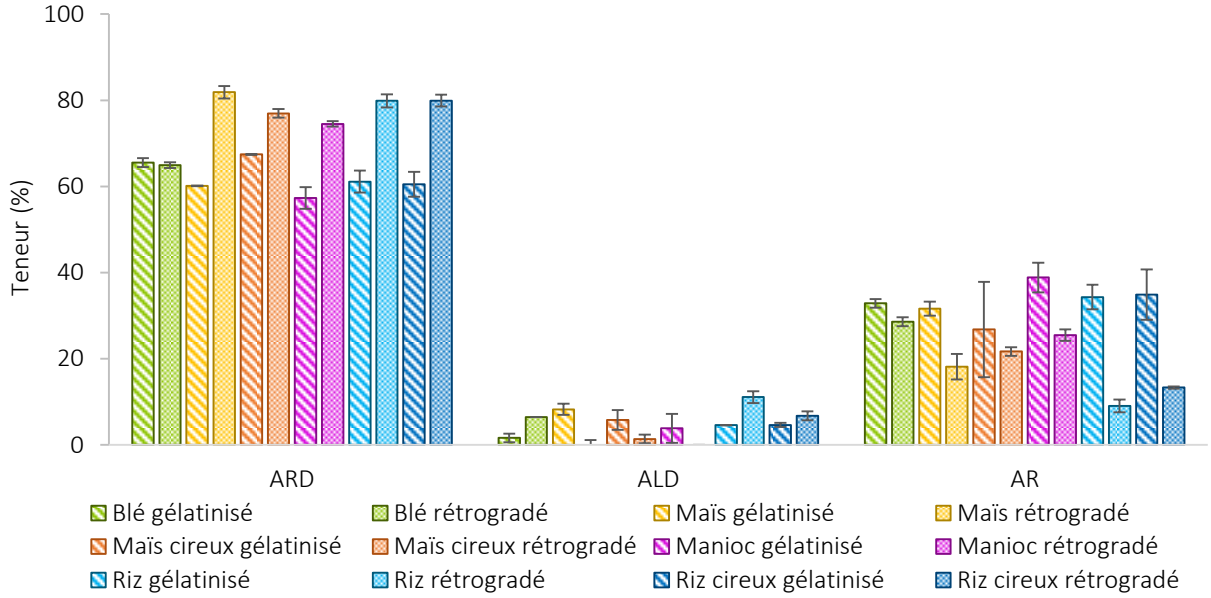


Figure 94 : Digestibilité *in vitro* des différentes sources d'amidon après traitement thermique et refroidissement

D'après la Figure 94, il semblerait que le refroidissement des amidons durant 24 h à 4 °C influence très peu leur digestibilité. Seule la teneur en ARD de certains amidons augmente après refroidissement, au détriment de l'amidon résistant. Mais globalement, assez peu de différences sont notées. Ces observations confirment l'hypothèse formulée précédemment : le refroidissement de l'amidon durant 24 h à 4 °C n'entraine pas sa rétrogradation. **Ainsi, de la même façon que pour la formulation 3, les 6 amidons étudiés pourraient être intégrés à la formulation 4.** Le choix pourra se faire sur d'autres critères que celui de la digestibilité. Une fois encore, la teneur en amidon résistant de la source sélectionnée devra tout de même être prise en compte lors de la formulation.

1.3. Conclusion

L'amidon constitue la principale source d'énergie de la majorité de la population mondiale. Il se présente sous forme de granules denses, ayant un diamètre compris entre 2 et 100 µm et une structure semi-cristalline (alternance de zones amorphes et cristallines). L'amidon renferme par ailleurs deux polymères de structure différente : une molécule linéaire, l'amylose, et une molécule ramifiée, l'amylopectine. Malgré l'efficacité du processus de digestion, une partie de l'amidon alimentaire (amidon résistant) rejoint généralement le côlon au niveau duquel il est métabolisé par la flore commensale. La digestibilité d'un amidon dépend de la morphologie de ses granules (taille, forme, aspect de surface…), des traitements physiques, thermiques et chimiques qu'il subit mais aussi de la viscosité de la matrice, de la présence de lipides et de protéines, ou encore de facteurs antinutritionnels.

Cette étude nous a permis d'étudier la digestibilité de 7 sources d'amidon, dans trois conditions différentes. Ces conditions ont été choisies pour refléter au mieux les conditions d'utilisation des différents produits. Dans un premier temps, les amidons ont donc été étudiés sous leur forme native. Cela correspond à leur utilisation dans les formulations de type 1 et 2. Certains facteurs influençant leur digestibilité (composition des granules, taille, forme et aspect de leur surface) ont été étudiés. Leur digestibilité a par la suite été mesurée selon un protocole largement utilisé dans la littérature. Ainsi, parmi les sept sources d'amidon, deux (maïs cireux et manioc) semblent idéales pour une incorporation dans les produits industriels : elles permettent de moduler la glycémie, tout en étant particulièrement digestibles.

Dans un second temps, la digestibilité d'amidons ayant subi un traitement thermique en four à micro-ondes (800 W - 2 min) a été suivie. Cela correspond aux conditions d'utilisation de la formulation de type 3. Globalement, le traitement thermique préconisé par l'entreprise (800 W - 2 min) permet à tous les amidons d'atteindre leur température de gélatinisation. Ces derniers présentent, après traitement thermique, une digestibilité très similaire. Aucun d'entre eux n'est donc spécifiquement à privilégier, mais il sera important de tenir compte de la part d'amidon résistant lors de la formulation du produit.

Enfin, la digestibilité d'amidons ayant subi le traitement thermique de référence suivi d'un refroidissement à température réfrigérée durant 24 h a été suivie. Ce type de traitement est similaire à celui subi par les formulations de type 4. Seule la durée de réfrigération, qui n'excède généralement pas 4 h a été rallongée pour des raisons expérimentales. Ainsi, d'après les résultats

obtenus, ces amidons ne semblent pas subir de rétrogradation : leur teneur en amidon rapidement digestible, lentement digestible et résistant sont similaires à celles de l'amidon ayant subi un traitement thermique sans refroidissement. Là encore, il sera possible de formuler les produits de type 4 avec l'un des 6 amidons étudiés, en tenant compte de sa teneur en amidon résistant.

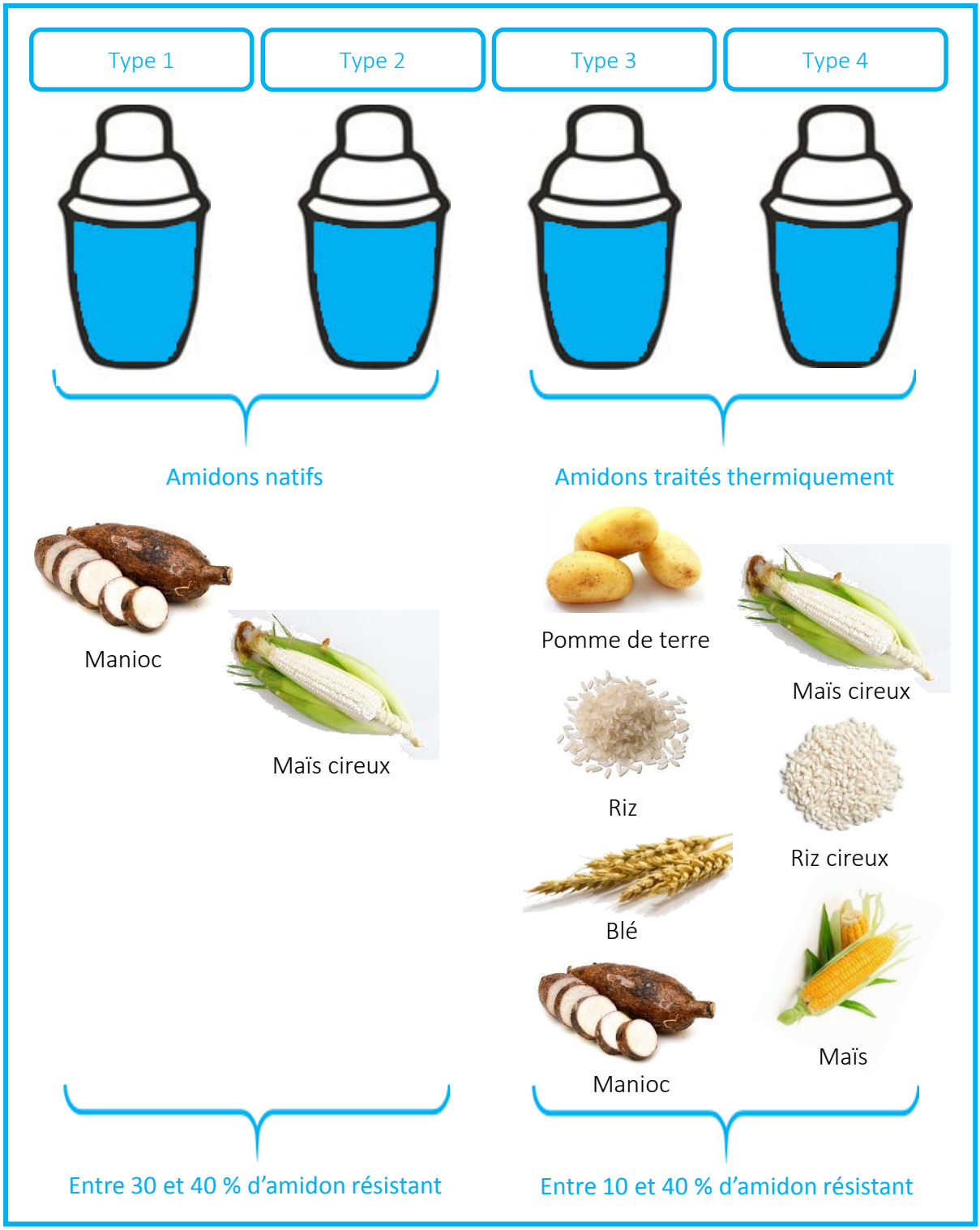


Figure 95 : Bilan de la sélection d'une source d'amidon particulièrement digestible

2. Sélection d'une source de protéine adaptée aux produits

Les protéines, constitutives d'un certain nombre de facteurs de régulation (enzymes, hormones…), sont structurellement et fonctionnellement indispensables aux êtres humains. Dans la formulation industrielle sèche, elles sont d'ailleurs la principale source d'énergie. Mais là encore, malgré un processus de digestion complexe et efficace, une partie des protéines d'origine alimentaire ne sont pas assimilées. Cette perte est comprise, dans des conditions physiologiques normales, entre 4 et 22 %. Elle dépend principalement du type de protéines (présence ou non de facteurs antinutritionnels, origine…) et de sa structure. L'objectif de cette étude est donc de sélectionner, pour chacun des quatre types de produit, la ou les source(s) de protéines présentant la meilleure digestibilité. Ainsi, dans un premier temps, une étude bibliographique permettra de détailler le processus de digestion et d'absorption des protéines, ainsi que les paramètres influençant leur digestibilité. L'étude détaillera aussi la manière d'évaluer la qualité d'une protéine tel que le préconise l'Organisation Mondiale de la Santé. Dans un second temps, la digestibilité de six sources de protéines sera étudiée et comparée expérimentalement.

2.1. Digestion des protéines : étude bibliographique

2.1.1. Les protéines

Les protéines sont fonctionnellement et structurellement indispensables aux êtres vivants. Les mammifères en sont constitués à 16 % et de nombreux facteurs de régulation (hormones, enzymes) sont des peptides ou des protéines (Moughan, 2009). Elles appartiennent à un groupe de composés organiques complexes et sont essentiellement composées d'une association d'acides aminés (Morris et Press, 1992). Il existe 20 principaux acides aminés qui permettent la synthèse d'une multitude de protéines présentant des structures et des fonctionnalités très diverses (Moughan, 2009). Les acides aminés sont des acides carboxyliques reliés entre eux par une liaison covalente entre le groupe carboxyle porté par le carbone α d'un acide aminé et le groupe amine porté par le carbone α de l'acide aminé voisin sur la chaîne peptidique (Li-Chan, 2004) (Figure 96).

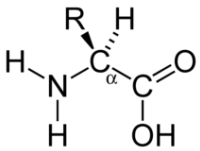


Figure 96 : Structure d'un acide L-α-aminé

L'apport journalier en protéines alimentaires varie considérablement en fonction des régions du monde. Un régime alimentaire occidental est composé d'environ 100 g de protéines par jour. En plus des protéines alimentaires, les sécrétions salivaires et gastro-intestinales apportent environ 35 g de protéines par jour (Ganapathy, 2012). Un système de digestion et d'absorption complexe et coordonné permet, dans des conditions physiologiques normales, l'absorption de 78 à 96 % des protéines d'un régime alimentaire. Cela dépend principalement du type de protéines consommé et des traitements qu'elles ont précédemment subis.

2.1.2. La digestion des protéines

2.1.2.1. La digestion gastrique

Les aliments ingérés sont tout d'abord déstructurés par la mastication et mélangés à la salive de façon à générer un milieu favorable à l'action des enzymes digestives et à la déglutition (Moughan, 2009). La digestion des protéines débute dans l'estomac, sous l'action conjuguée de l'acide chlorhydrique et des protéases gastriques. L'acide chlorhydrique, sécrété par les cellules pariétales, provoque une dénaturation, voire une précipitation des protéines. Ce phénomène

permet d'accroître la sensibilité des protéines à l'hydrolyse enzymatique. La sécrétion d'acide chlorhydrique a aussi pour rôle d'activer les pepsinogènes gastriques en pepsines (Institut Français pour la Nutrition, 1997). Une concentration élevée en ions H^+ entraine un changement conformationnel du pepsinogène, qui libère le site actif et donne ainsi naissance à la pepsine (Ganapathy, 2012). Elle hydrolyse préférentiellement les liaisons peptidiques impliquant des acides aminés aromatiques (histidine, phénylalanine, tryptophane et tyrosine) (Figure 97) (Mills et Tang, 1967).

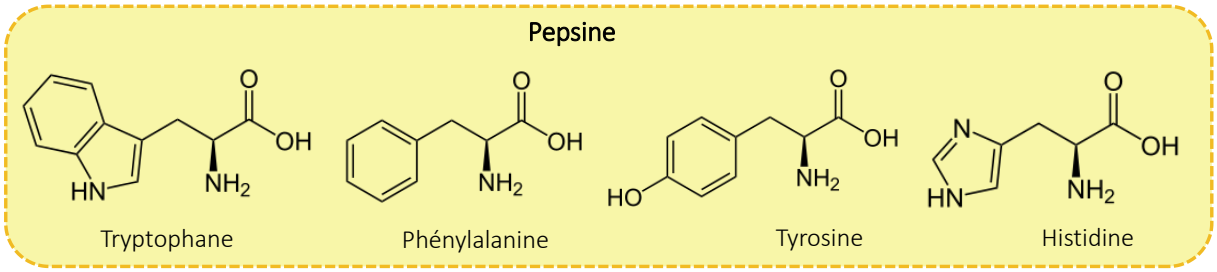


Figure 97 : Structure des acides aminés préférentiellement clivés par la pepsine

L'hydrolyse des protéines au niveau stomacal reste cependant très incomplète étant donné que le pH intra gastrique après un repas reste longtemps supérieur à 5. Cette étape permet donc l'obtention d'un mélange de protéines et de grands polypeptides (Moughan, 2009).

Le mélange est ensuite libéré dans l'intestin grêle. La vitesse de cette libération est notamment dépendante de la température, du pH, de la viscosité, du contenu en fibres, de la densité calorique, de la taille des particules, de la composition et du degré d'hydrolyse de l'aliment. Le volume du repas jouerait aussi un rôle (Hunt et Macdonald, 1954 ; Hunt et Stubbs, 1975 ; Malagelada et Azpiroz, 2011 ; Meyer *et al.*, 1985 ; Vist et Maughan, 1995). Les principales hormones régulant la vidange gastrique n'ont pas encore été définitivement mises en évidence, mais il semblerait que la cholécystokinine (CCK), le glucakon-like peptide-1 (GLP-1) et le peptide YY (PYY) jouent un rôle majeur.

Les acides aminés, les acides gras et les protéines semblent être les principaux stimulateurs de la sécrétion de CCK (Liddle *et al.*, 1985). Cette hormone régule la motilité intestinale, la contraction de la vésicule biliaire, la sécrétion enzymatique pancréatique, l'appétit (Calbet et Holst, 2004) et ralentit la vidange gastrique via la contraction du sphincter pylorique et la relaxation de l'estomac proximal (Crawley et Corwin, 1994). Au niveau gastrique, la sécrétion de GLP-1 inhibe la vidange gastrique des liquides et des solides en augmentant la phase de latence et/ou en réduisant la vitesse de la vidange (Näslund *et al.*, 1999, 2001 ; Nauck *et al.*, 1997 ; Schirra *et al.*, 1997 ; Wettergren *et al.*, 1993). Cette hormone est sécrétée après absorption d'un repas

volumineux contenant des éléments nutritifs plus complexes nécessitant un long traitement digestif.

À l'inverse, après la consommation d'un repas peu volumineux et contenant des éléments facilement digestibles, le gastric inhibitory peptide (GIP) est libéré de façon à accélérer la vidange gastrique (Jens Juul Holst, 2007). La concentration plasmatique du GLP-1 est quasiment nulle en période de jeûne, elle augmente rapidement après ingestion d'aliments (Orskov *et al.*, 1996 ; Toft-Nielson *et al.*, 1996). Cela s'explique par des interactions entre les nutriments et les cellules L des microvillosités (Eissele *et al.*, 1992). Ces cellules seraient notamment sensibles au glucose, aux lipides et aux protéines (Tolhurst *et al.*, 2009). Le mécanisme déclenchant la libération de l'hormone reste peu clair, mais il a été démontré chez l'homme que les peptides (Layer *et al.*, 1995) et les acides aminés étaient des stimulateurs (Herrmann *et al.*, 1995 ; Reimann *et al.*, 2004). La glutamine pourrait être un puissant déclencheur de la libération de l'hormone dans les cellules GLUTag en agissant sur un transporteur d'acides aminés. Les peptides pourraient quant à eux agir via les systèmes de transport des di- et tripeptides couplés aux protons (Matsumura *et al.*, 2005 ; Reimann *et al.*, 2004). Pourtant, d'après une étude chez l'homme, il semblerait qu'un hydrolysat et la protéine correspondante entrainent une stimulation similaire du GLP-1 (Calbet et Holst, 2004). L'hypothèse avancée serait que les oligopeptides stimulent davantage le GLP-1, mais que dans le cadre de l'étude, les protéines entières sont digérées tellement rapidement que la vitesse d'apparition des acides aminés dans le sang, et donc la libération de l'hormone, est indépendante du niveau d'hydrolyse initial de la protéine.

Chez l'homme, le PYY est un inhibiteur général des fonctions gastro-intestinales (Adrian *et al.*, 1985). Il inhibe les sécrétions gastriques, la vidange gastrique, les sécrétions pancréatiques et le transit gastrique, ce qui en fait un « frein iléal » (Dreznik *et al.*, 1994 ; Wen *et al.*, 1995). Les lipides alimentaires sont les principaux stimuli de cette hormone (Greeley *et al.*, 1989), mais les protéines, les peptides et les acides aminés ont aussi un effet non négligeable (Greeley *et al.*, 1989 ; Wen *et al.*, 1995 ; Zhang *et al.*, 1993). La quantité d'hormone sécrétée est proportionnelle à la quantité de calories ingérée (Adrian *et al.*, 1985).

Il semblerait cependant qu'il existe une accélération de la vidange gastrique dans le cas d'une adaptation de plus de 14 jours à un régime hyperprotéique. L'hypothèse serait une régulation à la baisse d'hormones telles que le CCK (Shi *et al.*, 1997). La vidange gastrique est aussi variable selon la nature de la protéine : l'expulsion gastrique de caséine serait par exemple plus lente que l'expulsion d'un isolat de soja (Hara *et al.*, 1992).

2.1.2.2. La digestion luminale

Lorsque le contenu stomacal atteint l'intestin grêle, les cellules endocrines du duodénum sont exposées à un pH acide, ce qui stimule la sécrétion de sécrétine. Cette hormone agit sur le pancréas et les voies biliaires pour induire la sécrétion de bicarbonate, qui permet une neutralisation rapide de l'acidité. Les polypeptides et les acides gras, en stimulant les cellules endocrines du duodénum, induisent quant à eux la sécrétion de la CCK. Cette hormone provoque la sécrétion de fluide pancréatique riche en enzymes digestives et permet la contraction de la vésicule biliaire qui déverse ainsi son contenu dans le duodénum (Ganapathy, 2012).

Le pancréas est très sensible à une variété de stimuli physiologiques et pathologiques, et notamment à ceux d'origine nutritionnelle. Il possède la capacité de moduler son volume et la composition de ses sécrétions exocrines en réponse à des changements à long terme des substrats nutritionnels apportés. À condition que l'apport alimentaire en protéines soit suffisant, la synthèse et la teneur en enzymes digestives majeures (protéines, lipides et glucides) varie proportionnellement à la quantité de leur substrat respectif présent dans le bol alimentaire. Cette adaptation permet d'optimiser la digestion et l'utilisation de ces substrats. Ainsi, les régimes riches en protéines permettent d'accroître la synthèse pancréatique et la teneur en trypsinogène et chymotrypsinogène (Grossman *et al.*, 1944). Cette adaptation serait tout de même dépendante du type de protéines : l'augmentation serait mineure pour les protéines de « mauvaise » qualité (protéines peu digestibles et/ou n'apportant pas les acides aminés essentiels en quantité suffisante) telles que la zéine ou la gélatine, et significative pour les protéines de « bonne » qualité (protéines très digestibles et apportant les acides aminés essentiels en quantité suffisante) telles que la caséine ou les protéines de poisson. Ces observations ont cependant principalement été réalisées sur le rat, peu d'études se sont penchées sur l'homme (Behrman et Kare, 1969 ; Desnuelle *et al.*, 1962 ; Gorrill et Thomas, 1967 ; Grossman *et al.*, 1944 ; Howard et Yudkin, 1963 ; Imondi et Bird, 1967). Ces changements adaptatifs sont principalement dus à des hormones spécifiques, dont la sécrétion est indirectement stimulée par les protéines. C'est notamment le cas de la CCK qui tend à faire considérablement augmenter la synthèse de protéases. La libération de CCK est stimulée par des peptides endogènes, sensibles à l'activité protéolytique. Lorsque peu de protéines sont présentes dans la lumière intestinale, ils sont hydrolysés et n'agissent plus sur les cellules intestinales. À l'inverse, si une grande quantité de protéines est présente au niveau luminal, les sites actifs des protéases sont mobilisés et les peptides peuvent alors stimuler la libération de l'hormone (Mañas, *et al.*, 2010). Globalement, au moins chez le rat, l'adaptation pancréatique est

rapide : elle débute après les premières 24 heures du changement alimentaire et devient complète en une semaine (Nishi *et al.*, 1998).

L'hydrolyse des protéines se déroule principalement dans la lumière duodéno-jéjunale et met en jeu plusieurs protéases sécrétées sous la forme de zymogènes (précurseurs protéiques d'une enzyme) inactifs. L'activation des protéases pancréatiques se déroule en cascade et est initiée par l'entérokinase membranaire (Institut Français pour la Nutrition, 1997). La trypsine agit ensuite sur les autres zymogènes et génère les enzymes sous leur forme active. Les protéases pancréatiques incluent 3 endopeptidases (trypsine, chymotrypsine et élastase) qui hydrolysent préférentiellement les liaisons peptidiques internes à la protéine et dont résultent des polypeptides à courtes chaînes.

La trypsine agit sur des liaisons peptidiques formées par le groupement carboxyle d'acides aminés cationiques (arginine et lysine). La chymotrypsine hydrolyse préférentiellement les liaisons peptidiques formées par les groupements carboxyles des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane), tandis que l'élastase hydrolyse les liaisons formées par le groupement carboxyle d'acides aminés aliphatiques (glycine, alanine, valine, leucine et isoleucine) (Figure 98) (Ganapathy, 2012).

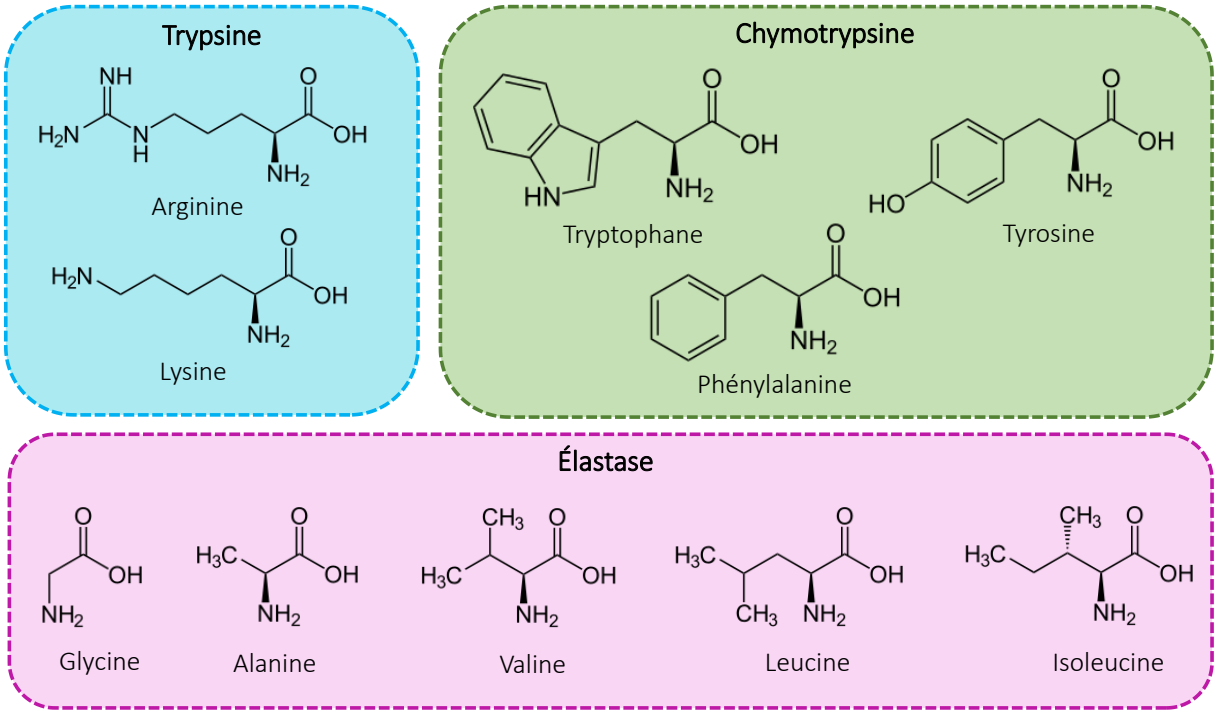


Figure 98 : Structure des acides aminés préférentiellement clivés par la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase

Les carboxypeptidases A et B (exopeptidases) agissent par la suite sur la liaison C terminale d'acides aminés aromatiques et basiques, respectivement. Cette diversité de spécificité rend le procédé de digestion vraiment efficace. Les produits de cette digestion sont principalement des peptides formés par 6 à 8 acides aminés mais aussi quelques acides aminés libres.

Les peptides issus de la digestion pancréatique subissent ensuite une hydrolyse par les peptidases associées à la bordure en brosse des entérocytes. Ces oligopeptidases sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique et, après transfert à travers l'appareil de Golgi, sont transportées jusqu'à la bordure en brosse et extrudées par exocytose. Elles permettent l'hydrolyse de peptides composés de 8 acides aminés ou moins et agissent sur la liaison N-terminale des acides aminés. La vitesse d'hydrolyse est particulièrement rapide pour les tripeptides, intermédiaire pour les tétra- et pentapeptides et lente pour les dipeptides (Bhutta et Sadiq, 2013). Après digestion luminale des protéines endogènes et exogènes par les protéases gastriques et pancréatiques, ainsi que les peptidases de la bordure en brosse, 80 % des protéines sont sous forme de di- ou tripeptides et 20 % sont sous forme d'acides aminés libres (Ganapathy, 2012). L'hydrolyse des protéines dans la lumière intestinale n'est cependant pas complète, en fonction de la nature des protéines et des traitements thermiques subis, de l'azote est toujours présent sous la forme de polypeptides et de protéines intactes. Ces produits non digérés peuvent atteindre le côlon pour y être dégradés par la flore bactérienne. Une très faible proportion de ces molécules va également être absorbée au niveau de l'intestin grêle et peut contribuer à l'apparition d'une réponse immune locale et systémique, pouvant déclencher une allergie (Institut Français pour la Nutrition, 1997).

2.1.3. L'absorption des protéines

Bien que le processus de digestion protéique débute au niveau gastrique par l'action de la pepsine, l'absorption des produits dans cette région est négligeable (Freeman *et al.*, 1983). L'intestin grêle est le principal site d'absorption : lorsque le contenu luminal atteint la valvule iléo-cæcale, l'absorption des acides aminés est presque totale. Au sein de l'intestin grêle, les régions diffèrent dans leur capacité à absorber les produits de digestion : les di- et tripeptides sont plus absorbés au niveau du jéjunum, tandis que les acides aminés sont plus absorbés au niveau de l'iléon. Ce gradient d'absorption le long de l'axe jéjuno-iléal s'explique par l'activité des peptidases. Ces dernières présentent en effet une activité plus importante dans l'iléon que dans le jéjunum (Ganapathy, 2012). L'épithélium colique est aussi capable d'absorber un nombre varié d'acides aminés et de peptides (Ardawi, 1986 ; James et Smith, 1976 ; Sepúlveda et Smith, 1979), mais en tenant compte de la totalité du processus d'absorption protéique, celle-ci resterait marginale. Les

protéines d'origine bactérienne pourraient tout de même y être digérées et absorbées (Ganapathy, 2012).

2.1.3.1. Absorption des acides aminés et des peptides à travers la membrane apicale de la bordure en brosse des entérocytes

L'absorption des acides aminés et des peptides à travers l'épithélium intestinal est effectuée par une multitude de systèmes de transport qui sont exprimés différemment entre le domaine apical et le domaine basolatéral de la membrane épithéliale. Ces systèmes peuvent être énergétiquement dépendants (actifs) ou non (passifs). Les forces motrices du transport actif proviennent d'un gradient ionique transmembranaire, rendu possible par la présence d'une ATPase Na^+-K^+ au niveau du domaine basolatéral. Cette ATPase permet la sortie de Na^+ de la cellule vers le sang et l'entrée de K^+ du sang vers la cellule. Le ratio Na^+/K^+ étant de 3/2, ce transport génère aussi un potentiel membranaire négatif. La présence d'un canal potassique au niveau du domaine basolatéral permet de réduire la concentration de potassium à l'intérieur de la cellule, et d'accroître le potentiel membranaire négatif. Au niveau du domaine apical de la membrane, un échangeur Na^+/H^+ utilisant le gradient de Na^+ comme force motrice permet la sortie de H^+ de la cellule vers le lumen. Cela génère un gradient H^+ transmembranaire et donc un microclimat acide à la surface luminale de la bordure en brosse. Il existe aussi un canal chlorure du côté apical de la cellule qui permet de véhiculer les ions Cl^- vers l'extérieur de la cellule. Ces différents systèmes de transport permettent de maintenir une faible concentration en Na^+ et Cl^- et une concentration élevée en K^+ à l'intérieur de la cellule et donc de contribuer au transport actif des acides aminés et des peptides (Ganapathy, 2012).

Tableau 25 : Systèmes de transport des acides aminés au niveau du domaine apical de la cellule épithéliale, adapté de Ganapathy (2012)

Système de transport	Type d'acide aminé	Ions impliqués
B^0	Neutres	Na^+
$B^{0,+}$	Neutres, cationiques	Na^+, Cl^-
$b^{0,+}$	Neutres, cationiques, cystéine	-
IMINO	Acides iminés	Na^+, Cl^-
β	β-alanine	Na^+, Cl^-
X^-_{AG}	Anioniques	Na^+, K^+, H^+
ASC	Neutres	Na^+
N	Glutamine, Asparagine, Histidine	Na^+, H^+
PAT	Petits acides aminés neutres	H^+

Il existe 9 principaux systèmes de transport des acides aminés à travers la membrane apicale de bordure en brosse des entérocytes (Tableau 25). Ces différents systèmes sont spécifiques au transport de certains acides aminés et ils dépendent des gradients transmembranaires (Na^+, K^+, H^+, Cl^-) explicités dans le paragraphe précédent.

Les peptides sont quant à eux absorbés via un système différent de ceux des acides aminés. Ce système est indépendant du Na^+ mais il est électrogénique : l'entrée des peptides dans la cellule épithéliale nécessite l'entrée simultanée d'une charge positive. Ainsi, le climat légèrement acide à la surface luminale de la membrane de la bordure en brosse fournit l'énergie nécessaire au transport des peptides. Ce système permet de véhiculer les di- et tripeptides, voire même des tétrapeptides. Les peptides plus longs ne semblent pas pouvoir être absorbés (Ganapathy, 2012). L'absorption des protéines sous la forme de di- et tripeptides plutôt que sous forme d'acides aminés présente en réalité un intérêt nutritionnel. L'absorption des acides aminés est tout d'abord plus rapide sous la forme de peptides que sous la forme d'acides aminés libres, et les peptides permettent aussi une apparition plus homogène des acides aminés au niveau sanguin. Le système de transport des peptides est aussi peu sensible aux conditions adverses (jeûne, malnutrition protéino-énergétique, carence en vitamines ou maladies intestinales) et peu soumis à la compétition. Il permet aussi la conservation de l'énergie métabolique (Grimble et Silk, 1989).

2.1.3.2. Devenir des acides aminés et des peptides dans l'entérocyte et transport à travers la membrane basolatérale

Les peptidases entérocytaires jouent un rôle vital dans la phase terminale de digestion des protéines. Elles agissent prioritairement sur les dipeptides et dans une moindre mesure sur les tripeptides. En plus d'hydrolyser les peptides issus de la digestion (exogènes), ces peptidases agissent également sur les protéines endogènes. Leur activité s'accroît en période de jeûne (Kim *et al.*, 1973), et décroit dans le cas d'un régime isocalorique déficient en protéines (Kumar et Chase, 1972). Ces enzymes présentent une meilleure activité dans le segment proximal et médian de l'intestin grêle, zones au niveau desquelles la capacité d'absorption en petits peptides est idéale. Certains peptides sont par ailleurs résistants à l'hydrolyse et apparaissent alors intacts au niveau sérique (Ganapathy, 2012). C'est notamment le cas pour les peptides riches en proline ou en hydroxyproline, ou encore pour le dipeptide carnosine. Il semblerait qu'environ 10 % de l'azote entrant dans la circulation mésentérique après absorption d'un hydrolysat partiel de caséine soit sous forme de peptides (Gardner *et al.*, 1983).

Une fois à l'intérieur de la cellule, les di- et tripeptides sont hydrolysés en acides aminés par les peptidases cytoplasmiques. La membrane basolatérale des entérocytes possède plusieurs systèmes de transport des acides aminés leur permettant de rejoindre le système porte. Les peptides échappant à l'hydrolyse cytoplasmique rejoignent la circulation via un système de transport peptidique présent dans la membrane basolatérale, distinct de celui présent au niveau de la bordure en brosse. Les acides aminés, qu'ils soient issus du lumen ou obtenus par l'action des peptidases, alimentent plusieurs voies métaboliques et peuvent notamment être dégradés, convertis en d'autres acides aminés, incorporés à des protéines ou transportés dans le sang (Ganapathy, 2012).

Il existe au moins 6 systèmes de transport des acides aminés au travers de la membrane basolatérale. Deux sont sodium-dépendants, 3 sont sodium-indépendants et le dernier est dépendant ou indépendant selon le substrat. Les systèmes sodium-dépendants sont responsables du transport des acides aminés de la cellule vers le sang, tandis que les systèmes sodium dépendants permettent d'approvisionner entre les repas les cellules responsables de l'absorption intestinale en acides aminés. Le système de transport des peptides à travers la membrane basolatérale est encore peu connu. Ce dernier serait spécifique aux peptides de petites tailles et serait insensible au gradient H^+ transmembranaire (Ganapathy, 2012).

2.1.3.3. Régulation de l'absorption des acides aminés et des peptides

La capacité de l'intestin grêle à absorber les acides aminés et les peptides varie significativement en réponse à différents facteurs. Les mécanismes sous-jacents peuvent être non spécifiques aux protéines (altération générale de la capacité d'absorption de l'intestin grêle touchant tous les nutriments) ou spécifiques (changement dans l'absorption de certains acides aminés ou peptides).

Chez l'homme, les systèmes de transport des acides aminés et des peptides sont présents avant la naissance, mais leur vitesse décline avec l'âge (Buddington et Diamond, 1990 ; Navab et Winter, 1988 ; Treves *et al.*, 1990). Elle est 2,5 à 5 fois moins importante à l'âge adulte qu'à la naissance. Cette diminution, au moins pour les acides aminés aromatiques, s'explique par une augmentation de l'affinité du transporteur et par une diminution de sa capacité. Ce déclin est significativement plus important pour les acides aminés essentiels que pour ceux non essentiels. Les transporteurs spécifiques aux peptides seraient eux aussi touchés par ce déclin, mais ne présenteraient pas de meilleure affinité (Ganapathy, 2012).

La vitesse de transport de la plupart des nutriments dans l'intestin grêle est aussi influencée par la concentration en substrat présente dans la lumière intestinale (Ferraris *et al.*, 1988 ; Ferraris et Diamond, 1989). En général, la présence d'importantes quantités de protéines dans le régime alimentaire tend à augmenter la vitesse du transport intestinal des acides aminés. Le schéma de cette régulation positive est cependant variable en fonction des différents systèmes de transport. Cette augmentation est constante dans le cas des acides aminés anioniques et d'acides iminés, et variable pour les acides aminés neutres et cationiques. Les acides aminés n'induisent pas forcément leur propre transporteur : la glutamine et la valine induisent par exemple le transport d'acides aminés anioniques, l'aspartate (acide aminé anionique) induit par la suite le transport des acides aminés cationiques, tandis que l'arginine (acide aminé cationique) induit elle-même le transport d'acides aminés anioniques. L'aspartate, la valine, la lysine et la glutamine induisent quant à elles leur propre transport. Des périodes de jeûne total sont aussi connues pour altérer la capacité absorbante de l'intestin grêle (Ganapathy, 2012). Le transport intestinal des peptides est lui aussi régulé positivement dans le cas de la présence d'une importante quantité de protéines dans le lumen intestinal ou durant une courte période de jeûne, mais il n'est pas affecté par de longues périodes de jeûne (Ferraris et Diamond, 1989). Ces mécanismes d'adaptation restent encore peu connus même si une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour ces transporteurs (Erickson *et al.*, 1995) ou encore une stimulation de l'activité du transporteur via l'activation de la transcription du gène codant pour cette molécule pourraient les expliquer (Shiraga *et al.*, 1999).

Un certain nombre d'hormones joue aussi un rôle dans la régulation des systèmes de transport des acides aminés et des peptides. On compte notamment la somatostamine, la neurotensine, la sécrétine, la cholecystokinine, le facteur de croissance épidermique ou encore l'insuline (Chen *et al.*, 1987 ; Krejs *et al.*, 1980 ; Mainoya, 1975 ; Salloum *et al.*, 1993). Leur mode d'action est assez variable, certains facilitent par exemple le transport des peptides à travers la membrane basolatérale en se fixant sur un récepteur à sa surface et en modifiant l'expression de la protéine responsable du transport (Nielsen *et al.*, 2003 ; Thamotharan *et al.*, 1999), tandis que d'autres le limitent en interférant avec l'expression des gènes responsables du transport (Ashida *et al.*, 2002, 2004).

La Figure 99 schématise la digestion et l'absorption des protéines chez l'homme.

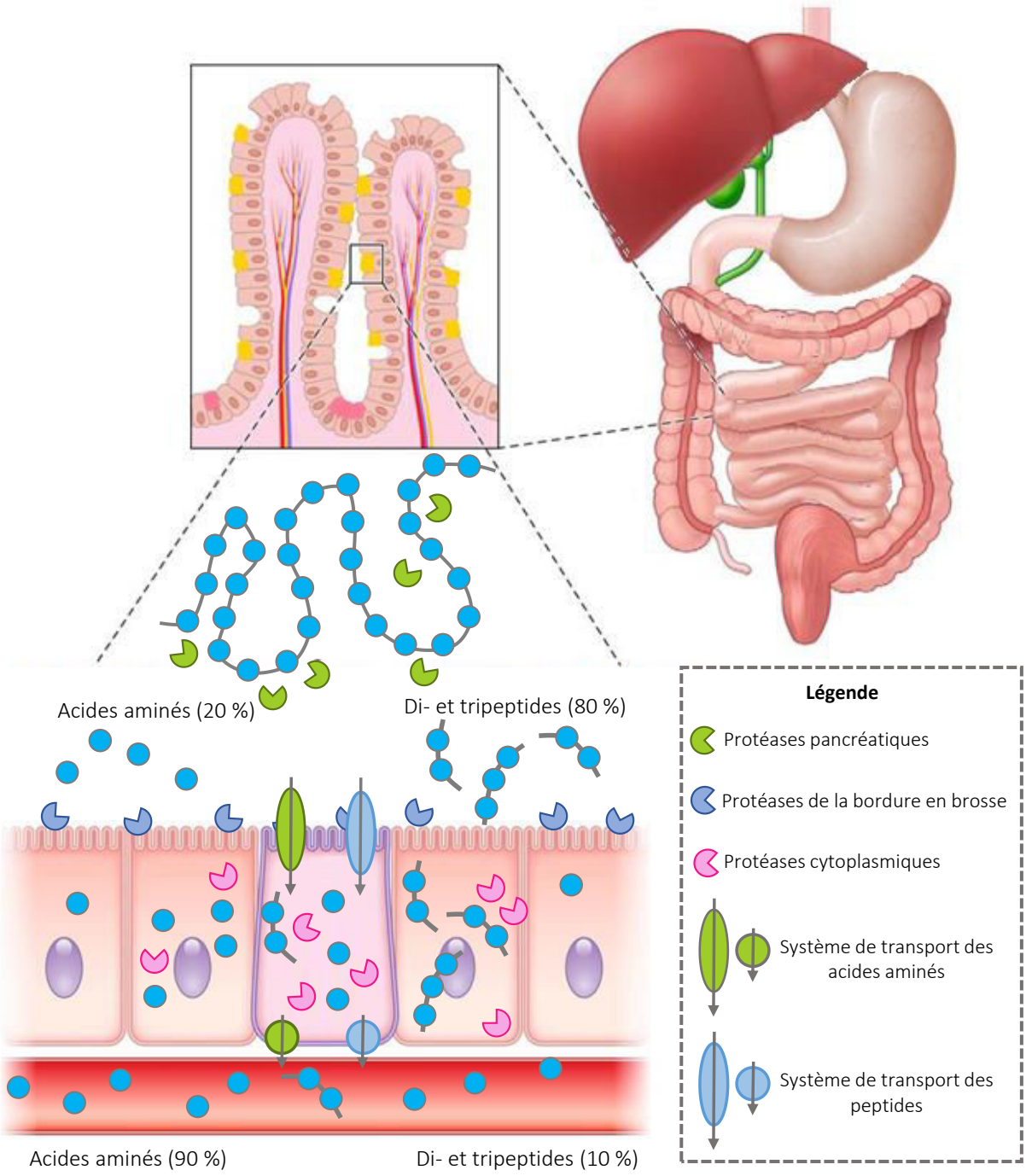


Figure 99 : Schéma bilan de la digestion et de l'absorption des protéines chez l'homme

2.1.4. Paramètres influençant la digestibilité des protéines

Malgré l'efficacité de la digestion, l'intégralité des protéines ingérées n'est pas absorbée. La digestibilité d'une protéine est notamment dépendante de sa structure et de la facilité à hydrolyser ses liaisons peptidiques. Les protéines fibreuses composées de longues chaînes peptidiques comme le collagène, la kératine et l'élastine sont relativement insolubles. Cela les rend

moins digestibles. À l'inverse, les protéines globulaires (caséine, globulines ou albumines par exemple), qui présentent une structure enroulée compacte, sont solubles et donc plus digestibles. La digestibilité apparente est calculée en prenant en compte l'azote trouvé dans les fèces par rapport à l'azote ingéré (Bhutta et Sadiq, 2013). Mais une partie non négligeable de l'azote fécal étant issue des pertes endogènes intestinales, une mesure plus appropriée a été introduite. Il s'agit de la digestibilité protéique vraie, qui prend en compte les pertes protéiques endogènes. Elles sont estimées à environ 12 $mg.kg^{-1}.j^{-1}$ chez l'adulte, mais varient selon le contenu du bol alimentaire.

En général, le lait et les œufs sont les sources dont les protéines sont les plus digestibles, avec environ 97 % de protéines digestibles (Tableau 26). Elles sont suivies par la viande et les poissons. Les protéines issues des plantes et des légumineuses sont les moins digestibles (digestibilité comprise entre 75 et 85 %). Le régime alimentaire des pays développés repose principalement sur des protéines très digestibles d'origine animale et végétale, alors que le régime des pays en développement est plutôt basé sur des protéines peu digestibles et riches en facteurs antinutritionnels. Les facteurs antinutritionnels peuvent être endogènes ou formés durant un traitement thermique ou alcalin.

Tableau 26 : Valeurs illustrant la digestibilité de protéines chez l'homme, d'après Bhutta et Sadiq (2013)

Produit	Digestibilité vraie (%)
Œufs	97
Lait et fromages	95
Viandes et poissons	94
Maïs	85
Flocons d'avoine	86
Blé complet	86
Blé raffiné	96
Riz poli	88
Farine soja	86
Isolat de soja	94
Haricots	78

2.1.4.1. Effet des inhibiteurs de la trypsine

De nombreux produits alimentaires, et notamment les légumineuses, les céréales, les pommes de terre et les tomates, contiennent des inhibiteurs de la trypsine, de la chymotrypsine, de la carboxypeptidase, de l'élastase ou encore de l'α-amylase (Friedman et Brandon, 2001). La plus riche source en inhibiteurs est le soja (Tableau 27).

Tableau 27 : Teneur en inhibiteurs de la trypsine de différents produits, d'après Gilani et *al*. (2012)

Produit	Concentration ($mg.g^{-1}$)	Concentration ($mg.g^{-1}$ de protéines)
Graines de soja brutes	16,7 - 27,2	34,7 - 122,6
Farine de soja brute	28,0 - 32,0	57,8
Farine de soja grillée	7,9 - 9,4	-
Concentrat de protéines de soja	5,4 - 7,3	8,4 - 11,2
Isolat de protéines de soja	1,2 - 30,0	1,4 - 29,4
Tofu	0,6	9,2
Sauce soja	0,3	3,3
Miso	4,1	22,9
Pois (cultivars variés)	2,0 - 12,5	-
Haricot rouge	4,6	-

Les inhibiteurs de protéases isolées du soja sont classés en deux catégories :

- Les inhibiteurs « Kunitz » ont une masse moléculaire d'environ 21,5 kDa, ils possèdent deux ponts disulfures et agissent principalement contre la trypsine,
- Les inhibiteurs « Bowman-Birk » ont une masse moléculaire d'environ 8 kDa, ils possèdent une grande quantité de ponts disulfures et la capacité d'inhiber la chymotrypsine et la trypsine.

Il existe d'autres variants mineurs de ces deux types d'inhibiteurs qui diffèrent dans la longueur de leur séquence en acides aminés, leur spécificité, leur mobilité électrophorétique ou encore leur sensibilité à l'inactivation thermique (Liener, 1994).

La majorité des inhibiteurs de la trypsine est localisée avec les protéines de réserve au niveau du cotylédon (Anderson et Wolf, 1995). Ainsi, lors de la production de farine crue, la concentration en inhibiteurs est accrue. Mais du fait de leur nature protéique, les inhibiteurs de la trypsine peuvent être facilement inactivés par extrusion, rayonnements infra-rouges, ébullition, traitement à la vapeur (Gatel, 1994) ou bien éliminés par fractionnement (Friedman et Brandon, 2001). L'inactivation thermique de ces inhibiteurs dépend de leur concentration endogène initiale, de la température, de la durée du traitement thermique, de la taille des particules, de l'humidité et probablement de l'espèce cultivée (Friedman et Brandon, 2001 ; Gatel, 1994 ; Liener, 1994).

La plupart des produits commerciaux à base de soja (concentrat, isolat, formule infantile, boisson ou miso) subissent un traitement thermique suffisant pour inactiver plus de 80 % des inhibiteurs présents dans la farine brute (Liener, 1994). L'application d'un traitement thermique prolongé, qui permettrait la destruction intégrale des inhibiteurs, affecterait négativement la digestibilité protéique et la qualité des produits (Rackis, 1974). En l'absence de législation, il n'existe

pas de garantie quant à la teneur en inhibiteur d'un produit commercial donné. Plusieurs boissons commerciales analysées présentent par exemple des quantités significatives d'inhibiteurs (elles contiennent entre 64 et 71 % de la teneur initiale du soja brut) contre la trypsine bovine et humaine (Gilani *et al.*, 2012). De la même façon, les inhibiteurs présents dans certaines formulations infantiles à base de soja conservent encore 28 % de leur activité (Peace *et al.*, 1992).

Chez l'animal, l'exposition à des inhibiteurs de la trypsine tend aussi à faire augmenter la synthèse et la sécrétion des protéases (trypsine, chymotrypsine et élastase) tout en provoquant une hypertrophie et hyperplasie pancréatique. La trypsine et la chymotrypsine, riches en acides aminés soufrés, sont synthétisés au détriment des protéines des tissus corporels puis éliminés via les fèces (Friedman et Brandon, 2001). La digestibilité des protéines et des acides aminés est négativement affectée par la présence d'inhibiteurs de la trypsine (Gilani *et al.*, 2012).

2.1.4.2. Effet des tannins

Les tannins sont des composés phénoliques naturellement solubles dans l'eau ayant la capacité de complexer et de précipiter les protéines en solution aqueuse (Jansman *et al.*, 1994). Leur masse moléculaire est comprise entre 0,5 et 3 kDa et ils sont présents chez différentes espèces végétales, et notamment dans les céréales et les légumineuses (Tableau 28).

Tableau 28 : Teneur en tanins de différents produits, d'après Gilani *et al.* (2012)

Produit	Concentration ($g.kg^{-1}$)
Pois chiche	0,6 - 2,7
Pois	0,6 - 10,5
Haricot sec	0,3 - 12,6
Féverole	0,5 - 24,1
Sorgho	0,5 - 72,0
Orge	5,5 - 12,3

Les tannins sont généralement classés en « hydrolysables » ou « condensés » (Jansman *et al.*, 1994). Les formes hydrolysables sont facilement hydrolysées par traitement acide, alcalin ou enzymatique, tandis que les formes condensées sont des produits polymérisés de flavan-3-ol et flavan-3,4-diol résistants à l'hydrolyse. Les tannins condensés sont la principale forme de polyphénols retrouvée dans les produits alimentaires de consommation courante (Salunkhe *et al.*, 1990).

Les produits alimentaires contenant une quantité importante de tannins incluent le sorgho, le millet, différents types de pois et de haricots et certaines légumineuses. Dans le but de réduire

le contenu tannique des produits alimentaires, différents traitements technologiques (décorticage, trempage dans des solutions aqueuses ou alcalines, additions de produits chimiques ayant une forte affinité pour les tannins ou germination) ont été étudiés. Mais la plupart de ces traitements sont coûteux, laborieux et inefficaces (Gilani *et al.*, 2012). Plus récemment, la manipulation génétique a permis de créer un cultivar de féverole présentant une teneur réduite en tannins (Crépon *et al.*, 2010).

Les tannins ont notamment la capacité de se lier par liaisons hydrogène et associations apolaires hydrophobes aux protéines de certaines céréales (sorgho, seigle, orge par exemple). Les liaisons entre les tannins et l'albumine, la globuline et principalement la prolamine rendent ces fractions insolubles, et donc peu digestibles. Cela s'explique aussi par un effet d'encombrement stérique des tannins, ainsi que par un changement conformationnel des protéines, qui les rendent moins accessibles aux protéases (Duodu *et al.*, 2003).

2.1.4.3. Effet de l'acide phytique

L'acide phytique est une substance naturelle retrouvée dans les graines, les céréales et les noix (Tableau 29) (Harland et Oberleas, 1987 ; Ravindran *et al.*, 1999).

Tableau 29 : Teneur en acide phytique de différents produits, d'après Gilani *et al.* (2012)

Produit	Concentration ($g.kg^{-1}$)	Concentration ($g.kg^{-1}$ de protéines)
Riz sauvage	22	-
Blé	6	53
Sorgho	7	101
Tourteau de tournesol	27	89
Maïs	7	88
Soja	26	-
Farine de soja	10 - 20	20 - 37
Isolat de protéines de soja	10 - 20	11 - 22
Haricot commun (non extrudé)	8 - 11	459 - 578
Haricot commun (extrudé)	7 - 8	351 - 423
Lentille	7	27

Elle est une source de minéraux et d'inositol utilisés durant la germination et se présente dans les tissus de la plante sous la forme de cations mono- et divalents comme le magnésium, le calcium, le sodium et le potassium (Lott *et al.*, 2000). Les phytates, avec leurs abondants groupes phosphates chargés négativement, sont surtout connus pour chélater certains nutriments essentiels dans le tractus gastro-intestinal et les rendre moins biodisponibles (Reddy, 2001). Ils

peuvent d'ailleurs influencer négativement l'activité de certaines enzymes digestives (carboxypeptidase et aminopeptidases) par la chélation de cofacteurs minéraux ou par interaction directe avec l'enzyme ou son substrat. La liaison entre les phytates et les protéines peut être directe ou indirecte. Ces interactions complexes varient avec le pH, le temps et les concentrations relatives. Au pH gastrique, l'acide phytique forme des liaisons électrostatiques avec les résidus d'arginine, de lysine et d'histidine dont résultent des complexes insolubles (Ravindran *et al.*, 1999). Au-dessus de leur point isoélectrique (pH rencontré dans l'intestin grêle par exemple), les protéines peuvent former des interactions avec les phytates en impliquant un cation (calcium généralement) (Selle *et al.*, 2000).

La répartition des phytates étant inégale dans les différentes parties de la graine, les traitements éliminant ou concentrant certaines parties peuvent entrainer des changements drastiques dans la teneur du produit fini (Gilani *et al.*, 2012). En outre, les phytates sont relativement stables à la chaleur, contrairement aux phytases (enzymes hydrolysant les phytates) qui sont thermolabiles (Ryden et Selvendran, 1993). Seule l'extrusion permettrait de réduire de 20 à 30 % la teneur en phytate de haricots communs (Batista *et al.*, 2010).

2.1.4.4. Effet des composés de Maillard

La réaction de Maillard est une série de réactions impliquant une protéine (et plus particulièrement la fonction amide d'un acide aminé) et un glucide (via son groupement carbonyle). Étant donné que la majorité des produits alimentaires contiennent à la fois des glucides et des protéines, les produits de réaction de Maillard (PRM) sont présents dans l'alimentation quotidienne en quantités considérables. Les produits d'Amadori sont formés à un stade précoce, tandis que les mélanoïdines, sont formées à un stade plus avancé de la réaction (Somoza, 2005) (Figure 100).

Les conséquences de la consommation de tels produits sur la santé humaine ont été largement étudiées ces dernières années. Il semblerait qu'un régime riche en PRM durant 2 à 6 semaines tende à accélérer le stress oxydatif, l'inflammation et les mécanismes liés à la régulation du glucose, notamment pour les populations les plus vulnérables, à savoir les diabétiques et les insuffisants rénaux. Globalement, de récentes études confirment l'effet délétère des PRM alimentaires sur la santé d'adultes en bonne santé (Tessier et Birlouez-Aragon, 2012). En plus de présenter un risque pour la santé, les PRM possèdent aussi un effet antinutritionnel.

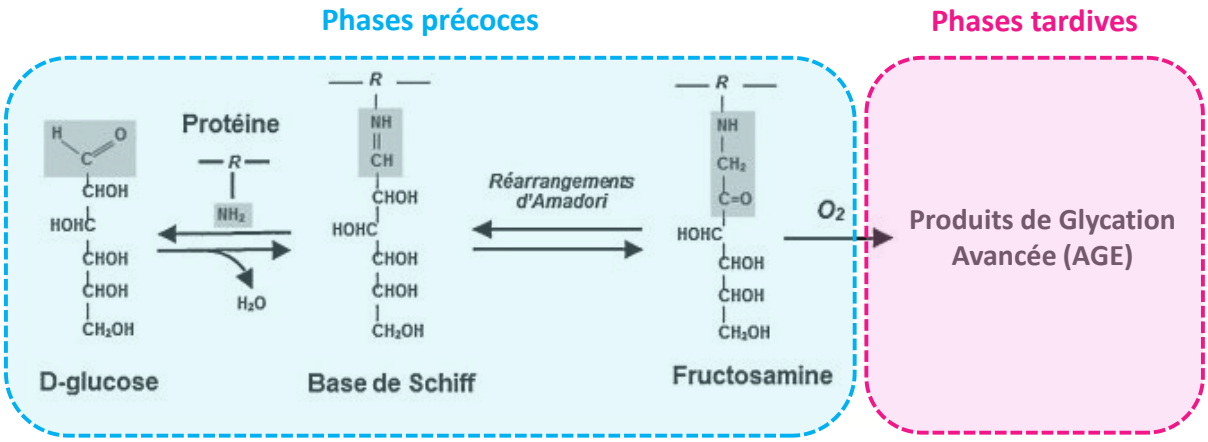


Figure 100 : Schéma simplifié de la réaction de Maillard, adapté de Wautier *et al.* (2014)

L'effet antinutritionnel des composés de Maillard a principalement été étudié chez le rat, et assez peu chez l'homme (Finot, 1990). Une étude a tout de même été réalisée chez des adolescents (Seiquer *et al.*, 2006), population considérée à risque du fait de leurs habitudes alimentaires (snacks et fast-food riches en composés de Maillard) et de leurs besoins physiologiques importants. Après deux semaines de consommation de repas riches en composés de Maillard, l'excrétion fécale en azote est accrue (+ 47 %), tandis que l'absorption en azote diminue (- 12 %) tout comme sa digestibilité (- 6 %). Il a été conclu qu'un régime riche en composés de Maillard affecte négativement la digestibilité des protéines et que les effets à long terme de ce type de régime dans l'adolescence devraient être étudiés.

Les procédés utilisés pour la préparation des formulations infantiles (stérilisation, séchage par pulvérisation et upérisation à haute température (UHT)) provoquent la formation de PRM dans le lait (Rudloff et Lönnerdal, 1992). Contrairement aux autres traitements, la stérilisation classique cause une dénaturation irréversible des protéines. Des analyses *in vitro* démontrent que la digestibilité de ces protéines est alors beaucoup plus faible. La teneur en lysine disponible est aussi plus faible pour les produits ayant subi une stérilisation classique que pour ceux ayant subi une pulvérisation ou un traitement UHT. Cela s'explique par une température de traitement élevée, une humidité importante, ainsi que la présence de lactose et de protéines riches en lysine (Sarwar *et al.*, 1989). Les conséquences nutritionnelles de la consommation de produits laitiers contenant une teneur importante en lactulose-lysine chez le porc ont été étudiées (Rérat *et al.*, 2002). Les conséquences ont été une diminution de la digestibilité de la plupart des acides aminés, et notamment de la lysine, et donc une diminution de la valeur nutritive du produit.

2.1.4.5. Effet de la racémisation

L'exposition de protéines alimentaires à des traitements thermiques et/ou alcalins entraine deux modifications chimiques majeures : la racémisation des acides aminés (conversion d'acides aminés de série L en série D) et la formation de lysinoalanine (Mendel Friedman, 1999). La racémisation est nutritionnellement importante étant donné que les acides aminés de la série D sont absorbés plus lentement que ceux de la série L, et même absorbés, la plupart des isomères D des acides aminés indispensables ne sont pas utilisables chez l'homme. Les liaisons peptidiques impliquant un acide aminé D sont aussi plus résistantes à l'hydrolyse que celles impliquant deux résidus de série L. La racémisation d'acides aminés est considérée comme un prélude à la formation de liaisons isopeptidiques qui diminuent la digestibilité de la protéine (Duodu *et al.*, 2003). Naturellement, seulement certains insectes, vers et invertébrés marins contiennent une quantité substantielle d'acides aminés D, mais ce ne sont pas des composants majeurs du régime alimentaire humain (Gilani *et al.*, 2012). Certains traitements appliqués à d'autres produits alimentaires peuvent cependant aboutir à la formation de tels acides aminés (Payan *et al.*, 1985). Le lait écrémé en poudre, le yaourt et les formulations laitières infantiles peuvent par exemple contenir respectivement 2,15 ; 3,12 et 4,95 % d'acide aspartique D. Des ratios plus importants sont observés pour les protéines de soja texturées (plus de 13 %), les protéines de soja ou de maïs traitées thermiquement en milieu alcalin (respectivement 27,7 et 40,2 %) (Masters et Friedman, 1980). En général, les acides aminés indispensables ne se racémisent qu'en étant exposés à d'importantes températures (Gilani *et al.*, 2012).

La lysinoalanine (LAL) est généralement formée lorsque les protéines sont sujettes à un traitement alcalin (Struthers *et al.*, 1979). Mais des traitements thermiques dans des conditions non-alcalines pourraient aussi provoquer la formation de LAL. Sa synthèse est rendue possible grâce à la liaison d'un résidu de lysine à la double liaison d'un résidu de déshydroalanine généré par la réaction d'élimination d'un résidu de cystine, de phosphosérine ou de glycosérine (Masters et Friedman, 1980). La teneur en LAL formée est dépendante de la température, du pH, de la température réactionnelle, du type de protéine et du type de cation présent dans la solution (Struthers *et al.*, 1979). Bien que de nombreux produits alimentaires courants subissent des traitements thermiques en milieu alcalin, assez peu de données existent quant à leur teneur en LAL (Tableau 30).

Tableau 30 : Teneur en lysinoalanine de produits alimentaires communs, d'après Gilani *et al.* (2012)

Produit	Concentration en LAL (ppm)
Saucisse	0 - 170
Poulet	370
Œuf	160 - 1820
Chips de maïs	390
Bretzel	220 - 500
Riz (poli)	1000
Formulation infantile (poudre)	150 - 920
Formulation infantile (concentrat liquide)	160 - 2120
Lait concentré	150 - 860
Poudre de lait	150 - 620
Lait stérilisé	200 - 1160
Isolat de protéines de soja	370 - 1300
Caséinate de sodium	430 - 6900
Agent fouettant	6500 - 53150

Les données varient aussi largement en fonction des traitements thermiques appliqués. Des cuissons domestiques peuvent produire jusqu'à 1820 ppm de LAL dans des produits tels que les saucisses, les œufs ou le poulet, initialement exempts de ce composé. Les laits stérilisés et les poudres de lait peuvent contenir jusqu'à 1160 ppm, tandis que certaines formulations infantiles sous forme de concentrats liquides peuvent en contenir jusqu'à 2120 (Gilani *et al.*, 2012). Les formulations infantiles étant généralement l'unique source de protéines chez l'enfant durant une longue période, la teneur de ce type de produit devrait être maintenue en deçà de 200 ppm (Friedman, 1999). Les ingrédients riches en protéines (blancs d'œufs en poudre, isolat de protéines de soja, caséinates de sodium) contiennent potentiellement des teneurs significatives en LAL (jusqu'à 6900 ppm) (Gilani *et al.*, 2012). La racémisation des acides aminés présente des effets délétères sur la digestibilité des protéines, la qualité et la sécurité des produits manufacturés. Après absorption, les acides aminés D peuvent être rendus utilisables par l'action de la racémase, de l'épimérase ou de la D-aminoacide oxydase (DAAO) (Mendel Friedman, 1999). Le système DAAO peut arriver à saturation lorsque les produits consommés contiennent trop d'acides aminés D. Aussi, l'hydrolyse de peptides présentant des acides aminés D est plus lente que ceux ne présentant que des acides aminés L. Cela génère des formes d'acides aminés biologiquement non utilisables car peu accessibles aux enzymes protéolytiques. Les protéines racémisées peuvent aussi entrer en compétition avec les protéines non racémisées pour les sites actifs des protéases et ainsi affecter négativement l'utilisation des autres protéines (Pappenheimer *et al.*, 1997). La formation de LAL

dans les produits alimentaires entraine une perte en acides aminés essentiels (lysine, cystéine et thréonine) et induit une baisse de la digestibilité des protéines. La LAL pourrait aussi provoquer des dommages rénaux en fonction de la dose et du type de molécules (peptides ou acides aminés libres) (Sternberg *et al.*, 1975). Cette molécule est en effet un puissant chélateur de minéraux (calcium, fer, cuivre et zinc) et peut ainsi exercer un effet toxique au niveau des cellules rénales. L'altération de l'absorption de ces minéraux devient aussi problématique pour des populations telles que les enfants ou les personnes âgées (Gilani *et al.*, 2012). L'effet néphrotoxique de la LAL ayant seulement été observé à long terme chez l'animal, la consommation de faibles teneurs chez l'homme pourrait ne pas être néfaste (Friedman, 1999). Mais des données analytiques sont nécessaires pour statuer quant aux actuelles quantités consommées (International Life Sciences Institute, 1989). De même, l'influence d'une consommation chronique de LAL sur l'absorption des minéraux nécessiterait d'être étudiée (Gilani *et al.*, 2012).

2.1.5. Évaluation de la qualité d'une protéine

Du fait de leur origine, de leur composition en acides aminés ou encore de leur biodisponibilité, les protéines ne sont nutritionnellement pas équivalentes. L'évaluation de la qualité consiste à déterminer la capacité d'une source protéique ou d'un produit à satisfaire les besoin en acides aminés et en azote de l'organisme (WHO/FAO/UNU, 2007). Cette capacité dépend non seulement de la composition en acides aminés indispensables, mais aussi de leur digestibilité et du métabolisme des acides aminés absorbés. La biodisponibilité de chaque acide aminé indispensable est donc un facteur majeur de variation de la qualité nutritionnelle de différentes protéines alimentaires. L'approche recommandée par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation Mondiale de la Santé (FAO/WHO, 1990 ; FAO/WHO/ONU, 1985) repose sur la comparaison de la composition des protéines alimentaires en acides aminés indispensables à une composition de référence, ainsi que sur la détermination de leur digestibilité. Cela permet de comparer la valeur nutritionnelle de différentes sources de protéines entre elles (AFSSA, 2007). Cette mesure tient compte des besoins spécifiques liés à la croissance, à la gestation et à l'allaitement. À l'avenir, l'évaluation de la qualité des protéines devrait aussi tenir compte des besoins liés au vieillissement, à la pratique d'une activité physique et à la perte de poids. Depuis les années 1950, la FAO discute des méthodes d'évaluation de la qualité des protéines. Le score chimique de digestibilité (SCCD) a été choisi comme méthode de référence en 1991. Il prend en compte la composition de la protéine en acides aminés indispensables (indice chimique), ainsi que sa digestibilité.

L'indice chimique consiste à exprimer la teneur de chaque acide aminé indispensable en pourcentage d'une protéine de référence. La valeur de plus faible pourcentage (correspondant à l'acide aminé limitant) constitue l'indice chimique de la protéine étudiée. La protéine d'œuf a été initialement adoptée comme protéine de référence. Par la suite, quatre profils-types ont été établis (nourrisson, enfant préscolaire, adolescent et adulte) par la FAO (FAO/WHO/ONU, 1985). Les estimations des besoins en acides aminés indispensables étant très proches pour les adolescents et les adultes, seuls trois profils (nourrissons, enfants et adultes) ont finalement été conservés (FAO, 2013) (Tableau 31).

Tableau 31 : Composition des protéines de référence, d'après la FAO (2013)

	Nourrisson ($mg.g^{-1}$ de protéines)	Enfants ($mg.g^{-1}$ de protéines)	Adultes ($mg.g^{-1}$ de protéines)
Histidine	21	20	16
Isoleucine	55	32	30
Leucine	96	66	61
Lysine	69	57	48
Méthionine + cystine	33	27	23
Phénylalanine + Tyrosine	94	52	41
Thréonine	44	31	25
Tryptophane	17	8,5	6,6
Valine	55	43	40

La méthode de l'indice chimique permet de connaitre le ou les acide(s) aminé(s) limitant(s) et de calculer simplement la quantité de protéines utilisables dans une ration alimentaire donnée. Elle est rapide et moins coûteuse que les méthodes *in vivo* mais suppose que la valeur protéique soit directement et uniquement proportionnelle à la quantité disponible de l'acide aminé limitant. Or, il est probable que les autres acides aminés présents en quantité supérieure aux besoins aient un effet sur l'utilisation de l'acide aminé limitant. Aussi, la méthode ne tient pas compte de la digestibilité de la protéine et de la biodisponibilité des acides aminés (AFSSA, 2007).

La notion de digestibilité d'une protéine prend en compte sa capacité à libérer ses acides aminés dans la lumière intestinale et à en permettre l'absorption. Elle est étudiée par des méthodes *in vitro* et des méthodes *in vivo* chez l'animal et l'homme. Différentes méthodes *in vitro* ont ainsi été développées : elles sont généralement basées sur la mesure de la libération des acides aminés après exposition de la protéine à l'action d'une ou plusieurs protéases dans des conditions standardisées. Différents systèmes enzymatiques ont été utilisés : pepsine-pancréatine (Akeson et Stahmann, 1964), papaïne (Buchanan, 1969), papaïne-trypsine (Saunders *et al.*, 1973),

trypsine-chymotrypsine-peptidase (Hsu *et al.*, 1977). Les résultats obtenus avec ces enzymes s'accordent assez bien avec les données de digestibilité *in vivo* obtenues chez le rat. Des méthodes *in vitro* plus élaborées consistent en une pré-hydrolyse pepsique suivie d'une digestion par la pancréatine associée à une dialyse en continu des produits libérés. Les dialysats sont considérés comme la fraction protéique qui est digestible et susceptible d'être absorbée (AFSSA, 2007). La méthode *in vivo* la plus classique consiste à comparer l'azote ingéré à celui retrouvé dans les fèces. Il s'agit du coefficient de la digestibilité fécale apparente. Mais l'azote fécal résultant aussi de la digestion des protéines endogènes et de l'activité métabolique de la flore colique, cette méthode n'est pas idéale. Ainsi, deux groupes d'acides aminés se distinguent par leur métabolisme colique. Le premier groupe comprend l'acide aspartique, la thréonine, la proline, la glycine et le tryptophane. Ils subissent une désamination et une dégradation importante dans le côlon. Le second groupe est composé de la méthionine, la leucine, l'isoleucine, la valine et la lysine. Ils sont synthétisés dans le côlon (Sauer et Ozimek, 1986). Or, ces synthèses et ces dégradations diffèrent au niveau iléal. C'est la raison pour laquelle la digestibilité iléale est un meilleur descripteur de la digestibilité des acides aminés et des protéines alimentaires. Chez certains animaux pour lesquels il est difficile d'utiliser des canules iléales (rats notamment), il est possible de recourir à la digestibilité caecale (AFSSA, 2007).

Depuis 1991, le SCCD, calculé à partir de l'indice chimique et de la digestibilité de la protéine, est considéré comme le critère de base pour rendre compte de manière simple de la qualité protéique. Il peut être utilisé pour évaluer la capacité d'un régime alimentaire à satisfaire les besoins en acides aminés indispensables, ainsi que pour évaluer la qualité d'une source protéique particulière. Dans le deuxième cas, une valeur de SCCD inférieure à 100 % signifie que la source protéique ne satisfait pas les besoins en acides aminés indispensables recommandés. Cette source protéique doit par conséquent être complétée par un apport de l'acide aminé limitant. C'est notamment le cas de la lysine dans les céréales ou des acides aminés soufrés dans certaines légumineuses. Pour une valeur de SCCD supérieure à 100 %, la source protéique apporte les acides aminés indispensables à un niveau supérieur aux besoins pour un apport en protéines répondant à l'apport nutritionnel recommandé. Cette protéine est alors une source d'acides aminés essentiels et peut compléter une source déficiente. C'est souvent le cas des protéines d'origine animale (AFSSA, 2007).

Le SCCD présente tout de même un certain nombre de limitations. L'estimation de la digestibilité des protéines, généralement basée sur le coefficient de digestibilité fécale apparente,

est surestimée. Cela tend à atténuer les différences existantes entre les protéines très digestibles et celles peu digestibles. À l'inverse, le SCCD étant limité à une valeur de 1,0 (soit 100 % des besoins couverts), cela sous-estime la valeur nutritionnelle des protéines de bonne qualité. Enfin, le SCCD tend à surestimer la qualité des protéines contenant des facteurs antinutritionnels et ne tient pas compte de la biodisponibilité de certains acides aminés susceptibles d'être endommagés lors de la transformation des aliments. C'est par exemple le cas de la lysine, qui peut devenir biologiquement indisponible à la suite de traitements technologiques. Très récemment, un rapport de la FAO a proposé une nouvelle méthode d'évaluation des protéines alimentaires : le « Digestible Indispensable Amino Acid Score » (DIAAS). Cette méthode tente d'utiliser les meilleures informations scientifiques actuellement disponibles pour décrire précisément la façon dont chaque source de protéine alimentaire peut répondre aux besoins humains. Ainsi, le DIAAS se concentre sur la digestibilité de chaque acide aminé, et non sur la digestibilité de la protéine entière. Cette digestibilité est mesurée au niveau de l'iléon terminal et non au niveau colique comme le SCCD. Cela rend compte de façon plus précise de la quantité d'acides aminés réellement absorbés. Contrairement au SCCD, le DIAAS n'est pas normé à une valeur de 1, ce qui permet d'être plus discriminant pour les protéines de haute qualité. Enfin, le DIAAS vise à déterminer plus précisément la lysine biodisponible. Le rapport de la FAO note tout de même que pour l'heure, les données sont encore insuffisantes pour une application immédiate du DIAAS. Des recherches, portant notamment sur la digestibilité iléale des protéines chez les animaux et l'homme, devront être menées. Ainsi, pour encore quelques années, le SCCD restera en pratique la méthode de base pour l'évaluation de la qualité des protéines alimentaires.

2.2. Résultats et discussion

Malgré un système de digestion et d'absorption complexe et coordonné, entre 4 et 22 % des protéines d'un régime alimentaire échappent au mécanisme d'absorption. De ce point de vue, toutes les protéines ne sont pas équivalentes : leur digestibilité dépend notamment de leur structure et de leur richesse en facteurs antinutritionnels. Or, les protéines sont fonctionnellement et structurellement indispensables à l'homme. Il est donc primordial d'évaluer la qualité des protéines entrant dans la composition des formulations industrielles. Pour ce faire, la digestibilité des 6 préparations protéiques les plus communément utilisées sera dans un premier temps évaluée. Cela permettra, à terme, de calculer le score chimique corrigé de digestibilité de chacune d'entre elles. Dans un second temps, la digestion de ces préparations sera suivie par SDS-PAGE (pour les plus gros peptides et les protéines) et par une réaction à la ninhydrine (pour les petits peptides et les acides aminés).

2.2.1. Composition chimique des isolats protéiques

La composition chimique des différents isolats protéiques sélectionnés pour cette étude est présentée en Tableau 32.

Tableau 32 : Composition chimique des différents isolats protéiques

Origine	Eau (%)	Lipides (%)	Protéines (%)	Glucides (%)	Minéraux (%)
Caséines	6,2 ± 0,4	5,9 ± 0,7	83,2 ± 1,1	0,0 ± 0,0	4,7 ± 0,8
Lait	7,5 ± 0,2	0,8 ± 0,1	74,7 ± 2,8	10,3 ± 0,9	6,7 ± 1,7
Œuf	5,7 ± 0,3	9,0 ± 0,8	82,8 ± 0,7	0,0 ± 0,0	2,5 ± 0,7
Pois	7,2 ± 0,2	5,3 ± 0,7	83,6 ± 1,4	0,1 ± 0,8	3,8 ± 0,8
Protéines sériques	6,6 ± 0,2	5,3 ± 1,1	80,3 ± 2,0	5,3 ± 0,7	2,5 ± 1,1
Soja	5,5 ± 0,2	4,6 ± 0,8	86,1 ± 0,6	0,8 ± 1,1	3,0 ± 1,2

La teneur en protéines des différentes préparations protéiques varie de façon non négligeable : alors que le concentrat de protéines de lait présente une teneur d'environ 75 %, l'isolat de protéines de soja présente quant à lui une teneur légèrement supérieure à 86 %. Cette différence s'explique principalement par une variation de la teneur en glucides. En effet, le concentrat de protéines de lait, tout comme celui de protéines sériques, est particulièrement riche en lactose, contrairement à l'isolat de caséines et aux protéines d'origine végétale. La teneur en lipides varie aussi selon les préparations : alors que le concentrat de protéines de lait en est quasiment exempt (0,8 %), les protéines de blancs d'œuf en sont particulièrement riches (9 %). Ces

données devront bien sûr être prises en compte lors de l'étude de la digestibilité de ces préparations.

2.2.2. Evaluation de la qualité des isolats protéiques (SCCD)

Actuellement, le score chimique corrigé de la digestibilité (SCCD) est la méthode de référence pour l'évaluation de la qualité des protéines. Elle tient notamment compte de l'indice chimique de la protéine, ainsi que de sa digestibilité. Ainsi, ce score chimique sera calculé pour chacune des préparations protéiques étudiées. D'autre part, les traitements thermiques étant connus pour influencer la digestibilité des protéines, la digestibilité des préparations protéiques sera aussi étudiée après le traitement thermique « type ». De même, l'influence de l'ajout d'un mélange enzymatique riche en protéases sur la digestibilité des protéines est étudiée.

2.2.2.1. Évaluation de la digestibilité des préparations protéiques

2.2.2.1.1. Protéines natives

La digestibilité des préparations protéiques natives a tout d'abord été étudiée. Cela correspond aux protéines telles qu'elles sont retrouvées dans les formulations de types 1 et 2. Les résultats sont donnés en Figure 101.

*PS : Protéines sériques

Figure 101 : Comparaison de la digestibilité des préparations protéiques

D'après la Figure 101, la digestibilité des différentes préparations protéiques est du même ordre de grandeur : elle est comprise entre 81 et 90 % environ. La poudre de blanc d'œuf, avec une digestibilité de 81,5 %, est significativement moins digestible ($P < 0,001$) que les autres préparations

protéiques. Sa digestibilité est tout de même similaire aux données retrouvées dans la littérature et obtenues par des méthodes similaires (Hank *et al.*, 2001 ; Pedersen et Eggum, 1983). Il semblerait tout de même que ce type de méthode *in vitro* tende à sous-estimer la valeur réelle de digestibilité. Ainsi, la digestibilité vraie d'œufs cuisinés serait plus proche de 90 % (D'Mello, 2012).

Le concentrat de protéines de lait, qui présente une digestibilité de 87,2 %, est quant à lui significativement moins digestible ($P < 0,001$) que les préparations protéiques issues de caséines, de pois, de protéines sériques et de soja. Il est probable que cette différence provienne de sa faible teneur en protéines (74,7 %). Ces résultats de digestibilité sont par ailleurs en adéquation avec ceux retrouvés *in vivo*, puisqu'ils sont généralement proches de 90 % (Rutherfurd *et al.*, 2015 ; WHO/FAO/UNU, 2007). D'après les résultats obtenus, 89,8 % des protéines du concentrat de protéines sériques sont digestibles. Ces résultats sont très proches de ceux retrouvés dans la littérature (Almeida *et al.*, 2015 ; Hsu *et al.*, 1977). *In vivo*, il semblerait que la digestibilité des concentrats de protéines sériques soit de l'ordre de 95 % (Rutherfurd *et al.*, 2015). Enfin, la poudre de caséinates de calcium présente la digestibilité la plus élevée, avec 90,1 %. Cette valeur est légèrement supérieure à celle généralement retrouvée *in vitro* pour le même type de produit (Almeida *et al.*, 2015), mais légèrement inférieure aux valeurs retrouvées *in vivo* (Rutherfurd *et al.*, 2015).

L'isolat de protéines de soja présente quant à lui une digestibilité de 87,8 %. Cette digestibilité étant supérieure à celle des protéines du blanc d'œuf et du concentrat de protéines de lait étudiés, il semblerait qu'il ne présente pas de facteurs antinutritionnels. Il possède d'ailleurs une digestibilité, mesurée selon le même protocole, légèrement supérieure à celle d'autres isolats de protéines de soja (Nguyen *et al.*, 2015 ; Tan *et al.*, 2014). L'isolat de protéines de pois présente une digestibilité de 90,0 %. De la même façon que pour l'isolat de protéines de soja, il semblerait que ce dernier ne contienne pas de facteurs antinutritionnels. Ces résultats concordent avec la digestibilité relevée *in vitro* (Sánchez-Vioque *et al.*, 1999) et *in vivo* (Rutherfurd *et al.*, 2015) par d'autres études.

D'après ces premiers résultats, les poudres, concentrats et isolats protéiques étudiés présentent une digestibilité très proche de celle retrouvée dans la littérature pour le même type de produit. Certains présentent même des valeurs de digestibilité supérieures à celles généralement mises en évidence par d'autres auteurs (poudre de caséinate de calcium, isolat de protéines de soja). Les isolats de protéines de soja et de pois présentent par ailleurs une excellente digestibilité, signe d'une *quasi*-absence de facteurs antinutritionnels. Cela suggère que les produits

industriels utilisés sont de bonne qualité et permettent une digestibilité optimale. Globalement, la poudre de blanc d'œuf et la poudre de protéines de lait sont tout de même significativement moins digestibles que les autres préparations.

2.2.2.1.2. Protéines traitées thermiquement

La digestibilité des protéines est largement influencée par leur structure et leur conformation. Les traitements thermiques, en modifiant ces deux paramètres, tendent donc à influencer leur digestibilité. Il semblerait par exemple que les traitements thermiques entrainent un ralentissement significatif du transit des protéines laitières. Cela s'expliquerait par une fermeté plus importante du coagulum dans l'estomac. Mais vis-à-vis de l'hydrolyse enzymatique et après traitement thermique, les deux grands types de protéines laitières (caséines et protéines sériques) présentent un comportement opposé. Les protéines sériques sont plus sensibles à l'hydrolyse enzymatique gastrique après traitement thermique. En effet, ces protéines globulaires, dont la structure native compacte les rend particulièrement résistantes aux activités protéolytiques, présentent une ouverture de leur structure tridimensionnelle qui permet l'augmentation de l'accessibilité des sites de coupures aux enzymes digestives. À l'inverse, des études *in vitro* montrent que les caséines voient leur résistance à la digestion accrue par le traitement thermique. Cette résistance s'expliquerait par la formation d'agrégats protéiques thermo-induits entre les micelles de caséine et les protéines sériques, ces derniers formant une couche protectrice à la surface des micelles (Barbe *et al.*, 2015).

Les protéines globulaires des légumineuses tendent à se comporter comme les protéines laitières solubles : les traitements thermiques, en détruisant les facteurs antinutritionnels et en augmentant l'accessibilité des sites de coupure aux enzymes protéolytiques, entrainent une augmentation de la digestibilité protéique (Rehman et Shah, 2005). Les traitements thermiques présentent par ailleurs aussi une augmentation de la digestibilité de l'ovalbumine, la protéine majeure du blanc d'œuf (Guérin *et al.*, 2012). C'est pourquoi la digestibilité des 6 préparations protéiques a été mesurée après un traitement thermique « type », à savoir un traitement au four à micro-ondes durant 1 min 30 s à 750 W. Les données sont présentées en Figure 102 et sont comparées à la digestibilité des protéines natives.

D'après la Figure 102 et après traitement statistique, **aucune différence significative n'a été observée entre la digestibilité de chaque protéine native (témoin) et de son équivalent traité thermiquement.** Cela s'explique très certainement par la douceur et la rapidité du traitement

thermique utilisé : ce dernier entraine une température maximale au cœur du produit d'environ 86 °C, ce qui n'est pas suffisant pour déclencher l'ouverture de la structure tridimensionnelle des protéines globulaires dans un temps aussi court de traitement (1 min 30 s). Généralement, les traitements thermiques étudiés dans la littérature présentent des températures largement supérieures. Ainsi, d'après ces résultats, la digestibilité des protéines présentes dans les formulations de types 3 et 4 serait identique à celles des formulations de types 1 et 2.

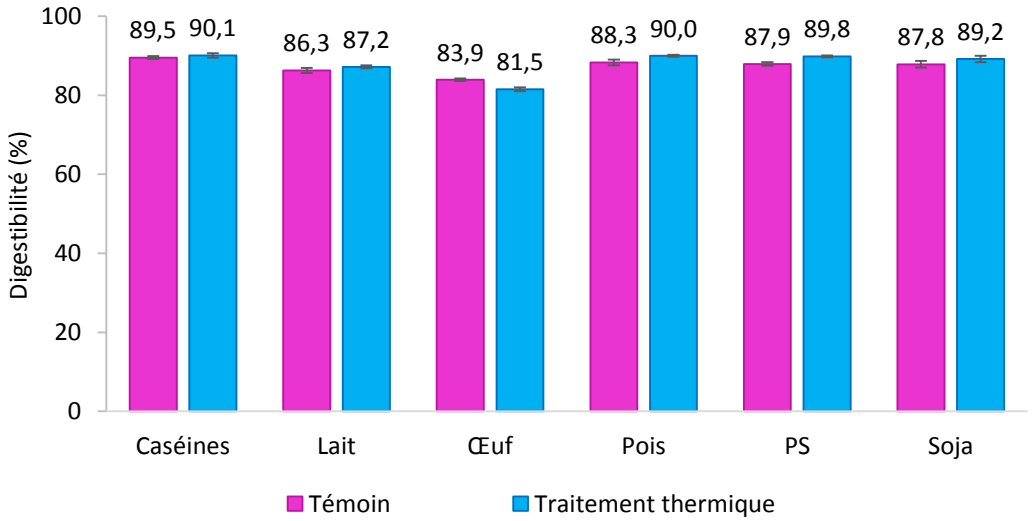


Figure 102 : Influence du traitement thermique « type » sur la digestibilité des préparations protéiques

2.2.2.1.3. Protéines traitées thermiquement en présence de lactose

Les formulations alimentaires étudiées étant réhydratées dans du lait, des composés de Maillard pourraient être formés par réaction entre le groupement carbonyle du lactose et la fonction amide d'un acide aminé. Bien que le traitement thermique « type » soit très rapide et peu puissant, la formation de produits de réaction de la phase précoce de la réaction de Maillard pourrait tout de même être envisagée. Or, l'effet antinutritionnel des composés de Maillard a notamment été mis en évidence chez le rat. Ainsi, la digestibilité des préparations protéiques a été étudiée en présence de la concentration en lactose du lait, après le traitement thermique de référence. La Figure 103 présente les résultats de cet essai, comparés à ceux obtenus en l'absence de lactose.

D'après les résultats issus de la Figure 103 et leur traitement statistique, **aucune différence significative n'est observable entre le traitement thermique effectué en présence de lactose et celui effectué sans.** Ainsi, même si le traitement thermique de référence entraine la formation de composés de Maillard en présence de lactose, ces derniers n'influencent pas négativement la digestibilité des 6 préparations protéiques étudiées. Cela atteste que les protéines présentes dans

les formulations de types 3 et 4 présentent une digestibilité identique à celles présentes dans les formulations de types 1 et 2.

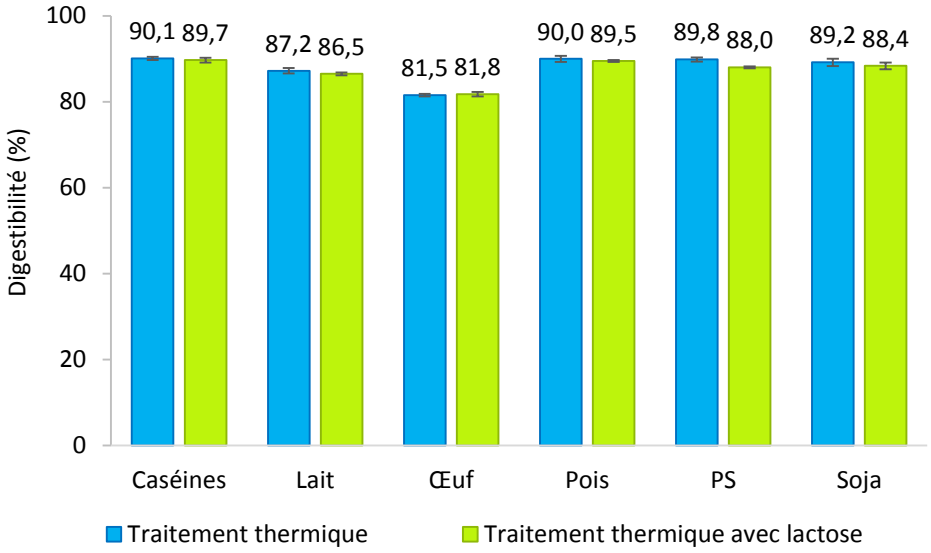


Figure 103 : Influence de la présence de lactose pendant un traitement thermique sur la digestibilité des préparations protéiques

2.2.2.1.4. Protéines traitées thermiquement en présence de bromélaïne

La bromélaïne est un extrait brut d'ananas qui contient de multiples enzymes glycosylées. Elle contient aussi d'autres éléments tels que des phosphatases, des glycosidases, des peroxydases, des cellulases, des glycoprotéines, des ribonucléases ou encore des glucides. Cet extrait est isolé de la tige de l'ananas (EC 3.4.22.32) ou de son fruit (EC 3.4.22.33). L'extrait isolé de la tige présente un large spectre d'activité : son pH optimal est compris entre 5,5 et 8 et il clive préférentiellement les liaisons peptidiques impliquant des résidus de glycine, d'alanine ou de leucine. Cette bromélaïne est généralement dénaturée à des températures proches de la température de pasteurisation. Elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique contenant entre 211 et 212 acides aminés et présentant une masse molaire de 22,8 kDa, ainsi que d'une chaîne osidique donnant une masse molaire globale à la bromélaïne issue de la tige de 23,8 kDa (de Lencastre Novaes *et al.*, 2016). D'après certaines études, la bromélaïne présenterait un large éventail de bienfaits thérapeutiques parmi lesquels l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, une activité anti-inflammatoire ou encore la modulation de la réponse immunologique (Begum *et al.*, 2015). D'après certaines études, la bromélaïne faciliterait aussi la digestion et contribuerait au confort digestif (Grabovac et Bernkop-Schnürch, 2006 ; Hale, 2004 ; Hale *et al.*, 2005 ; Malamud et Wilson, 2000). Elle est ainsi largement utilisée dans bon nombre de compléments alimentaires, et pourrait s'avérer

particulièrement utile dans les formulations industrielles hyperprotéinées. Cette dernière pourrait améliorer la digestibilité des protéines, tout en réduisant les éventuels inconforts digestifs. Mais la demande d'allégation formulée auprès de l'EFSA a été refusée par manque de preuves (EFSA, 2011). À l'inverse, Santé Canada reconnait la bromélaïne comme une enzyme digestive et préconise certaines doses journalières (Santé Canada, 2012). Ainsi, l'influence de l'ajout de la dose maximale recommandée de bromélaïne de tige sur la digestibilité des protéines a été étudiée (Figure 104).

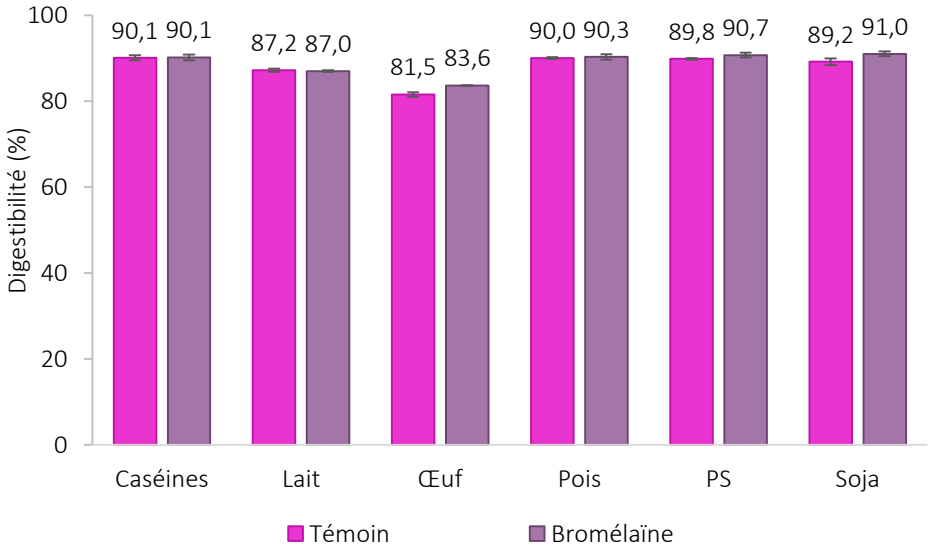


Figure 104 : Influence de l'ajout de bromélaïne sur la digestibilité des isolats protéiques

D'après la Figure 104, **aucune différence significative n'est observable entre la digestibilité des protéines seules et des protéines en présence de bromélaine.** Ainsi, dans les conditions de l'essai, l'ajout de la quantité maximale de bromélaïne recommandée par Santé Canada (2012) ne permet pas d'améliorer significativement la digestibilité des protéines étudiées. La part de protéines non digestibles, résistante aux enzymes gastro-intestinales, est donc certainement aussi résistante à l'action de la bromélaïne. Le recours à un tel adjuvant dans nos produits riches en protéines parait donc peu utile.

2.2.2.2. Calcul du SCCD des préparations protéiques

D'après les résultats détaillés dans le paragraphe précédent, la digestibilité des protéines étudiées n'est significativement modifiée ni par un traitement thermique « type » (en l'absence ou en présence de lactose) ni par l'ajout de bromélaïne. Le calcul du score chimique corrigé de digestibilité ne sera donc mené que pour les protéines natives. Dans un premier temps, la composition en acides aminés des différentes préparations protéiques est donnée dans le Tableau 33.

Tableau 33 : Aminogramme des différentes préparations protéiques (exprimé en $mg.g^{-1}$ de protéines)

	Caséines	Lait	Œuf	Pois	PS	Soja
Ala	28	28	50	43	47	35
Arg	34	34	46	87	27	66
Asp	66	63	82	115	108	103
Cys*	3	6	22	10	23	26
Glu	210	178	105	168	173	165
Gly	17	16	28	41	18	34
His*	28	25	19	25	20	27
Ile*	49	44	43	45	55	34
Leu*	90	78	68	84	119	75
Lys*	74	69	51	72	97	54
Met*	27	25	30	11	21	13
Phe*	49	41	47	55	38	39
Pro	105	83	31	45	49	44
Ser	51	49	55	53	45	45
Thr*	39	38	36	39	49	29
Trp*	13	6	13	10	22	15
Tyr*	53	46	32	38	33	31
Val*	64	53	56	50	54	41

* Acides aminés essentiels

D'après le Tableau 33, la poudre de caséinate de calcium et le concentrat de protéines sériques sont composés uniquement d'acides aminés protéinogènes. L'isolat de protéines de pois présente quant à lui une teneur de 99,1 %, contre 88,2 % pour le concentrat de protéines de lait, 87,6 % pour l'isolat de protéines de soja et seulement 81,4 % pour la poudre de blanc d'œufs. La teneur absolue en acides aminés essentiels est elle aussi plus importante pour le concentrat de protéines sériques (53,1 %) et la poudre de caséines de calcium (48,9 %) que pour les quatre autres sources. Ainsi, l'isolat de protéines de pois présente une teneur de 43,9 %, contre 43,1 % pour le concentrat de protéines de lait, 41,7 % pour la poudre de blanc d'œuf et 38,4 % pour l'isolat de protéines de soja. D'après ces premiers résultats, il parait probable que les protéines sériques et les caséines présentent un indice chimique plus important que les autres préparations protéiques étudiées.

L'indice chimique des préparations protéiques a été déterminé en comparant la composition en acides aminés essentiels des préparations protéiques avec celle de la protéine de

référence, donnée par la FAO en 2013 pour un adulte. Les résultats sont présentés dans le Tableau 34.

D'après le Tableau 34, les préparations à base de caséines, d'œuf, de protéines sériques et de soja ne présentent aucun acide aminé limitant : elles possèdent toutes des teneurs en acides aminés essentiels au moins supérieures à celles données par la FAO (2013). À l'inverse, la préparation à base de pois présente une teneur en acides aminés essentiels (AAE) inférieure à celle de la protéine de référence : sa teneur en cystéine et méthionine est limitante. Il en est de même pour le concentrat de protéines de lait, dont la teneur en tryptophane est limitante.

Tableau 34 : Indice chimique des préparations protéiques

AAE	Teneur en AAE de la protéine de référence ($mg.g^{-1}$ de protéines)	Indice chimique					
		Caséines	Lait	Œuf	Pois	PS	Soja
His	16	1,75	1,56	1,19	1,56	**1,25**	1,69
Ile	30	1,63	1,47	1,43	1,50	1,83	1,13
Leu	61	1,48	1,28	1,11	1,38	1,95	1,23
Lys	48	1,54	1,44	**1,06**	1,50	2,02	1,13
Cys + Met	23	**1,30**	1,35	2,26	**0,91**	1,91	1,70
Phe + Tyr	41	2,49	2,12	1,93	2,27	1,73	1,71
Thr	25	1,56	1,52	1,44	1,56	1,96	1,16
Trp	6,6	1,97	**0,91**	1,97	1,52	3,33	2,27
Val	40	1,60	1,33	1,40	1,25	1,35	**1,03**

L'indice chimique, pondéré par la digestibilité des protéines, permet l'obtention du score chimique corrigé de la digestibilité. Ces résultats figurent dans le Tableau 35.

Tableau 35 : Score chimique corrigé de la digestibilité des préparations protéiques

	Indice chimique	Digestibilité	SCCD	SCCD tronqué
Caséines	1,30	0,901	1,17	1,00
Lait	0,91	0,872	0,79	0,79
Œuf	1,06	0,815	0,86	0,86
Pois	0,91	0,900	0,82	0,82
PS	1,25	0,898	1,12	1,00
Soja	1,03	0,891	0,92	0,92

D'après le Tableau 35, le SCCD tronqué des différentes préparations protéiques est compris entre 0,79 et 1,00. La poudre de caséinate de calcium et le concentrat de protéines sériques présentent quant à eux un SCCD idéal, supérieur à 1 pour la valeur non tronquée. Ces données sont en accord avec celles de la littérature : les protéines sériques et les caséines sont connues pour être

des protéines de bonne qualité. Elles présentent une bonne digestibilité, une bonne biodisponibilité ainsi qu'une teneur en acides aminés essentiels couvrant les besoins humains. Elles possèdent ainsi des valeurs de SCCD et de DIAAS supérieures à la plupart des autres protéines (McGregor et Poppitt, 2013). Étonnamment, le concentrat de protéines de lait présente quant à lui la valeur de SCCD la plus basse. Cela s'explique principalement par des teneurs en acides aminés protéoinogènes et en acides aminés essentiels plus basses que la préparation de caséines et de protéines sériques : la teneur en tryptophane est ainsi en deçà de la teneur de la protéine de référence. Cette teneur fait ainsi chuter le score de SCCD du concentrat de protéines de lait.

La poudre de blanc d'œuf présente elle aussi une valeur de SCCD relativement basse comparée aux résultats habituellement retrouvés. Du fait de sa composition en acides aminés essentiels et de sa très bonne digestibilité, l'œuf est traditionnellement utilisé comme standard de comparaison pour la mesure de la qualité protéique. Son SCCD est généralement comparable à celui du lait avec des valeurs supérieures à 1 (Layman et Rodriguez, 2009). Dans notre cas, la valeur de la digestibilité de la poudre de blanc d'œuf est particulièrement faible : cela pourrait s'expliquer par sa teneur limitée en acides aminés protéinogènes : la lysine, acide aminé limitant, est à peine présente en excès (1,06). De plus, la teneur élevée en lipides pourrait expliquer sa faible digestibilité.

Le SCCD de l'isolat des protéines de soja présente une valeur de 0,92. Dans la littérature, les valeurs sont généralement comprises entre 0,92 et 1. En effet, alors que la plupart des protéines végétales présentent des valeurs de SCCD plus faibles que celles d'origine animale, les protéines de soja sont généralement d'une qualité similaire (Hughes *et al.*, 2011). Contrairement aux protéines de soja, les protéines de pois présentent des valeurs de SCCD relativement basses, plus proches des valeurs généralement observées pour les protéines végétales. L'isolat de protéines de pois étudié présente tout de même une qualité supérieure aux concentrats de protéines de pois généralement étudiés dans la littérature (Hughes *et al.*, 2011).

En conclusion, la poudre de caséinate de calcium, l'isolat de protéines sériques et l'isolat de protéines de soja présentent une digestibilité et une qualité globale optimales. À l'inverse, la poudre de blanc d'œuf et la poudre de lait présentent une moins bonne digestibilité et donc une moins bonne qualité globale.

2.2.3. Suivi de la digestion des isolats protéiques

Pour compléter l'évaluation de la qualité des préparations protéiques, leur digestion a été réalisée selon un consensus international récent (Minekus *et al.*, 2014). Les protéines ont subi 120 min de digestion gastrique et 120 min supplémentaires de digestion intestinale. Des prélèvements réguliers ont été réalisés à 0, 30, 60, 120 et 240 min et analysés par SDS-PAGE (Figure 105) et par une réaction à la ninhydrine (Figure 106). Respectivement, ces deux analyses permettent de suivre l'hydrolyse des protéines en peptides d'une taille supérieure à 3 kDa, et de suivre l'hydrolyse des protéines et des peptides en acides aminés.

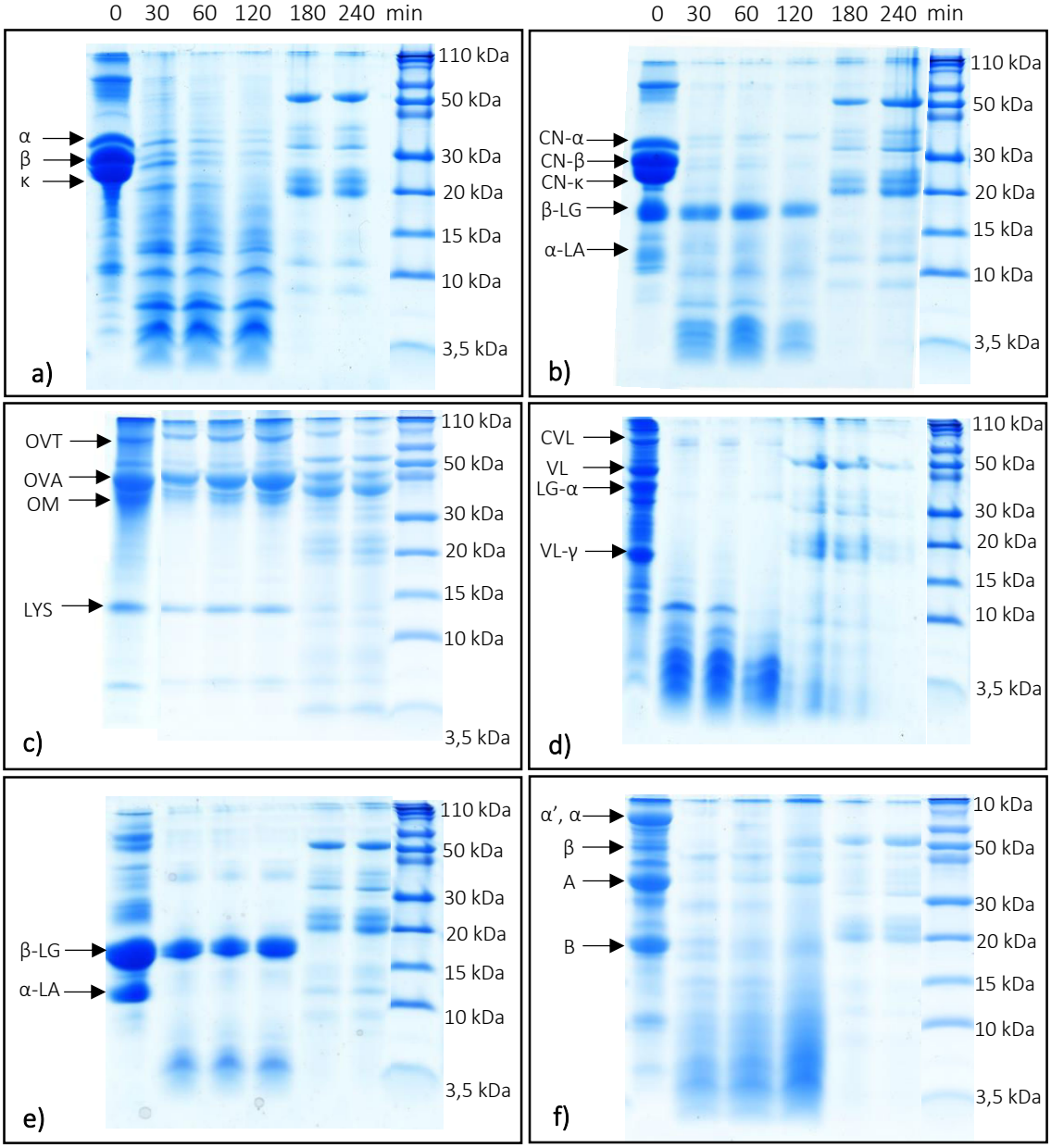


Figure 105 : Électrophorégramme SDS-PAGE des préparations protéiques

A : caséine, B : lait, C : œuf, D : pois, E : protéines sériques et F : soja

D'après la Figure 105 (a), la caséine native présente des bandes intenses aux alentours de 30 kDa. Ces dernières correspondent aux principales fractions de la caséine : α_{S1}, α_{S2}, β et κ. Elle présente aussi des bandes à des masses molaires plus basses (environ 12 kDa) qui correspondent certainement à des fragments déjà hydrolysés. Au cours des 120 min de digestion gastrique, les fractions caséiniques d'une taille initiale d'environ 30 kDa disparaissent au profit de bandes ayant une masse molaire comprise entre 5 et 15 kDa. À la fin de la digestion intestinale, ces bandes ne sont plus visibles : l'hydrolyse de la caséine est totale. Les bandes des masses molaires comprises entre 20 et 50 kDa sont observables sur tous les électrophorégrammes et correspondent en réalité à la signature de la pancréatine (Lang et al., 2015). Les résultats de la réaction à la ninhydrine sont en accord avec ceux obtenus par SDS-PAGE : durant la digestion gastrique, les protéines sont principalement hydrolysées en gros peptides (peu d'acides aminés réagissent donc avec la ninhydrine), alors que la digestion intestinale permet au contraire la libération d'une grande quantité d'acides aminés.

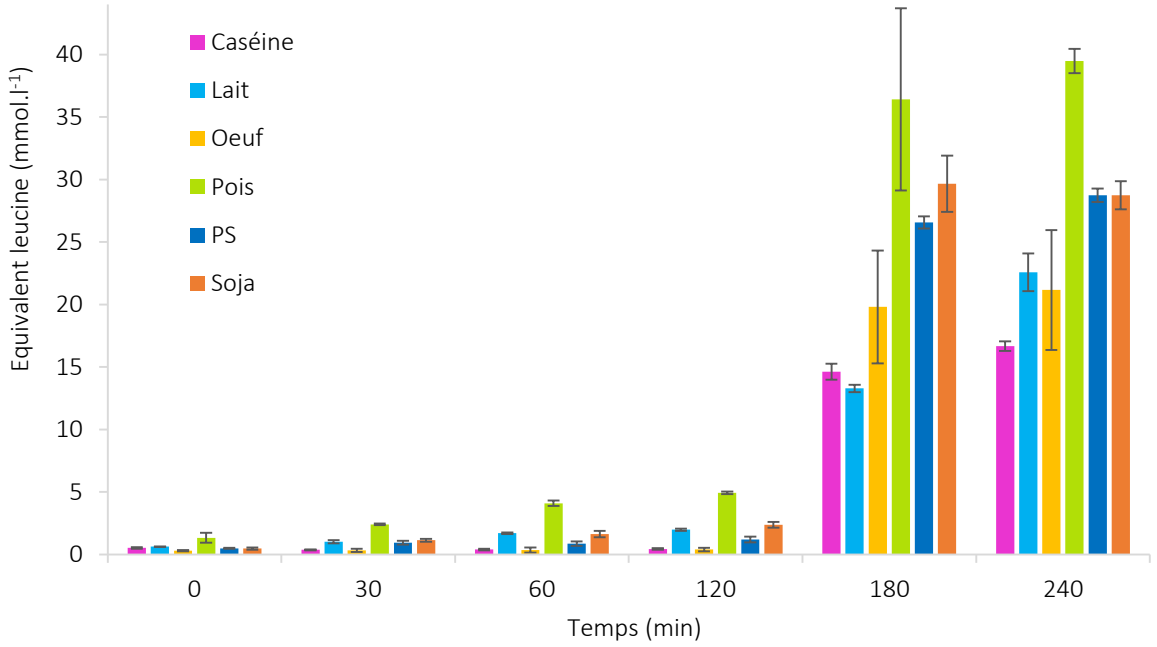


Figure 106 : Suivi de la libération des acides aminés des préparations protéiques durant la digestion gastrique et intestinale

D'après la Figure 105 (e), les protéines sériques natives présentent deux bandes intenses entre 10 et 20 kDa. Celles-ci correspondent aux deux principales protéines sériques du lait : l'α-lactalbumine (α-LA) et la β-lactoglobuline (β-LG). Des bandes sont aussi observables à des masses molaires plus importantes (entre 20 et 80 kDa) : elles correspondent aux immunoglobulines et à la sérumalbumine. Lors de la digestion gastrique, l'α-lactalbumine est complètement

hydrolysée et des fragments d'une masse molaire d'environ 5 kDa sont observables. À l'inverse, la β-lactoglobuline n'est pas hydrolysée : la bande correspondante présente une coloration aussi intense à l'état natif qu'après 120 min de digestion gastrique. Cette protéine globulaire présente en réalité une structure trop compacte pour subir une hydrolyse enzymatique par la pepsine (Guo *et al.*, 1995). Mais son hydrolyse est totale après 120 min de digestion intestinale : seules quelques bandes très claires persistent entre 8 et 15 kDa. Là encore, ces observations se corrèlent avec les données obtenues par la réaction à la ninhydrine (Figure 106). Durant la digestion intestinale, une multitude d'acides aminés sont libérés.

Le concentrat de protéines de lait est composé, à l'état natif, de caséines (et ses fractions α, β et κ), ainsi que d'α-lactalbumine et de β-lactoglobuline (Figure 105 (b)). L'hydrolyse de ces fractions évolue de la même façon que précédemment : durant la digestion gastrique, les caséines α, β et κ et l'α-lactalbumine sont rapidement hydrolysées en peptides d'une taille proche de 5 kDa. La β-lactoglobuline ne subit quant à elle quasiment aucune hydrolyse durant cette phase. La digestion intestinale permet ensuite l'obtention d'un mélange de peptides de très petites tailles et d'acides aminés. Ces résultats sont d'ailleurs corrélés à ceux obtenus en Figure 106.

D'après la Figure 105 (c), la poudre de blanc d'œuf est composée, à l'état natif, de quatre principales fractions. L'ovalbumine (OV) est la principale protéine du blanc d'œuf et présente une large bande à environ 45 kDa. Elle est connue pour être particulièrement résistante à l'action de la pepsine (Jiménez-Saiz *et al.*, 2012) et son hydrolyse entraine la libération d'un fragment d'environ 40 kDa et d'un second d'une masse molaire inférieure à 10 kDa, observables durant la digestion intestinale. Le lysozyme (LYS) possède une masse molaire à l'état natif d'environ 20 kDa. Il est lui aussi particulièrement résistant à l'action de la pepsine, et son hydrolyse gastrique est donc très limitée. Elle est à l'inverse complète après la digestion intestinale. L'ovomucoïde (OM) est à l'inverse très sensible à l'action de la pepsine : son hydrolyse est d'ailleurs quasiment totale après digestion gastrique. Cela entraine la formation de peptides d'environ 18 et 13 kDa (Jiménez-Saiz *et al.*, 2011). Enfin, l'ovotransferrine (OVT) est hydrolysée très lentement, que ce soit durant la digestion gastrique ou intestinale. Contrairement à ce qui pouvait être attendu au regard des résultats de la SDS-PAGE, les valeurs obtenues par réaction à la ninhydrine (Figure 106) sont particulièrement élevées. Elles sont similaires à celles des protéines sériques et des caséines, quand bien même ces dernières sont entièrement hydrolysées en fin de digestion intestinale.

D'après la Figure 105 (d), l'électrophorégramme de l'isolat de protéines de pois présente une multitude de bandes comprises entre 10 et 15 kDa. Les bandes comprises entre 20 - 25 et

38 - 43 kDa correspondent respectivement aux sous-unités basiques et acides de la globuline 11S (Shewry *et al.*, 2003). La viciline (VL) et la conviciline (CVL) présentent respectivement une masse molaire de 48 et 63 kDa. Les bandes inférieures à 20 kDa représentent quant à elles un mélange de polypeptides d'albumine et de γ-viciline (γ-VL). Toutes ces fractions sont très rapidement hydrolysées par la pepsine durant la digestion gastrique : en résultent des peptides d'une taille comprise entre 3,5 et 10 kDa. Suite à la digestion intestinale, ces petites fractions disparaissent. Ainsi, la totalité des protéines de pois semblent hydrolysées après leur passage gastro-intestinal. Ces données sont parfaitement en accord avec celles obtenues par le dosage à la ninhydrine : durant la digestion gastrique, la teneur en acides aminés et en petits peptides augmente progressivement et atteint son maximum durant la digestion intestinale (Figure 106). Les protéines de pois présentent par ailleurs les valeurs d'équivalent leucine les plus élevées.

Enfin, la Figure 105 (f) présente l'électrophorégramme de l'isolat de protéines de soja. Les fractions α, α' et β correspondent aux sous-unités de la β-conglycinine (globuline 7S), tandis que les fractions A et B correspondent aux sous-unités de la glycinine (globuline11 S) (Yang *et al.*, 2015). À partir de ces sous-unités, la digestion gastrique permet l'obtention de peptides et de protéines d'une taille comprise entre 3,5 et 15 kDa. Suite à la digestion intestinale, ces peptides et petites protéines sont clivées pour donner majoritairement des acides aminés et des peptides d'une taille inférieure à 3,5 kDa. Encore une fois, ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus avec le réactif à la ninhydrine : la teneur en acides aminés de la préparation présente une augmentation intense dès la première heure de la digestion intestinale (Figure 106).

En conclusion, l'étude de la digestion des différentes préparations protéiques nous a permis de constater que, mis à part les protéines de blanc d'œuf, toutes les protéines étudiées étaient correctement digérées à la fin de l'intestin grêle.

2.3. Conclusion

Malgré un système de digestion et d'absorption complexe et coordonné, entre 4 et 22 % des protéines d'un régime alimentaire échappent au mécanisme d'absorption. De ce point de vue, toutes les protéines ne sont pas équivalentes : leur digestibilité dépend notamment de leur structure, de leur richesse en facteurs antinutritionnels mais aussi des traitements qu'elles peuvent subir. La qualité d'une protéine dépend aussi de sa composition en acide aminé. Généralement, les protéines d'origine animales (lait, œuf, viande) présentent une qualité supérieure à celles d'origine végétale : leur composition en acides aminés indispensables est particulièrement riche et leur digestibilité est optimale du fait d'une absence de facteurs antinutritionnels. Cependant, avec l'amélioration des techniques de séparation, les isolats de protéines végétales tendent à devenir plus digestibles. Mais une grande variabilité demeure toujours entre différents produits industriels Or, les protéines étant structurellement et fonctionnellement indispensables à l'homme, l'évaluation de leur digestibilité et de leur qualité globale parait indispensable.

La première partie de ce travail expérimental s'est donc attachée à évaluer la qualité de chacune des six préparations protéiques les plus utilisées par la société finançant ce travail. Il s'agit d'une poudre de caséinate de calcium, d'un concentrat de protéines de lait, d'une poudre de blanc d'œuf, d'un isolat de protéines de pois, d'un concentrat de protéines sériques et d'un isolat de protéines de soja. Pour cela, la digestibilité a été évaluée selon la méthode du pH-stat, largement utilisée dans la littérature. D'après ces premiers éléments, seule la poudre de blanc d'œuf présente une digestibilité largement inférieure aux autres préparations. Le traitement thermique de référence, en l'absence ou en présence de lactose, n'influence aucunement la digestibilité des préparations. De même, l'ajout de bromélaïne, un extrait brut d'ananas ayant des propriétés d'amélioration de la digestion, ne modifie en rien la digestibilité des protéines. L'évaluation de la qualité d'une source protéique nécessite ensuite le calcul du score chimique corrigé de la digestibilité via la connaissance de sa composition en acides aminés. D'après ce score, le concentrat de protéines de lait et la poudre de blanc d'œuf présentent une qualité assez médiocre. Il en est d'ailleurs de même pour l'isolat de protéines de soja.

Dans un second temps, la digestion des préparations protéiques a été réalisée selon un protocole faisant consensus au niveau mondial (Minekus *et al.*, 2014). Des prélèvements réguliers ont été effectués puis analysés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE et par réaction à la ninhydrine. Ces deux protocoles, complémentaires, permettent de suivre l'hydrolyse des protéines en acides aminés. Il a ainsi pu être mis en évidence qu'une partie non négligeable des protéines d'œuf n'était

pas digérée après le passage gastro-intestinal : l'ovalbumine et le lysozyme sont particulièrement mal hydrolysés. Toutes les autres préparations protéiques présentent par ailleurs une très bonne digestion.

Ainsi, cette étude nous a permis de mettre en évidence la très bonne digestibilité et la très bonne qualité de la poudre de caséinate de calcium et du concentrat de protéines sériques. L'isolat de protéines de soja présente lui aussi une très bonne qualité, généralement supérieure à la plupart des produits semblables étudiés dans la littérature. Pour un produit d'origine végétale, l'isolat de protéines de pois présente lui aussi une bonne qualité et une bonne digestibilité. À l'inverse, la poudre de blanc d'œuf et le concentrat de protéines de lait présentent tous deux une qualité inférieure à la plupart des produits similaires retrouvés dans la littérature. Ainsi, au regard de ces résultats, il serait préférable de formuler les produits de types 1, 2, 3 et 4 avec de la poudre de caséinate de calcium, du concentrat de protéines sériques ou de l'isolat de protéines de soja (Figure 107).

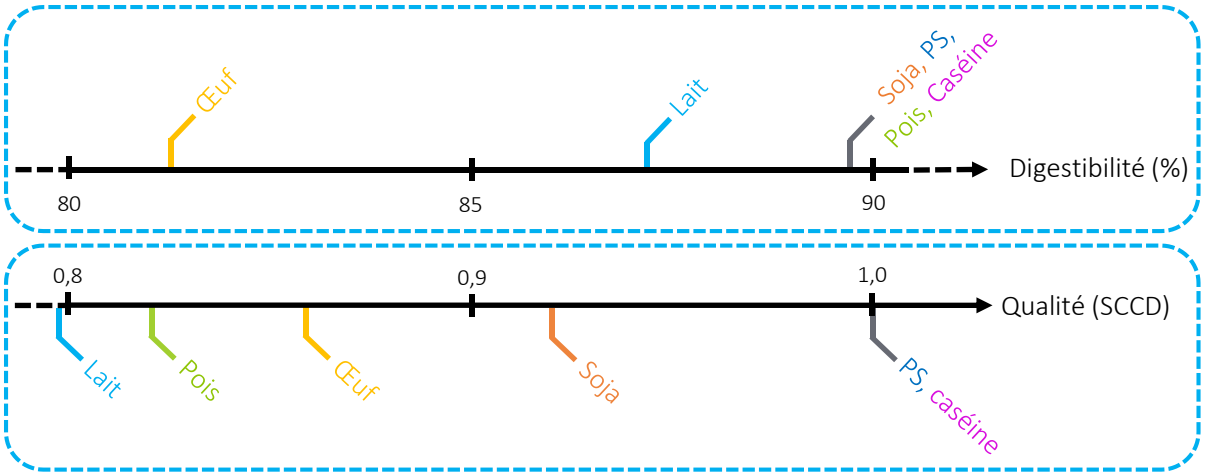


Figure 107 : Bilan de l'évaluation de la qualité et de la digestibilité des préparations protéiques

3. Conclusion du chapitre

L'objectif de cette partie du projet était de sélectionner une source d'amidon et une source de protéines particulièrement digestibles de façon à formuler quatre types de produits industriels, variant dans leur mode de préparation et de cuisson. Ainsi, des amidons issus de blé, de manioc, de maïs, de maïs cireux, de pomme de terre, de riz et de riz cireux ont été étudiés. Parallèlement à cela, des protéines issues du lait, d'œuf, de soja et de pois ont aussi été étudiées.

D'après les résultats obtenus, les produits de types 1 et 2, qui ne subissent pas de traitement thermique, devraient être formulés à l'aide d'amidon de manioc ou de maïs cireux. Ces derniers, en plus de présenter une teneur en amidon résistant relativement faible, présentent une teneur en amidon rapidement digestible raisonnable. Cela en fait de bons candidats pour les produits diététiques étudiés. Concernant les protéines, la digestibilité des différentes sources est très similaire : seules les poudres de protéines de lait et de blanc d'œuf présentent une digestibilité significativement moindre que les quatre autres sources. D'un point de vue qualitatif, les poudres de caséinate de calcium, de protéines sériques de lait et l'isolat de soja sont supérieures aux autres et pourraient donc être privilégiées pour la formulation des produits de type 1 et 2.

Pour les produits de type 3 et 4, qui subissent respectivement un traitement thermique et un traitement thermique suivi d'un refroidissement, les différents types d'amidons présentent des profils de digestibilité très proches. La sélection pourra donc plutôt être effectuée sur des critères de coût ou de fonctionnalité. Le traitement thermique n'ayant aucune influence sur la digestibilité des protéines, les poudres de caséinate de calcium, de protéines sériques de lait et l'isolat de soja présentent, là encore, les meilleures propriétés nutritionnelles.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif global de ce projet à visée industrielle était de développer de nouvelles formulations alimentaires convenant aux intolérants au lactose et présentant dans le même temps des macronutriments (amidon et protéines) plus digestes. Les formulations alimentaires étudiées étaient des formulations sèches hyperprotéinées et hypocaloriques, réhydratées à l'aide de lait par le consommateur. Globalement, quatre grands types de produits industriels ont pu être mis en évidence : le premier est réhydraté puis consommé, le second est réhydraté, refroidi puis consommé, le troisième est réhydraté, traité thermiquement puis consommé et le dernier est réhydraté, traité thermiquement, refroidi puis consommé.

- Développement d'une formulation adaptée aux intolérants au lactose

Dans un premier temps, ce projet s'est attaché à développer les quatre produits sous une forme convenant à la majorité des intolérants au lactose. Pour cela, une étude bibliographique a été réalisée et a permis de mettre en évidence le seuil de tolérance des intolérants au lactose (18 g par jour lorsque les apports sont répartis sur la journée), ainsi que les différentes solutions envisageables pour notre problématique. La solution retenue a été l'incorporation d'une β-galactosidase à la formulation industrielle sèche de façon à ce qu'elle hydrolyse le lactose une fois le produit réhydraté par le consommateur.

Une grande partie du lactose contenu dans le premier type de produit industriel peut être hydrolysé durant la digestion gastrique par une β-galactosidase issue de la souche *Aspergillus Oryzae*. Cela permet l'obtention d'un produit adapté aux intolérants au lactose, présentant, d'après des essais *in vitro*, une concentration d'environ 17,0 $g.l^{-1}$. L'addition d'une enzyme issue de la levure *Kluyveromyces lactis* permet quant à elle l'obtention d'un produit de type 2 convenant à la majorité des intolérants au lactose : l'enzyme agit durant la phase de refroidissement et permet l'obtention d'un produit ayant une concentration en lactose d'environ 16,5 $g.l^{-1}$. Il est aussi possible d'atteindre des valeurs très faibles si l'étape de refroidissement est poursuivie au-delà de 30 min. Cette enzyme présente également une excellente activité durant la digestion intestinale, mais elle est dénaturée par la digestion gastrique.

Les deux enzymes étudiées sont aussi dénaturées par le traitement thermique en four à micro-ondes que subissent les produits de type 3 et 4. Elles ne présentent alors plus aucune activité.

La protection de l'une des deux enzymes a été nécessaire, et la plus thermostable a par conséquent été privilégiée (enzyme AO). Le mécanisme de chauffage par micro-ondes reposant sur le changement d'orientation des molécules dipolaires (principalement l'eau), le développement d'un enrobage rendant l'enzyme insoluble a été proposé. Pour cela, deux matrices ont été développées : la première est à base de caséines micellaires et la seconde à base de zéine. Ces deux protéines, respectivement issues du lait et du maïs, sont peu solubles, voire insolubles, dans l'eau. La zéine est seulement soluble dans l'éthanol. Parallèlement à cela, le procédé d'encapsulation par enrobage en lit fluidisé a été retenu : il est extrapolable à l'échelle industrielle et présente l'avantage de ne pas être dénaturant pour les enzymes (basses températures, pas de cisaillement ni de déshydratation). Les particules ainsi obtenues sont de type cœur-couronne et présentent un diamètre proche du diamètre de la particule non enrobée. Celles obtenues par enrobage avec la zéine présentent une meilleure qualité que celles enrobées à l'aide de CM : ces dernières présentent une agrégation et des craquelures de surface tandis qu'une partie de la matrice a séché avant contact avec la particule à enrober. Ces résultats sont d'ailleurs corrélés à leur efficacité d'enrobage : les matrices à base de zéine protègent plus efficacement l'enzyme. Elles donnent d'ailleurs d'excellents résultats. Suite au traitement thermique subi par le produit, l'enzyme enrobée conserve la *quasi*-totalité de son activité. Elle permet ainsi l'obtention de produits de type 3 et 4 répondant aux besoins des intolérants au lactose. Ces derniers présentent une teneur d'environ 17,3 $g.l^{-1}$. Les quatre types de produits ont donc pu être obtenus sous une forme convenant à la majorité de la population intolérante au lactose.

Ces premiers travaux engendrent des perspectives intéressantes. Tout d'abord, le procédé d'enrobage de l'enzyme devra être extrapolé à l'échelle industrielle, et plus particulièrement sur l'équipement que possède la société finançant ce projet. Cela permettrait la production de l'enzyme enrobée en quantité industrielle. D'après certaines études, l'extrapolation linéaire du procédé d'enrobage (Würster) est réalisable sur une large gamme de taille d'équipement. Pour cela, la taille de la chambre, le volume d'air de fluidisation et la vitesse de pulvérisation doivent évoluer proportionnellement. Une étude de vieillissement de l'enzyme devra aussi être menée de façon à vérifier la stabilité de son activité jusqu'à la fin de la DLUO du produit. Dans le même temps, l'enzyme étant ajoutée en très faible quantité dans la solution sèche, il sera opportun de vérifier sa bonne répartition en étudiant le mélange des poudres. Aussi, les résultats obtenus *in vitro* pour chacun des quatre produits devront être validés par des tests *in vivo* chez l'homme. Pour cela, un large groupe de sujets présentant une importante diversité d'âge et d'ethnicité devra être recruté de façon aléatoire et testé pour sa malabsorption du lactose. Ils devront ensuite subir un test en

double aveugle avec une dose physiologique maximale (50 g) ou un placebo, pour sélectionner les réels intolérants au lactose. Ces sujets sélectionnés devront ensuite être testés avec une large gamme de concentrations en lactose ainsi qu'un placebo pour déterminer le seuil de tolérance. Idéalement, pour simuler la réalité, le lactose devrait aussi être administré durant les repas et les symptômes devront être recueillis quotidiennement. Cette partie de l'étude pourrait être menée dans une clinique avec un gastro-entérologue partenaire de l'industriel finançant ce projet. Enfin, l'enrobage de l'enzyme à l'aide de zéine permettant une très bonne protection contre le traitement thermique en four à micro-ondes, il sera intéressant de tester cette matrice sur d'autres composés d'intérêt thermosensibles (vitamines, minéraux…).

- Évaluation de la digestibilité de différentes sources d'amidon

Dans un second temps, le projet s'est attaché à sélectionner des sources d'amidon les plus digestibles possibles. Pour ce faire, les caractéristiques physico-chimiques des différentes sources à l'état natif ont tout d'abord été étudiées. Cela a permis la formulation de certaines hypothèses quant à leur digestibilité : l'amidon de maïs cireux et de riz cireux, du fait de leur diamètre, leur forme et leur teneur en amylopectine pourrait être significativement plus digestible que les autres sources étudiées. L'hypothèse a été partiellement validée puisque d'après les résultats *in vitro* obtenus, l'amidon de maïs cireux et de manioc semblent être les plus digestibles. Ainsi, ces deux amidons semblent être les plus adaptés à la formulation de nos produits hypocaloriques et hyperprotéinées, notamment lorsqu'ils ne subissent pas de traitement thermique (produits de type 1 et 2). Les caractéristiques thermiques des amidons sélectionnés ont aussi été étudiées : la température de gélatinisation a été déterminée par rhéologie et par calorimétrie. Ainsi, le traitement thermique de référence (800 W - 2 min) permettrait d'atteindre la température de fin de pic de gélatinisation de tous les amidons étudiés : ces derniers devraient donc présenter une meilleure digestibilité. Cette observation n'a pas été validée par les essais *in vitro*. L'influence du traitement thermique sur la digestibilité des amidons est très variable en fonction des sources. Mais globalement, après traitement thermique, tous les amidons présentent le même profil. Ainsi, les six amidons étudiés pourront être utilisés pour la formulation des produits de type 3. Enfin, le phénomène de rétrogradation de l'amidon a été étudié par calorimétrie différentielle à balayage et selon le protocole de digestibilité précédemment utilisé. D'après les résultats obtenus, le refroidissement des produits de type 4 n'entraine aucune rétrogradation : la teneur en amidon résistant est comparable à celle obtenue directement après traitement thermique. Ainsi, pour la formulation des produits de type 4, les six sources d'amidon pourront être utilisées.

Cette partie du projet pourrait être complétée par une étude approfondie de l'effet du traitement thermique en four à micro-ondes des suspensions d'amidon sur leur digestibilité. Plusieurs couples temps-puissance pourraient ainsi être sélectionnés et l'influence de la teneur en eau de la suspension d'amidon étudiée. Dans le même temps, l'indice glycémique des différents échantillons pourrait être évalué *in vitro*.

- Évaluation de la digestibilité de différentes sources de protéines

Ce projet se proposait aussi, dans un dernier temps, de comparer la digestibilité de différentes préparations protéiques industrielles entre elles. L'influence du traitement thermique de référence (800 W - 2 min), tout comme l'influence de l'ajout de bromélaïne, a aussi été étudié. D'après les résultats obtenus, le traitement thermique de référence (en présence ou en l'absence de lactose) et l'ajout de bromélaïne n'entrainent pas d'augmentation significative de la digestibilité des protéines : ces dernières présentent un profil identique aux protéines natives. Ainsi, parmi les protéines étudiées, les caséines, les protéines sériques, les protéines de pois et de soja présentent une digestibilité significativement plus importante que les protéines de lait. Les protéines de lait présentent elles-mêmes une digestibilité significativement supérieure aux protéines de blanc d'œuf. Ces dernières présentent d'ailleurs une digestibilité particulièrement basse qui est corrélée aux résultats obtenus par électrophorèse. Alors que les autres préparations protéiques sont sous formes de peptides ou d'acides aminés à la fin de la digestion intestinale, une part des protéines de blanc d'œuf, et notamment les fractions d'ovalbumine, de lysozyme et d'ovotransferrine, se présentent encore sous leur forme native. La part de protéines de blanc d'œuf généralement non digérée (20 %) devra donc être prise en compte lors de la formulation des produits diététiques. Il en est d'ailleurs de même pour les autres préparations protéiques qui présentent elles aussi une part de protéines non digestibles (généralement aux alentours de 10 %).

Dans le même temps, la qualité des protéines sélectionnées a été étudiée. Pour cela, leur composition en acides aminés est comparée à la composition d'une protéine « idéale » puis pondérée par leur digestibilité globale. D'après les résultats obtenus, les protéines sériques et les caséines présentent une qualité optimale : leur composition en acides aminés et leur digestibilité permettent de couvrir les besoins recommandées par la FAO. Malgré la digestibilité médiocre des protéines de blanc d'œuf, elles présentent une qualité intermédiaire, tout comme les protéines issues du soja. Les protéines de pois et de lait, relativement pauvres en acides aminés essentiels, présentent quant à elles une qualité médiocre. Leur utilisation dans les formulations devra donc

être limitée, ou se faire en parallèle de l'ajout de protéines de bonne qualité (caséines ou protéines sériques).

Les résultats de cette étude pourraient être validés par une étude de digestibilité iléale vraie chez le rat. Dans l'idéal, outre la détermination de la digestibilité de la protéine entière, cette étude permettrait aussi de déterminer la digestibilité de chacun des acides aminés essentiels. À terme, ces données permettraient le calcul du « Digestible Indispensable Amino Acid Score ».

Références

Abad, L. V., Kudo, H., Saiki, S., Nagasawa, N., Tamada, M., Katsumura, Y., Aranilla, C. T., Relleve, L. S. et De La Rosa, A. M. 2009. Radiation degradation studies of carrageenans. *Carbohydr. Polym.*, 78 (1), 100‑106.

Adeleye, O. O., Ologhobo, A. D. et Iji, P. A. 2014. Prediction of starch hydrolysis in native starches studied in vitro. *Starch - Stärke*, 66 (5‑6), 502‑507.

Ades, H., Kesselman, E., Ungar, Y. et Shimoni, E. 2012. Complexation with starch for encapsulation and controlled release of menthone and menthol. *LWT - Food Sci. Technol.*, 45 (2), 277‑288.

Adhikari, K., Dooley, L. M., Chambers IV, E. et Bhumiratana, N. 2010. Sensory characteristics of commercial lactose-free milks manufactured in the United States. *LWT - Food Sci. Technol.*, 43 (1), 113‑118.

Adhikari, K., Mustapha, A. et Grün, I. U. 2003. Survival and Metabolic Activity of Microencapsulated Bifidobacterium longum in Stirred Yogurt. *J. Food Sci.*, 68 (1), 275‑280.

Adhikari, K., Mustapha, A., Grün, I. U. et Fernando, L. 2000. Viability of Microencapsulated Bifidobacteria in Set Yogurt During Refrigerated Storage. *J. Dairy Sci.*, 83 (9), 1946‑1951.

Adolfsson, O., Meydani, S. N. et Russell, R. M. 2004. Yogurt and gut function. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80 (2), 245‑256.

Adrian, T. E., Ferri, G. L., Bacarese-Hamilton, A. J., Fuessl, H. S., Polak, J. M. et Bloom, S. R. 1985. Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*, 89 (5), 1070‑1077.

AFNOR. 1994. *Amidon, fécules et produits dérivés - Dosage de l'azote selon la méthode de Kjeldahl - Méthode titrimétrique* (n° NF EN ISO 3188).

AFSSA. 2007. *Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations* (Rapport de groupe de travail).

Akeson, W. R. et Stahmann, M. A. 1964. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *J. Nutr.*, 83, 257‑261.

Almeida, C. C., Monteiro, M. L. G., Costa-Lima, B. R. C. da, Alvares, T. S. et Conte-Junior, C. A. 2015. In vitro digestibility of commercial whey protein supplements. *LWT - Food Sci. Technol.*, 61 (1), 7‑11.

Alonso, R., Aguirre, A. et Marzo, F. 2000. Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chem.*, 68 (2), 159‑165.

Alpers, D. H. 2006. Diet and irritable bowel syndrome. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 22 (2), 136‑139.

Anderson, A. K. et Guraya, H. S. 2006. Effects of microwave heat-moisture treatment on properties of waxy and non-waxy rice starches. *Food Chem.*, 97 (2), 318‑323.

Anderson, R. L. et Wolf, W. J. 1995. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr.*, 125 (3 Suppl), 581S‑588S.

Anguita, M., Gasa, J., Martín-Orúe, S. M. et Pérez, J. F. 2006. Study of the effect of technological processes on starch hydrolysis, non-starch polysaccharides solubilization and physicochemical properties of different ingredients using a two-step in vitro system. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 129 (1–2), 99‑115.

Anizon, J. Y., Lemaire, B. et Surbled, M. 2003. Extraction assistée par micro-ondes. *Tech. Ing.*, F3060.

Annan, N. T., Borza, A. D. et Hansen, L. T. 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 (2), 184‑193.

Antunes, A. E. C., Silva e. Alves, A. T., Gallina, D. A., Trento, F. K. H. S., Zacarchenco, P. B., Van Dender, A. G. F., Moreno, I., Ormenese, R. C. S. C. et Spadoti, L. M. 2014. Development and shelf-life determination of pasteurized, microfiltered, lactose hydrolyzed skim milk. *J. Dairy Sci.*, 97 (9), 5337‑5344.

AOAC. 1990. *Official methods of analysis* (Fifteenth Edition; édité par K. Helrich), Arlington, Virginia, USA : Association of Official Analytical Chemists, Inc.

Ardawi, M. S. M. 1986. The transport of glutamine and alanine into rat colonocytes. *Biochem. J.*, 238 (1), 131‑135.

Ashida, K., Katsura, T., Motohashi, H., Saito, H. et Inui, K.-I. 2002. Thyroid hormone regulates the activity and expression of the peptide transporter PEPT1 in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 282 (4), G617-623.

Ashida, K., Katsura, T., Saito, H. et Inui, K. 2004. Decreased activity and expression of intestinal oligopeptide transporter PEPT1 in rats with hyperthyroidism in vivo. *Pharm. Res.*, 21 (6), 969‑975.

Augustin, L. S., Franceschi, S., Jenkins, D. J. A., Kendall, C. W. C. et La Vecchia, C. 2002. Glycemic index in chronic disease: a review. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 56 (11), 1049‑1071.

Azarnia, S., Lee, B. H., St-Gelais, D., Champagne, C. P. et Kilcawley, K. N. 2010. Effect of Free or Encapsulated Recombinant Aminopeptidase of *Lactobacillus rhamnosus* S93 on Acceleration of Cheddar Cheese Ripening. *Food Biotechnol.*, 24 (2), 135‑149.

Azarnia, S., Lee, B., St-Gelais, D., Kilcawley, K. et Noroozi, E. 2011. Effect of free and encapsulated recombinant aminopeptidase on proteolytic indices and sensory characteristics of Cheddar cheese. *LWT - Food Sci. Technol.*, 44 (2), 570‑575.

Bangs, W. E. et Reineccius, G. A. 1982. Influence of Dryer Infeed Matrices on the Retention of Volatile Flavor Compounds During Spray Drying. *J. Food Sci.*, 47 (1), 254‑259.

Bao, J. et Bergman, C. J. 2004. The functionality of rice starch. *Woodhead Publ. Food Sci. Technol.*, 258‑294.

Baranauskienė, R., Bylaitė, E., Žukauskaitė, J. et Venskutonis, R. P. 2007. Flavor Retention of Peppermint (Mentha piperita L.) Essential Oil Spray-Dried in Modified Starches during Encapsulation and Storage. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (8), 3027‑3036.

Baranauskienė, R., Venskutonis, P. R., Dewettinck, K. et Verhé, R. 2006. Properties of oregano (Origanum vulgare L.), citronella (Cymbopogon nardus G.) and marjoram (Majorana hortensis L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices. *Food Res. Int.*, 39 (4), 413‑425.

Barbe, F., Boirie, Y., Dupont, D. et Gaudichon, C. 2015. Devenir digestif des matrices laitières : applications aux fractions protéiques. *Struct. Aliments Eff. Nutr.*

Barichello, V., Yada, R. Y., Coffin, R. H. et Stanley, D. W. 1990. Low Temperature Sweetening in Susceptible and Resistant Potatoes: Starch Structure and Composition. *J. Food Sci.*, 55 (4), 1054‑1059.

Barillas, C. et Solomons, N. W. 1987. Effective Reduction of Lactose Maldigestion in Preschool Children by Direct Addition of β-Galactosidases to Milk at Mealtime. *Pediatrics*, 79 (5), 766‑772.

Batista, K. A., Prudêncio, S. H. et Fernandes, K. F. 2010. Changes in the functional properties and antinutritional factors of extruded hard-to-cook common beans (Phaseolus vulgaris, L.). *J. Food Sci.*, 75 (3), C286-290.

Bayram, Ö. A., Bayram, M. et Tekin, A. R. 2008. Whey Powder as a Carrier in Spray Drying of Sumac Concentrate. *J. Food Process Eng.*, 31 (1), 105‑119.

Beard, H. H. et Barnes, B. O. 1931. The influence of feeding proteins, amino acids, and related substances upon creatine-creatinine metabolism. *J. Biol. Chem.*, 94 (1), 49‑69.

Begum, M., Li, H. L., Hossain, M. M. et Kim, I. H. 2015. Dietary bromelain-C.3.4.22.32 supplementation improves performance and gut health in sows and piglets. *Livest. Sci.*, 180, 177‑182.

Behrman, H. R. et Kare, M. R. 1969. Adaptation of canine pancreatic enzymes to diet composition. *J. Physiol.*, 205 (3), 667‑676.

Benedetti, F., Lanotte, M., Lopiano, L. et Colloca, L. 2007. When words are painful: unraveling the mechanisms of the nocebo effect. *Neuroscience*, 147 (2), 260‑271.

Berg, N. O., Dahlqvist, A., Lindberg, T. et Studnitz, W. V. 1969. Severe Familial Lactose Intolerance–a Gastrogen Disorder? *Acta Pædiatrica*, 58 (5), 525‑527.

Berger, J. L., Lee, B. H. et Lacroix, C. 1995. Oligosaccharides synthesis by free and immobilized β-galactosidases from Thermus aquaticus YT-1. *Biotechnol. Lett.*, 17 (10), 1077‑1080.

Bernier, J. J., Jian, R., Corring, T., Desjeux, J. F., Flourie, B., Bouhnik, Y. et Cherbut, C. 2010. Digestion et absorption. Dans *Dossier scientifique de l'IFN : Les glucides, tome 2*.

Bertolini, A. C., Siani, A. C. et Grosso, C. R. F. 2001. Stability of Monoterpenes Encapsulated in Gum Arabic by Spray-Drying. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2), 780‑785.

Bhandari, B. 2008. Device and method for preparing microparticles. Brevet US20110008293 A1.

Bhandari, B. R., Dumoulin, E. D., Richard, H. M. J., Noleau, I. et Lebert, A. M. 1992. Flavor Encapsulation by Spray Drying: Application to Citral and Linalyl Acetate. *J. Food Sci.*, 57 (1), 217‑221.

Bhutta, Z. A. et Sadiq, K. 2013. Protein Digestion and Bioavailability. Dans *Encyclopedia of Human Nutrition*, Elsevier Ltd.

Biliaderis, C. G., Page, C. M., Slade, L. et Sirett, R. R. 1985. Thermal behavior of amylose-lipid complexes. *Carbohydr. Polym.*, 5 (5), 367‑389.

Biller, J. A., King, S., Rosenthal, A. et Grand, R. J. 1987. Efficacy of lactase-treated milk for lactose-intolerant pediatric patients. *J. Pediatr.*, 111 (1), 91‑94.

Björck, I., Nyman, M., Pedersen, B., Siljeström, M., Asp, N.-G. et Eggum, B. O. 1987. Formation of enzyme resistant starch during autoclaving of wheat starch: Studies in vitro and in vivo. *J. Cereal Sci.*, 6 (2), 159‑172.

Boivin, M., Flourie, B., Rizza, R. A., Go, V. L. et DiMagno, E. P. 1988. Gastrointestinal and metabolic effects of amylase inhibition in diabetics. *Gastroenterology*, 94 (2), 387‑394.

Bornet, F. R. J., Jardy-Gennetier, A.-E., Jacquet, N. et Stowell, J. 2007. Glycaemic response to foods: impact on satiety and long-term weight regulation. *Appetite*, 49 (3), 535‑553.

Boursier, B. 2005. Amidons natifs et amidons modifiés alimentaires. *Tech. Ing.*, F4690.

Braun, M. et Niederreiter, C. 2012. Lactase containing milk powder. Brevet EP2470027 A1.

Brennan, C. S., Blake, D. E., Ellis, P. R. et Schofield, J. D. 1996. Effects of Guar Galactomannan on Wheat Bread

Microstructure and on theIn vitroandIn vivoDigestibility of Starch in Bread. *J. Cereal Sci.*, 24 (2), 151-160.

Briet, F., Pochart, P., Marteau, P., Flourie, B., Arrigoni, E. et Rambaud, J. C. 1997. Improved clinical tolerance to chronic lactose ingestion in subjects with lactose intolerance: a placebo effect? *Gut*, 41 (5), 632-635.

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

Broadhead, J., Rouan, S. K. E., Hau, I. et Rhodes, C. T. 1994. The Effect of Process and Formulation Variables on the Properties of Spray-dried β-Galactosidase. *J. Pharm. Pharmacol.*, 46 (6), 458-467.

Brouns, F., Bjorck, I., Frayn, K. N., Gibbs, A. L., Lang, V., Slama, G. et Wolever, T. M. S. 2005. Glycaemic index methodology. *Nutr. Res. Rev.*, 18 (1), 145-171.

Brownlee, I. A., Seal, C. J., Wilcox, M., Dettmar, P. W. et Pearson, J. P. 2009. Applications of Alginates in Food. Dans *Alginates: Biology and Applications* (vol. 13, p. 211-228), Springer.

Brückner, M., Bade, M. et Kunz, B. 2007. Investigations into the stabilization of a volatile aroma compound using a combined emulsification and spray drying process. *Eur. Food Res. Technol.*, 226 (1-2), 137-146.

Buchanan, R. A. 1969. In vivo and in vitro methods of measuring nutritive value of leaf-protein preparations. *Br. J. Nutr.*, 23 (3), 533–545.

Buddington, R. K. et Diamond, J. M. 1990. Ontogenetic development of monosaccharide and amino acid transporters in rabbit intestine. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, 259 (4), G544-G555.

Buffo, R. et Reineccius, G. 2000. Optimization of gum acacia/modified starch/maltodextrin blends for the spray drying of flavors. *Perfum. Flavorist*, 25 (4), 45-54.

Buléon, A., Colonna, P. et Leloup, V. 1990. Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales. *Ind. Aliment. Agric.*, 107 (6).

Burden, S. 2001. Dietary treatment of irritable bowel syndrome: current evidence and guidelines for future practice. *J. Hum. Nutr. Diet. Off. J. Br. Diet. Assoc.*, 14 (3), 231-241.

Burnside, E. 2014. Hydrocolloids and Gums as Encapsulating Agents. Dans *Microencapsulation in the Food Industry* (p. 241-252), Elsevier.

Buszewski, B. et Noga, S. 2012. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.*, 402 (1), 231-247.

Calbet, J. A. L. et Holst, J. J. 2004. Gastric emptying, gastric secretion and enterogastrone response after administration of milk proteins or their peptide hydrolysates in humans. *Eur. J. Nutr.*, 43 (3), 127-139.

Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. et Henrissat, B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.*, 37, 233-238.

Capriles, V. d., Coelho, K. d., Guerra-Matias, A. c. et Arêas, J. a. g. 2008. Effects of Processing Methods on Amaranth Starch Digestibility and Predicted Glycemic Index. *J. Food Sci.*, 73 (7), H160-H164.

Carino, G. P. et Mathiowitz, E. 1999. Oral insulin delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 35 (2–3), 249-257.

Case, S. E., Capitani, T., Whaley, J. K., Shi, Y. C., Trzasko, P., Jeffcoat, R. et Goldfarb, H. B. 1998. Physical Properties and Gelation Behavior of a Low-Amylopectin Maize Starch and Other High-

Amylose Maize Starches. *J. Cereal Sci.*, 27 (3), 301-314.

Cavalli-Sforza, L. T. et Strata, A. 1987. Double-blind study on the tolerance of four types of milk in lactose malabsorbers and absorbers. *Hum. Nutr. Clin. Nutr.*, 41 (1), 19-30.

Chaisawang, M. et Suphantharika, M. 2005. Effects of guar gum and xanthan gum additions on physical and rheological properties of cationic tapioca starch. *Carbohydr. Polym.*, 61 (3), 288-295.

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

Chang, C. P., Leung, T. K., Lin, S. M. et Hsu, C. C. 2006. Release properties on gelatin-gum arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 50 (2), 136-140.

Charve, J. et Reineccius, G. A. 2009. Encapsulation Performance of Proteins and Traditional Materials for Spray Dried Flavors. *J. Agric. Food Chem.*, 57 (6), 2486-2492.

Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F. et 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 (1-2), 185-189.

Chen, M. J. et Chen, K. N. 2007. Applications of Probiotic Encapsulation in Dairy Products. Dans *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems* (p. 83-112), Blackwell Publishing.

Chen, S. C. et Duan, K. J. 2015. Production of Galactooligosaccharides Using β-Galactosidase Immobilized on Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles with Tris(hydroxymethyl)phosphine as an Optional Coupling Agent. *Int. J. Mol. Sci.*, 16 (6), 12499-12512.

Chen, Y. F., Feng, Z. T., Wen, S. H. et Lu, G. J. 1987. Effect of vasoactive intestinal peptide, somatostatin, neurotensin, cholecystokinin octapeptide, and secretin on intestinal absorption of amino acid in rat. *Dig. Dis. Sci.*, 32 (10), 1125-1129.

Chen, Y., Yang, J., Dave, R. N. et Pfeffer, R. 2009. Granulation of cohesive Geldart group C powders in a Mini-Glatt fluidized bed by pre-coating with nanoparticles. *Powder Technol.*, 191 (1–2), 206-217.

Cheng, A. H., Brunser, O., Espinoza, J., Fones, H. L., Monckeberg, F., Chichester, C. O., Rand, G. et Hourigan, A. G. 1979. Long-term acceptance of low-lactose milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32 (10), 1989-1993.

Cho, Y. H., Lee, J. J., Park, I. B., Huh, C. S., Baek, Y. J. et Park, J. 2005. Protective Effect of Microencapsulation Consisting of Multiple Emulsification and Heat Gelation Processes on Immunoglobulin in Yolk. *J. Food Sci.*, 70 (2), 148-151.

Choi, S. J., Woo, H. D., Ko, S. H. et Moon, T. W. 2008. Confocal Laser Scanning Microscopy to Investigate the Effect of Cooking and Sodium Bisulfite on In Vitro Digestibility of Waxy Sorghum Flour. *Cereal Chem.*, 85 (1), 65-69.

Chung, H.-J., Lim, H. S. et Lim, S.-T. 2006. Effect of partial gelatinization and retrogradation on the enzymatic digestion of waxy rice starch. *J. Cereal Sci.*, 43 (3), 353-359.

Chung, H.-J., Liu, Q. et Hoover, R. 2009. Impact of annealing and heat-moisture treatment on rapidly digestible, slowly digestible and resistant starch levels in native and gelatinized corn, pea and lentil starches. *Carbohydr. Polym.*, 75 (3), 436-447.

Chung, H.-J., Liu, Q., Lee, L. et Wei, D. 2011. Relationship between the structure, physicochemical properties and in vitro

digestibility of rice starches with different amylose contents. *Food Hydrocoll.*, 25 (5), 968-975.

Chung, H.-J., Shin, D.-H. et Lim, S.-T. 2008. In vitro starch digestibility and estimated glycemic index of chemically modified corn starches. *Food Res. Int.*, 41 (6), 579-585.

Claude, M. et Jardy, A. 1994. Chromatographie en phase liquide - Théorie et méthodes de séparation. *Tech. Ing.*

Coenen, T. M., Bertens, A. M., de Hoog, S. C. et Verspeek-Rip, C. M. 2000. Safety evaluation of a lactase enzyme preparation derived from Kluyveromyces lactis. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.*, 38 (8), 671-677.

Colonna, P. et Mercier, C. 1984. Macromolecular structure of wrinkled- and smooth-pea starch components. *Carbohydr. Res.*, 126 (2), 233-247.

Combes, D. et Monsan, P. 2009. Biocatalyse ou catalyse enzymatique. *Tech. Ing.*, Bio590.

Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D. et Khutoryanskiy, V. V. 2012. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, 162 (1), 56-67.

Cooke, D. et Gidley, M. J. 1992. Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition. *Carbohydr. Res.*, 227, 103-112.

Corazza, G. R., Benati, G., Sorge, M., Strocchi, A., Calza, G. et Gasbarrini, G. 1992. β-Galactosidase from Aspergillus niger in adult lactose malabsorption: a double-blind crossover study. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 6 (1), 61-66.

Corgneau, M., Scher, J., Ritié-Pertusa, L., Le, D. T. L., Petit, J., Nikolova, Y., Banon, S. et Gaiani, C. 2015. Recent Advances on Lactose Intolerance: Tolerance Thresholds and Currently Available Solutions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, In press.

Corzo, N., Olano, A. et Martinez-Castro, I. 2009. Carbohydrates. Dans *Handbook of Dairy Foods Analysis* (p. 139-168), CRC Press.

Crawley, J. N. et Corwin, R. L. 1994. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides*, 15 (4), 731-755.

Crépon, K., Marget, P., Peyronnet, C., Carrouée, B., Arese, P. et Duc, G. 2010. Nutritional value of faba bean (Vicia faba L.) seeds for feed and food. *Field Crops Res.*, 115 (3), 329-339.

Crowe, T. C., Seligman, S. A. et Copeland, L. 2000. Inhibition of enzymic digestion of amylose by free fatty acids in vitro contributes to resistant starch formation. *J. Nutr.*, 130 (8), 2006-2008.

Davidov-Pardo, G., Roccia, P., Salgado, D., Leon, A. E. et Pedroza-Islas, R. 2008. Utilization of Different Wall Materials to Microencapsulate Fish Oil Evaluation of its Behavior in Bread Products. *Am. J. Food Technol.*, 3 (6), 384-393.

de Lencastre Novaes, L. C., Jozala, A. F., Lopes, A. M., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Mazzola, P. G. et Pessoa Junior, A. 2016. Stability, purification, and applications of bromelain: A review. *Biotechnol. Prog.*, 32 (1), 5-13.

de Pomerai, D. I., Smith, B., Dawe, A., North, K., Smith, T., Archer, D. B., Duce, I. R., Jones, D. et Candido, E. P. M. 2003. Microwave radiation can alter protein conformation without bulk heating. *FEBS Lett.*, 543 (1–3), 93-97.

Dean, J. R. 2012. Microwave Extraction. Dans *Comprehensive Sampling and Sample Preparation* (p. 135-149), Elsevier.

Dekker, P. J. T. et Daamen, C. B. G. 2011. Enzymes exogenous to milk in dairy technology | β-d-Galactosidase. Dans *Encyclopedia of Dairy Sciences* (p. 276-283), Elsevier.

Desai, K. G. H. et Park, H. J. 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Dry. Technol.*, 23 (7), 1361-1394.

Desmond, C., Ross, R. P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G. et Stanton, C. 2002. Improved survival of Lactobacillus paracasei NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *J. Appl. Microbiol.*, 93 (6), 1003-1011.

Desnuelle, P., Reboud, J. P. et Abdeljlil, A. B. 1962. Influence of the Composition of the Diet on the Enzyme Content of Rat Pancreas. Dans *The Exocrine Pancreas: Normal and Abnormal Functions* (p. 90-114), John Wiley & Sons, Ltd.

Devi, A. F., Fibrianto, K., Torley, P. J. et Bhandari, B. 2009. Physical properties of cryomilled rice starch. *J. Cereal Sci.*, 49 (2), 278-284.

Dewit, O., Pochart, P. et Desjeux, J. F. 1988. Breath hydrogen concentration and plasma glucose, insulin and free fatty acid levels after lactose, milk, fresh or heated yogurt ingestion by healthy young adults with or without lactose malabsorption. *Nutrition*, 4 (2), 131-135.

Dhital, S., Shrestha, A. K. et Gidley, M. J. 2010. Relationship between granule size and in vitro digestibility of maize and potato starches. *Carbohydr. Polym.*, 82 (2), 480-488.

Dickson, R. C., Dickson, L. R. et Markin, J. S. 1979. Purification and properties of an inducible beta-galactosidase isolated from the yeast Kluyveromyces lactis. *J. Bacteriol.*, 137 (1), 51-61.

Diekmann, L., Pfeiffer, K. et Naim, H. Y. 2015. Congenital lactose intolerance is triggered by severe mutations on both alleles of the lactase gene. *BMC Gastroenterol.*, 15 (1).

Dinakar, P. et Mistry, V. V. 1994. Growth and Viability of Bifidobacterium bifidum in Cheddar Cheese1. *J. Dairy Sci.*, 77 (10), 2854-2864.

Ding, W. K. et Shah, N. P. 2009. Effect of Various Encapsulating Materials on the Stability of Probiotic Bacteria. *J. Food Sci.*, 74 (2), M100-M107.

DiPalma, J. A. et Collins, M. S. 1989. Enzyme replacement for lactose malabsorption using a beta-D-galactosidase. *J. Clin. Gastroenterol.*, 11 (3), 290-293.

D'Mello, J. P. F. (dir.). 2012. *Amino Acids in Human Nutrition and Health*, CABI.

Donovan, J. W. 1979. Phase transitions of the starch–water system. *Biopolymers*, 18 (2), 263-275.

Draget, K. I. 2009. Alginates. Dans *Handbook of Hydrocolloids* (p. 807-828), Elsevier.

Dreher, M. L., Dreher, C. J., Berry, J. W. et Fleming, S. E. 1984. Starch digestibility of foods: A nutritional perspective. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 20 (1), 47-71.

Dreznik, Z., Meininger, T. A., Barteau, J. A., Brocksmith, D. et Soper, N. J. 1994. Effect of ileal oleate on interdigestive intestinal motility of the dog. *Dig. Dis. Sci.*, 39 (7), 1511-1518.

Drossman, D. A., Camilleri, M., Mayer, E. A. et Whitehead, W. E. 2002. AGA technical review on irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 123 (6), 2108-2131.

Drusch, S., Serfert, Y. et Schwarz, K. 2006. Microencapsulation of fish oil with n-octenylsuccinate-derivatised starch: Flow properties and oxidative stability. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 108 (6), 501-512.

Ducel, V., Richard, J., Popineau, Y. et Boury, F. 2004. Adsorption kinetics and rheological interfacial properties of plant proteins at the oil-water interface. *Biomacromolecules*, 5 (6), 2088-2093.

Duodu, K. G., Taylor, J. R. N., Belton, P. S. et Hamaker, B. R. 2003. Factors affecting sorghum protein digestibility. *J. Cereal Sci.*, 38 (2), 117-131.

EFSA. 2011. *Scientific Opinion Part III on the substantiation of health claims related to various food(s)/food constituent(s) not supported by pertinent human data* (Scientific opinion), Parma, Italy.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. 2009. *Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to lactase enzyme and breaking down lactose (ID 1697, 1818) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006*, Parma, Italy : EFSA.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. 2010. Scientific Opinion on lactose thresholds in lactose intolerance and galactosaemia. *EFSA J.*, 8 (9), 1777-1806.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. 2011. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to foods with reduced lactose content and decreasing gastro-intestinal discomfort caused by lactose intake in lactose intolerant individuals (ID 646, 1224, 1238, 1339) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006, 9 (6), 2236-2250.

Ehlermann, D. A. E. 2002. Microwave processing. Dans C. J. K. Henry et C. Chapman (dir.), *The Nutrition Handbook for Food Processors*, Boca Raton, FL : CRC Press.

Ehren, J., Govindarajan, S., Morón, B., Minshull, J. et Khosla, C. 2008. Protein engineering of improved prolyl endopeptidases for celiac sprue therapy. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS*, 21 (12), 699-707.

Eissele, R., Göke, R., Willemer, S., Harthus, H. P., Vermeer, H., Arnold, R. et Göke, B. 1992. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur. J. Clin. Invest.*, 22 (4), 283-291.

El Mafadi, S. et Poncelet, D. 2007. L'enrobage en lit fluidisé pour la production de microcapsules. Dans *Microencapsulation : des sciences aux technologies* (Tech & Doc), Paris : Lavoisier.

Elashoff, J. D., Reedy, T. J. et Meyer, J. H. 1982. Analysis of gastric emptying data. *Gastroenterology*, 83 (6), 1306-1312.

Ellis, P. R., Roberts, F. G., Low, A. G. et Morgan, L. M. 1995. The effect of high-molecular-weight guar gum on net apparent glucose absorption and net apparent insulin and gastric inhibitory polypeptide production in the growing pig: relationship to rheological changes in jejunal digesta. *Br. J. Nutr.*, 74 (4), 539-556.

Emami, S., Perera, A., Meda, V. et Tyler, R. T. 2011. Effect of Microwave Treatment on Starch Digestibility and Physico-chemical Properties of Three Barley Types. *Food Bioprocess Technol.*, 5 (6), 2266-2274.

Englyst, H. N., Kingman, S. M. et Cummings, J. H. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 46 Suppl 2, S33-50.

Englyst, K. N., Englyst, H. N., Hudson, G. J., Cole, T. J. et Cummings, J. H. 1999. Rapidly available glucose in foods: an in vitro measurement that reflects the glycemic response. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69 (3), 448-454.

Englyst, K. N., Hudson, G. J. et Englyst, N. E. 2011. Starch analysis in food. Dans *Encyclopedia of analytical chemistry*.

Erickson, R. H., Gum, J. R., Lindstrom, M. M., McKean, D. et Kim, Y. S. 1995. Regional expression and dietary regulation of rat small intestinal peptide and amino acid transporter mRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 216 (1), 249-257.

Evans, I. D. et Haisman, D. R. 1982. The Effect of Solutes on the Gelatinization Temperature Range of Potato Starch. *Starch - Stärke*, 34 (7), 224-231.

Ezeogu, L. I., Duodu, K. G., Emmambux, M. N. et Taylor, J. R. N. 2008. Influence of Cooking Conditions on the Protein Matrix of Sorghum and Maize Endosperm Flours. *Cereal Chem. J.*, 85 (3), 397-402.

Faiveley, M. 2012. L'eau et la conservation des aliments. *Tech. Ing.*, F1011.

Fang, Z. et Bhandari, B. 2012. Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation.

FAO. 2013. *Dietary protein quality evaluation in human nutrition* (n° 92), Rome.

FAO/WHO. 1990. *Protein quality evaluation: report of the joint FAO/WHO expert consultation*, Rome, Italie.

FAO/WHO. 1998. *Carbohydrates in human nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation (Rome, 14–18 April 1997)* (n° 66).

FAO/WHO/ONU. 1985. *Energy and protein requirements: report of the joint FAO/WHO/UNU expert consultation*, Genève, Suisse.

Fardet, A., Souchon, I. et Dupont, D. 2013. *Structure des aliments et effets nutritionnels*, Editions Quae.

Fedewa, A. et Rao, S. S. C. 2013. Dietary Fructose Intolerance, Fructan Intolerance and FODMAPs. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 16 (1), 370.

Ferraris, R. P., Diamond, J. et Kwan, W. W. 1988. Dietary regulation of intestinal transport of the dipeptide carnosine. *Am. J. Physiol.*, 255 (2 Pt 1), G143-150.

Ferraris, R. P. et Diamond, J. M. 1989. Specific regulation of intestinal nutrient transporters by their dietary substrates. *Annu. Rev. Physiol.*, 51, 125-141.

Finot, P.-A. 1990. Metabolic and physiological consequences of Maillard reaction products. Dans *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology* (p. 259-272), Basel : Birkhauser.

Flatz, G. 1987. Genetics of lactose digestion in humans. *Adv. Hum. Genet.*, 16, 1-77.

Florent, C., Flourie, B., Leblond, A., Rautureau, M., Bernier, J. J. et Rambaud, J. C. 1985. Influence of chronic lactulose ingestion on the colonic metabolism of lactulose in man (an in vivo study). *J. Clin. Invest.*, 75 (2), 608-613.

Folch, J., Lees, M. et Sloane Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226 (1), 497-509.

Folkes, D. J. et Crane, L. 1982. Determination of carbohydrates. Dans *HPLC in food analysis*, Academic Press.

Forssell, P. 2004. Starch-based microencapsulation. Dans *Starch in Food: Structure, Function and Applications* (p. 461-473), CRC Press.

Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. et O'Mahony, J. A. 2015. Lactose. Dans *Dairy Chemistry and Biochemistry* (p. 21-68), Springer International Publishing.

Freeman, H. J., Sleisenger, M. H. et Kim, Y. S. 1983. Human protein digestion and absorption: normal mechanisms and protein-energy malnutrition. *Clin. Gastroenterol.*, 12 (2), 357-378.

Frei, M., Siddhuraju, P. et Becker, K. 2003. Studies on the in vitro starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. *Food Chem.*, 83 (3), 395-402.

Frey, C. 2014. Fluid Bed Coating-Based Microencapsulation. Dans *Microencapsulation in the Food Industry* (p. 65-79), Elsevier.

Friedman, M. 1999. Chemistry, biochemistry, nutrition, and microbiology of lysinoalanine, lanthionine, and histidinoalanine in food and other proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (4), 1295-1319.

Friedman, M. 1999. Chemistry, Nutrition, and Microbiology of d-Amino Acids. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (9), 3457-3479.

Friedman, M. et Brandon, D. L. 2001. Nutritional and health benefits of soy proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (3), 1069‑1086.

Friend, B. A. et Shahani, K. M. 1982. Characterization and evaluation of Aspergillus oryzae lactase coupled to a regenerable support. *Biotechnol. Bioeng.*, 24 (2), 329‑345.

Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Pinto, S. S., Muñoz, I. B. et Amboni, R. D. M. C. 2013. Effect of microencapsulation on survival of Bifidobacterium BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT - Food Sci. Technol.*, 50 (1), 39‑44.

Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete, M. J., Sánchez-Zapata, E. et Pérez-Álvarez, J. A. 2010. Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Res. Int.*, 43 (4), 931‑942.

Fuhrmann, G. et Leroux, J.-C. 2011. In vivo fluorescence imaging of exogenous enzyme activity in the gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108 (22), 9032‑9037.

Fuhrmann, G. et Leroux, J.-C. 2014. Improving the stability and activity of oral therapeutic enzymes-recent advances and perspectives. *Pharm. Res.*, 31 (5), 1099‑1105.

Fukushima, D. 2011. Soy proteins. Dans *Handbook of Food Proteins* (p. 210‑232), Elsevier.

Fustier, P., Achouri, A., Taherian, A. R., Britten, M., Pelletier, M., Sabik, H., Villeneuve, S. et Mondor, M. 2015. Protein–Protein Multilayer Oil-in-Water Emulsions for the Microencapsulation of Flaxseed Oil: Effect of Whey and Fish Gelatin Concentration. *J. Agric. Food Chem.*, 63 (42), 9239‑9250.

Gallagher, C. R., Molleson, A. L. et Caldwell, J. H. 1974. Lactose intolerance and fermented dairy products. *J. Am. Diet. Assoc.*, 65 (4), 418‑419.

Ganapathy, V. 2012. Protein Digestion and Absorption. Dans *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Fifth Edition)* (p. 1595‑1623), Boston : Academic Press.

Gao, K.-P., Mitsui, T., Fujiki, K., Ishiguro, H. et Kondo, T. 2002. Effect of lactase preparations in asymptomatic individuals with lactase deficiency--gastric digestion of lactose and breath hydrogen analysis. *Nagoya J. Med. Sci.*, 65 (1‑2), 21‑28.

Gardner, M. L., Lindblad, B. S., Burston, D. et Matthews, D. M. 1983. Trans-mucosal passage of intact peptides in the guinea-pig small intestine in vivo: a re-appraisal. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979*, 64 (4), 433‑439.

Gardner, W. H. et Whitmore, W. F. 1929. Nature and Constitution of Shellac I–Preliminary Investigation of the Action of Organic Solvents. *Ind. Eng. Chem.*, 21 (3), 226‑229.

Gasbarrini, A., Corazza, G. R., Gasbarrini, G., Montalto, M., Di Stefano, M., Basilisco, G., Parodi, A., Usai-Satta, P., Satta, P. U., Vernia, P., Anania, C., Astegiano, M., Barbara, G., Benini, L., Bonazzi, P., Capurso, G., Certo, M., Colecchia, A., Cuoco, L., Di Sario, A., Festi, D., Lauritano, C., Miceli, E., Nardone, G., Perri, F., Portincasa, P., Risicato, R., Sorge, M. et Tursi, A. 2009. Methodology and indications of H2-breath testing in gastrointestinal diseases: the Rome Consensus Conference. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 29 Suppl 1, 1‑49.

Gatel, F. 1994. Protein quality of legume seeds for non-ruminant animals: a literature review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 45 (3–4), 317‑348.

Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S. et Marchioni, E. 2009. Microencapsulation of Lactobacillus plantarum spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *Int. J. Food Microbiol.*, 129 (1), 103‑105.

Geldart, D. 1973. Types of gas fluidization. *Powder Technol.*, 7 (5), 285–292.

Gertler, M. M., Garn, S. M. et White, P. D. 1950. Diet, Serum Cholesterol and Coronary Artery Disease. *Circulation*, 2 (5), 696‑704.

Gharsallaoui, A., Cases, E., Chambin, O. et Saurel, R. 2009. Interfacial and Emulsifying Characteristics of Acid-treated Pea Protein. *Food Biophys.*, 4 (4), 273-280.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. et Saurel, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.*, 40 (9), 1107-1121.

Gharsallaoui, A., Saurel, R., Chambin, O., Cases, E., Voilley, A. et Cayot, P. 2010. Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilised oil-in-water emulsions. *Food Chem.*, 122 (2), 447-454.

Gharsallaoui, A., Saurel, R., Chambin, O. et Voilley, A. 2012. Pea (Pisum sativum, L.) Protein Isolate Stabilized Emulsions: A Novel System for Microencapsulation of Lipophilic Ingredients by Spray Drying. *Food Bioprocess Technol.*, 5 (6), 2211-2221.

Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I. et Mulligan, C. N. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 50 (3), 213-224.

Gilani, G. S., Xiao, C. W. et Cockell, K. A. 2012. Impact of antinutritional factors in food proteins on the digestibility of protein and the bioavailability of amino acids and on protein quality. *Br. J. Nutr.*, 108 Suppl 2, S315-332.

Gilliland, S. E. et Kim, H. S. 1984. Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans. *J. Dairy Sci.*, 67 (1), 1-6.

Glenn, G. M., Klamczynski, A. P., Woods, D. F., Chiou, B., Orts, W. J. et Imam, S. H. 2010. Encapsulation of Plant Oils in Porous Starch Microspheres. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (7), 4180-4184.

Godet, M. C., Tran, V., Delage, M. M. et Buléon, A. 1993. Molecular modelling of the specific interactions involved in the amylose complexation by fatty acids. *Int. J. Biol. Macromol.*, 15 (1), 11-16.

Gómez-Estaca, J., Gavara, R. et Hernández-Muñoz, P. 2015. Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 29, 302-307.

Goñi, I., Garcia-Alonso, A. et Saura-Calixto, F. 1997. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutr. Res.*, 17 (3), 427-437.

Gorrill, A. D. L. et Thomas, J. W. 1967. Trypsin, chymotrypsin, and total proteolytic activity of pancreas, pancreatic juice, and intestinal contents from the bovine. *Anal. Biochem.*, 19 (2), 211-225.

Grabovac, V. et Bernkop-Schnürch, A. 2006. Improvement of the intestinal membrane permeability of low molecular weight heparin by complexation with stem bromelain. *Int. J. Pharm.*, 326 (1–2), 153-159.

Grandison, A. S. et Glover, F. A. 1994. Membrane processing of milk. Dans R. K. Robinson (dir.), *Modern Dairy Technology*, Boston, MA : Springer US.

Granfeldt, Y., Björck, I. et Hagander, B. 1991. On the importance of processing conditions, product thickness and egg addition for the glycaemic and hormonal responses to pasta: a comparison with bread made from « pasta ingredients ». *Eur. J. Clin. Nutr.*, 45 (10), 489-499.

Greeley, G. H., Hashimoto, T., Izukura, M., Gomez, G., Jeng, J., Hill, F. L., Lluis, F. et Thompson, J. C. 1989. A comparison of intraduodenally and intracolonically administered nutrients on the release of peptide-YY in the dog. *Endocrinology*, 125 (4), 1761-1765.

Greenberg, N. A. et Mahoney, R. R. 1981. Immobilisation of lactase (beta-galactosidase) for use in dairy processing: a review. *Process Biochem.*, 16, 2-8.

Grimble, G. K. et Silk, D. B. A. 1989. Peptides in Human Nutrition. *Nutr. Res. Rev.*, 2 (1), 87–108.

Grossiord, J. L. et Quemada, D. 2002. Des concepts aux outils. Dans *Comprendre la rhéologie* (p. 9-34).

Grossman, M. I., Greengard, H. et Ivy, A. C. 1944. On the Mechanism of the Adaptation of Pancreatic Enzymes to Dietary Composition. *Am. J. Physiol. -- Leg. Content*, 141 (1), 38-41.

Grosvenor, M. B. et Smolin, L. A. 2009. *Visualizing Nutrition: Everyday Choices*, John Wiley & Sons.

Guérin, C., Musikaphun, N., Dupont, D., Jardin, J., Briard-Bion, V., Pasco, M. et Nau, F. 2012. Ovalbumin aggregation due to heating in solution increases its in vitro digestibility, compared to the native and dry-heated protein, Communication présentée au 1 st Food Structures, Digestion & Health Conference.

Guha, M., Ali, S. Z. et Bhattacharya, S. 1997. Twin-screw extrusion of rice flour without a die: Effect of barrel temperature and screw speed on extrusion and extrudate characteristics. *J. Food Eng.*, 32 (3), 251-267.

Guillarme, D. 2014. Évolutions majeures en chromatographie liquide. *Tech. Ing.*

Guo, M. R., Fox, P. F., Flynn, A. et Kindstedt, P. S. 1995. Susceptibility of β-Lactoglobulin and Sodium Caseinate to Proteolysis by Pepsin and Trypsin. *J. Dairy Sci.*, 78 (11), 2336-2344.

Haber, G. B., Heaton, K. W., Murphy, D. et Burroughs, L. F. 1977. Depletion and disruption of dietary fibre. Effects on satiety, plasma-glucose, and serum-insulin. *Lancet Lond. Engl.*, 2 (8040), 679-682.

Habte, D., Sterky, G. et Hjalmarsson, B. 1973. Lactose malabsorption in Ethiopian children. *Acta Paediatr. Scand.*, 62 (6), 649-654.

Hale, L. P. 2004. Proteolytic activity and immunogenicity of oral bromelain within the gastrointestinal tract of mice. *Int. Immunopharmacol.*, 4 (2), 255-264.

Hale, L. P., Greer, P. K., Trinh, C. T. et Gottfried, M. R. 2005. Treatment with oral bromelain decreases colonic inflammation in the IL-10-deficient murine model of inflammatory bowel disease. *Clin. Immunol. Orlando Fla*, 116 (2), 135-142.

Hamuro, Y., Coales, S. J., Molnar, K. S., Tuske, S. J. et Morrow, J. A. 2008. Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*, 22 (7), 1041-1046.

Han, J.-A. et BeMiller, J. N. 2007. Preparation and physical characteristics of slowly digesting modified food starches. *Carbohydr. Polym.*, 67 (3), 366-374.

Hanefeld, U., Gardossi, L. et Magner, E. 2009. Understanding enzyme immobilisation. *Chem. Soc. Rev.*, 38 (2), 453-468.

Hank, C. R., Kunkel, M. E., Dawson, P. L., Acton, J. C. et Wardlaw, F. B. 2001. The Effect of Shell Egg Pasteurization on the Protein Quality of Albumen. *Poult. Sci.*, 80 (6), 821-824.

Hara, H., Nishikawa, H. et Kiriyama, S. 1992. Different effects of casein and soyabean protein on gastric emptying of protein and small intestinal transit after spontaneous feeding of diets in rats. *Br. J. Nutr.*, 68 (1), 59-66.

Harel, C. 2016. Le sans-lactose promis à un bel avenir. *LSA Conso*.

Harland, B. F. et Oberleas, D. 1987. Phytate in foods. *World Rev. Nutr. Diet.*, 52, 235-259.

Haug, I. J. et Draget, K. I. 2011. Gelatin. Dans *Handbook of Food Proteins* (p. 92-115), Elsevier.

Haverberg, L., Kwon, P. H. et Scrimshaw, N. S. 1980. Comparative tolerance of adolescents of differing ethic backgrounds to lactose-containing and lactose-free dairy drinks. I. Initial

experience with a double-blind procedure. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33 (1), 17-21.

He, Q., Lv, Y. et Yao, K. 2007. Effects of tea polyphenols on the activities of α-amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chem.*, 101 (3), 1178-1182.

Heck, T., Faccio, G., Richter, M. et Thöny-Meyer, L. 2013. Enzyme-catalyzed protein crosslinking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97 (2), 461-475.

Herrmann, C., Göke, R., Richter, G., Fehmann, H. C., Arnold, R. et Göke, B. 1995. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion*, 56 (2), 117-126.

Hertzler, S. R., Huynh, B. C. et Savaiano, D. A. 1996. How much lactose is low lactose? *J. Am. Diet. Assoc.*, 96 (3), 243-246.

Hertzler, S. R. et Savaiano, D. A. 1996. Colonic adaptation to daily lactose feeding in lactose maldigesters reduces lactose intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 64 (2), 232-236.

Hertzler, S., Savaiano, D. A., Jackson, K. A., Bhriain, S. N. et Suarez, F. L. 2013. Nutrient Considerations in Lactose Intolerance. Dans *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease* (p. 757-772), Elsevier.

Holst, J. J. 1994. Glucagonlike peptide 1: a newly discovered gastrointestinal hormone. *Gastroenterology*, 107 (6), 1848-1855.

Holst, J. J. 2007. The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. *Physiol. Rev.*, 87 (4), 1409-1439.

Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S. et Razavi, S. H. 2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chem.*, 111 (1), 50-55.

Hoover, R. et Zhou, Y. 2003. In vitro and in vivo hydrolysis of legume starches by α-amylase and resistant starch formation in legumes—a review. *Carbohydr. Polym.*, 54 (4), 401-417.

Hove, H., Nørgaard, H. et Mortensen, P. B. 1999. Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 53 (5), 339-350.

Howard, F. et Yudkin, J. 1963. Effect of dietary change upon the amylase and trypsin activities of the rat pancreas. *Br. J. Nutr.*, 17 (1), 281–294.

Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D. et Miller, G. A. 1977. A Multienzyme Technique for Estimating Protein Digestibility. *J. Food Sci.*, 42 (5), 1269-1273.

Hu, P., Zhao, H., Duan, Z., Linlin, Z. et Wu, D. 2004. Starch digestibility and the estimated glycemic score of different types of rice differing in amylose contents. *J. Cereal Sci.*, 40 (3), 231-237.

Huffman, L. M. et Harper, W. J. 1985. Lactose hydrolysis in batch and hollow fibre membrane reactors. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*

Hughes, G. J., Ryan, D. J., Mukherjea, R. et Schasteen, C. S. 2011. Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores (PDCAAS) for Soy Protein Isolates and Concentrate: Criteria for Evaluation. *J. Agric. Food Chem.*, 59 (23), 12707-12712.

Hunt, J. N. et Macdonald, I. 1954. The influence of volume on gastric emptying. *J. Physiol.*, 126 (3), 459-474.

Hunt, J. N. et Stubbs, D. F. 1975. The volume and energy content of meals as determinants of gastric emptying. *J. Physiol.*, 245 (1), 209-225.

Hwang, D.-K., Kim, S.-W., Kim, J.-H., Ryu, J.-H., Yoo, S.-H., Park, C.-S., Kim, B.-Y. et Baik, M.-Y. 2009. In vitro Digestibility of Hydroxypropylated and Cross-linked Waxy and Non-waxy Rice Starches. *Starch - Stärke*, 61 (1), 20-27.

Ichikawa, Y., Look, G. C. et Wong, C.-H. 1992. Enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis. *Anal. Biochem.*, 202 (2), 215-238.

Imondi, A. R. et Bird, F. H. 1967. Effects of Dietary Protein Level on Growth and Proteolytic Activity of the Avian Pancreas. *J. Nutr.*, 91 (4), 421-428.

Institut Français pour la Nutrition. 1997. *Les protéines*.

International Life Sciences Institute. 1989. Mechanism of Toxicity of Lysinoalanine. *Nutr. Rev.*, 47 (11), 362-364.

Ito, Y., Sasaki, T., Kitamoto, K., Kumagai, C., Takahashi, K., Gomi, K. et Tamura, G. 2002. Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the .BETA.-galactosidase-encoding gene (lacA) from Aspergillus oryzae. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 48 (3), 135-142.

Iyer, P. V. et Ananthanarayan, L. 2008. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem.*, 43 (10), 1019-1032.

Jacob, R., Weiner, J. R., Stadge, S. et Naim, H. Y. 2000. Additional N-glycosylation and its impact on the folding of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *J. Biol. Chem.*, 275 (14), 10630-10637.

Jacobs, I. C. 2014. Atomization and Spray-Drying Processes. Dans *Microencapsulation in the Food Industry* (p. 47-56), Elsevier.

James, P. S. et Smith, M. W. 1976. Methionine transport by pig colonic mucosa measured during early post-natal development. *J. Physiol.*, 262 (1), 151-168.

Jane, J., Chen, Y. Y., Lee, L. F., McPherson, A. E., Wong, K. S., Radosavljevic, M. et Kasemsuwan, T. 1999. Effects of Amylopectin Branch Chain Length and Amylose Content on the Gelatinization and Pasting Properties of Starch [1]. *Cereal Chem.*, 76 (5), 629-637.

Jane, J.-L., Kasemsuwan, T., Leas, S., Zobel, H. et Robyt, J. F. 1994. Anthology of Starch Granule Morphology by Scanning Electron Microscopy. *Starch - Stärke*, 46 (4), 121-129.

Jankowski, T., Zielinska, M. et Wysakowska, A. 1997. Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. *Biotechnol. Tech.*, 11 (1), 31-34.

Jansman, A. J., Frohlich, A. A. et Marquardt, R. R. 1994. Production of proline-rich proteins by the parotid glands of rats is enhanced by feeding diets containing tannins from faba beans (Vicia faba L.). *J. Nutr.*, 124 (2), 249-258.

Järvelä, I., Torniainen, S. et Kolho, K.-L. 2009. Molecular genetics of human lactase deficiencies. *Ann. Med.*, 41 (8), 568-575.

Jenkins, D. J., Jenkins, A. L., Wolever, T. M., Collier, G. R., Rao, A. V. et Thompson, L. U. 1987. Starchy foods and fiber: reduced rate of digestion and improved carbohydrate metabolism. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, 129, 132-141.

Jenkins, D. J., Wolever, T. M., Taylor, R. H., Barker, H., Fielden, H., Baldwin, J. M., Bowling, A. C., Newman, H. C., Jenkins, A. L. et Goff, D. V. 1981. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34 (3), 362-366.

Jenkins, D. J., Wolever, T. M., Taylor, R. H., Ghafari, H., Jenkins, A. L., Barker, H. et Jenkins, M. J. 1980. Rate of digestion of foods and postprandial glycaemia in normal and diabetic subjects. *Br. Med. J.*, 281 (6232), 14-17.

Jenkins, P. J., Cameron, R. E. et Donald, A. M. 1993. A Universal Feature in the Structure of Starch Granules from Different Botanical Sources. *Starch - Stärke*, 45 (12), 417-420.

Jenness, R. et Koops, J. 1962. Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Neth. Milk Dairy J.*, 16, 153-164.

Jimenez, M., García, H. et Beristain, C. 2006. Spray-dried encapsulation of Conjugated Linoleic Acid (CLA) with polymeric matrices. *J. Sci. Food Agric.*, 86 (14), 2431-2437.

Jimenez, M., García, H. S. et Beristain, C. I. 2004. Spray-drying microencapsulation and oxidative stability of conjugated linoleic acid. *Eur. Food Res. Technol.*, 219 (6), 588-592.

Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A. E., Rodríguez-Serrano, G., López-Munguía, A., Gómez-Ruiz, L. et García-Garibay, M. 2002. Enhancement of lactase activity in milk by reactive sulfhydryl groups induced by heat treatment. *J. Dairy Sci.*, 85 (10), 2497-2502.

Jiménez-Saiz, R., Belloque, J., Molina, E. et López-Fandiño, R. 2011. Human immunoglobulin E (IgE) binding to heated and glycated ovalbumin and ovomucoid before and after in vitro digestion. *J. Agric. Food Chem.*, 59 (18), 10044-10051.

Jiménez-Saiz, R., Ruiz-Henestrosa, V. M. P., López-Fandiño, R. et Molina, E. 2012. In vitro digestibility and allergenicity of emulsified hen egg. *Food Res. Int.*, 48 (2), 404-409.

Johnson, A. O., Semenya, J. G., Buchowski, M. S., Enwonwu, C. O. et Scrimshaw, N. S. 1993. Correlation of lactose maldigestion, lactose intolerance, and milk intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57 (3), 399-401.

Jones, D. M. 1988. Controlling Particle Size and Release Properties: Secondary Processing Techniques. Dans S. J. Risch et G. A. Reineccius (dir.), *Flavor Encapsulation* (vol. 370, p. 158-176), Washington, DC : American Chemical Society.

Jones, D. V., Latham, M. C., Kosikowski, F. V. et Woodward, G. 1976. Symptom response to lactose-reduced milk in lactose-intolerant adults. *Am. J. Clin. Nutr.*, 29 (6), 633-638.

Jouquand, C., Ducruet, V. et Giampaoli, P. 2004. Partition coefficients of aroma compounds in polysaccharide solutions by the phase ratio variation method. *Food Chem.*, 85 (3), 467-474.

Kanakdande, D., Bhosale, R. et Singhal, R. S. 2007. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. *Carbohydr. Polym.*, 67 (4), 536-541.

Karaca, A. C., Low, N. et Nickerson, M. 2011. Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Res. Int.*, 44 (9), 2742-2750.

Katona, J. M., Sovilj, V. J. et Petrović, L. B. 2010. Microencapsulation of oil by polymer mixture–ionic surfactant interaction induced coacervation. *Carbohydr. Polym.*, 79 (3), 563-570.

Kaur, L. et Singh, J. 2009. The role of galactomannan seed gums in diet and health - a review. *Recent Prog. Med. Plants Vol24*, 329-343.

Kaur, L., Singh, J., McCarthy, O. J. et Singh, H. 2007. Physico-chemical, rheological and structural properties of fractionated potato starches. *J. Food Eng.*, 82 (3), 383-394.

Kaur, L., Singh, J., Singh, H. et McCarthy, O. J. 2008. Starch–cassia gum interactions: A microstructure – Rheology study. *Food Chem.*, 111 (1), 1-10.

Kaushik, V. et Roos, Y. H. 2007. Limonene encapsulation in freeze-drying of gum Arabic–sucrose–gelatin systems. *LWT - Food Sci. Technol.*, 40 (8), 1381-1391.

Keusch, G. T., Troncale, F. J., Thavaramara, B., Prinyanont, P., Anderson, P. R. et Bhamarapravathi, N. 1969. Lactase deficiency in Thailand: effect of prolonged lactose feeding. *Am. J. Clin. Nutr.*, 22 (5), 638-641.

Kheadr, E. E., Vuillemard, J. C. et El-Deeb, S. A. 2003. Impact of liposome-encapsulated

enzyme cocktails on cheddar cheese ripening. *Food Res. Int.*, 36 (3), 241-252.

Kies, A. K. 2014. Authorised EU health claims related to the management of lactose intolerance: reduced lactose content, dietary lactase supplements and live yoghurt cultures. Dans M. J. Sadler (dir.), *Foods, Nutrients and Food Ingredients with Authorised Eu Health Claims* (p. 177-211), Woodhead Publishing.

Kim, J.-Y. et Huber, K. C. 2013. Heat–moisture treatment under mildly acidic conditions alters potato starch physicochemical properties and digestibility. *Carbohydr. Polym.*, 98 (2), 1245-1255.

Kim, J.-Y., Park, D.-J. et Lim, S.-T. 2008. Fragmentation of Waxy Rice Starch Granules by Enzymatic Hydrolysis. *Cereal Chem. J.*, 85 (2), 182-187.

Kim, Y. D. et Morr, C. V. 1996. Microencapsulation Properties of Gum Arabic and Several Food Proteins: Spray-Dried Orange Oil Emulsion Particles. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (5), 1314-1320.

Kim, Y. S., McCarthy, D. M., Lane, W. et Fong, W. 1973. Alterations in the levels of peptide hydrolases and other enzymes in brush-border and soluble fractions of rat small intestinal mucosa during starvation and refeeding. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.*, 321 (1), 262-273.

Kirby, C. J., Whittle, C. J., Rigby, N., Coxon, D. T. et Law, B. A. 1991. Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 26 (5), 437-449.

Kishore, D., Kundu, S. et Kayastha, A. M. 2012. Thermal, Chemical and pH Induced Denaturation of a Multimeric β-Galactosidase Reveals Multiple Unfolding Pathways. *PLoS ONE*, 7 (11), e50380.

Koh, L. W., Kasapis, S., Lim, K. M. et Foo, C. W. 2009. Structural enhancement leading to retardation of in vitro digestion of rice dough in the presence of alginate. *Food Hydrocoll.*, 23 (6), 1458-1464.

Köhler, U., Stübinger, T., List, J. et Witt, W. 2008. Investigations on non-Spherical Reference Material Using Laser Diffraction and Dynamic Image Analysis. *Part. Syst. Anal.*

Kolanowski, W., Laufenberg, G. et Kunz, B. 2004. Fish oil stabilisation by microencapsulation with modified cellulose. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 55 (4), 333-343.

Kolars, J. C., Levitt, M. D., Aouji, M. et Savaiano, D. A. 1984. Yogurt--an autodigesting source of lactose. *N. Engl. J. Med.*, 310 (1), 1-3.

Koo, S. H., Lee, K. Y. et Lee, H. G. 2010. Effect of cross-linking on the physicochemical and physiological properties of corn starch. *Food Hydrocoll.*, 24 (6–7), 619-625.

Kool, M. M., Gruppen, H., Sworn, G. et Schols, H. A. 2014. The influence of the six constituent xanthan repeating units on the order–disorder transition of xanthan. *Carbohydr. Polym.*, 104, 94-100.

Kosaraju, S. L. 2005. Colon Targeted Delivery Systems: Review of Polysaccharides for Encapsulation and Delivery. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45 (4), 251-258.

Kosaraju, S. L., Tran, C. et Lawrence, A. 2006. Liposomal Delivery Systems for Encapsulation of Ferrous Sulfate: Preparation and Characterization. *J. Liposome Res.*, 16 (4), 347-358.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. et Deeth, H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, 14 (8), 737-743.

Krause, K. P. et Müller, R. H. 2001. Production of aqueous shellac dispersions by high pressure homogenisation. *Int. J. Pharm.*, 223 (1–2), 89-92.

Krejs, G. J., Browne, R. et Raskin, P. 1980. Effect of intravenous somatostatin on jejunal absorption of glucose, amino acids, water, and electrolytes. *Gastroenterology*, 78 (1), 26-31.

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

Kudra, T. G., Raghavan, S. V., Akyel, C., Bosisio, R. et van de Voort, F. R. 1992. Electromagnetic properties of milk and its constituents at 2.45 MHz. *J. Microw. Power*, 12 (4), 199–204.

Kumar, V. et Chase, H. P. 1972. Progressive protein undernutrition and intestinal enzyme activities in monkeys. *Am. J. Clin. Nutr.*, 25 (5), 485-489.

Kwon, P. H., Rorick, M. H. et Scrimshaw, N. S. 1980. Comparative tolerance of adolescents of differing ethnic backgrounds to lactose-containing and lactose-free dairy drinks. II. Improvement of a double-blind test. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33 (1), 22-26.

Labayen, I., Forga, L., González, A., Lenoir-Wijnkoop, I., Nutr, R. et Martínez, J. A. 2001. Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 15 (4), 543-549.

Labuza, T. P., McNally, L., Gallagher, D., Hawkes, J. et Hurtado, F. 1972. Stability of intermediate moisture foods. *J. Food Sci.*, 37 (1), 154-159.

Lam, P., Gambari, R., Kok, S., Lam, K., Tang, J., Bian, Z., Lee, K. et Chui, C. 2014. Non-toxic agarose/gelatin-based microencapsulation system containing gallic acid for antifungal application. *Int. J. Mol. Med.*

Lang, G., Kagiya, Y. et Kitta, K. 2015. Multiplex comparison of the digestibility of allergenic and non-allergenic proteins in rice grains by in vitro digestion. *Food Chem.*, 168, 606-614.

Langworthy, C. F. et Deuel, J. H. 1922. Digestibility of raw rice, arrowroot, canna, cassava, taro, tree-fern and potato starches. *J. Biol. Chem.*, 52 (1), 251-261.

Lankisch, M., Layer, P., Rizza, R. A. et DiMagno, E. P. 1998. Acute postprandial gastrointestinal and metabolic effects of wheat amylase inhibitor (WAI) in normal, obese, and diabetic humans. *Pancreas*, 17 (2), 176-181.

Lasic, D. 1998. Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.*, 16 (7), 307-321.

Layer, P., Holst, J. J., Grandt, D. et Goebell, H. 1995. Ileal release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Association with inhibition of gastric acid secretion in humans. *Dig. Dis. Sci.*, 40 (5), 1074-1082.

Layman, D. K. et Rodriguez, N. R. 2009. Egg Protein as a Source of Power, Strength, and Energy. *Nutr. Today*, 44 (1), 43-48.

Lerebours, E., N'Djitoyap Ndam, C., Lavoine, A., Hellot, M. F., Antoine, J. M. et Colin, R. 1989. Yogurt and fermented-then-pasteurized milk: effects of short-term and long-term ingestion on lactose absorption and mucosal lactase activity in lactase-deficient subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 49 (5), 823-827.

Levitt, M., Wilt, T. et Shaukat, A. 2013. Clinical implications of lactose malabsorption versus lactose intolerance. *J. Clin. Gastroenterol.*, 47 (6), 471-480.

Li, J. H., Vasanthan, T., Rossnagel, B. et Hoover, R. 2001. Starch from hull-less barley: II. Thermal, rheological and acid hydrolysis characteristics. *Food Chem.*, 74 (4), 407-415.

Li, X. E., Lopetcharat, K., Qiu, Y. et Drake, M. A. 2015. Sugar reduction of skim chocolate milk and viability of alternative sweetening through lactose hydrolysis. *J. Dairy Sci.*, 98 (3), 1455-1466.

Lian, W.-C., Hsiao, H.-C. et Chou, C.-C. 2002. Survival of bifidobacteria after spray-drying. *Int. J. Food Microbiol.*, 74 (1–2), 79‑86.

Liang, H.-F., Hong, M.-H., Ho, R.-M., Chung, C.-K., Lin, Y.-H., Chen, C.-H. et Sung, H.-W. 2004. Novel Method Using a Temperature-Sensitive Polymer (Methylcellulose) to Thermally Gel Aqueous Alginate as a pH-Sensitive Hydrogel. *Biomacromolecules*, 5 (5), 1917‑1925.

Liao, Y.-H., Brown, M. B., Nazir, T., Quader, A. et Martin, G. P. 2002. Effects of Sucrose and Trehalose on the Preservation of the Native Structure of Spray-Dried Lysozyme. *Pharm. Res.*, 19 (12), 1847‑1853.

Li-Chan, E. C. Y. 2004. Properties of proteins in food systems: an introduction. Dans *Proteins in Food Processing* (p. 2‑26), Woodhead Publishing.

Liddle, R. A., Goldfine, I. D., Rosen, M. S., Taplitz, R. A. et Williams, J. A. 1985. Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J. Clin. Invest.*, 75 (4), 1144‑1152.

Liener, I. E. 1980. Miscellaneous Toxic Factors. Dans *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs* (p. 429‑467), New York : Academic Press.

Liener, I. E. 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 34 (1), 31‑67.

Lii, C., Lai, V. M.-F. et Shen, M.-C. 2004. Changes in Retrogradation Properties of Rice Starches with Amylose Content and Molecular Properties. *Cereal Chem.*, 81 (3), 392‑398.

Limmatvapirat, S., Limmatvapirat, C., Luangtana-anan, M., Nunthanid, J., Oguchi, T., Tozuka, Y., Yamamoto, K. et Puttipipatkhachorn, S. 2004. Modification of physicochemical and mechanical properties of shellac by partial hydrolysis. *Int. J. Pharm.*, 278 (1), 41‑49.

Limmatvapirat, S., Panchapornpon, D., Limmatvapirat, C., Nunthanid, J., Luangtana-Anan, M. et Puttipipatkhachorn, S. 2008. Formation of shellac succinate having improved enteric film properties through dry media reaction. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 70 (1), 335‑344.

Lin, H. C., Doty, J. E., Reedy, T. J. et Meyer, J. H. 1989. Inhibition of gastric emptying by glucose depends on length of intestine exposed to nutrient. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, 256 (2), G404‑G411.

Lin, M. Y., Dipalma, J. A., Martini, M. C., Gross, C. J., Harlander, S. K. et Savaiano, D. A. 1993. Comparative effects of exogenous lactase (beta-galactosidase) preparations on in vivo lactose digestion. *Dig. Dis. Sci.*, 38 (11), 2022‑2027.

Lindeboom, N., Chang, P. R. et Tyler, R. T. 2004. Analytical, Biochemical and Physicochemical Aspects of Starch Granule Size, with Emphasis on Small Granule Starches: A Review. *Starch - Stärke*, 56 (3‑4), 89‑99.

Lisker, R. et Aguilar, L. 1978. Double blind study of milk lactose intolerance. *Gastroenterology*, 74 (6), 1283‑1285.

Liu, M., Tirino, P., Radivojevic, M., Phillips, D. J., Gibson, M. I., Leroux, J.-C. et Gauthier, M. A. 2013. Molecular Sieving on the Surface of a Protein Provides Protection Without Loss of Activity. *Adv. Funct. Mater.*, 23 (16), 2007‑2015.

Liu, Q. 2005. Understanding starches and their role in foods. Dans *Food carbohydrates: Chemistry, physical properties, and applications*, Taylor & Francis.

Lomer, M. C. E. 2015. Review article: the aetiology, diagnosis, mechanisms and clinical evidence for food intolerance. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 41 (3), 262‑275.

Lomer, M. C. E., Parkes, G. C. et Sanderson, J. D. 2008. Review article: lactose intolerance in

clinical practice--myths and realities. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 27 (2), 93-103.

López Leiva, M. H. et Guzman, M. 1995. Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. *Process Biochem.*, 30 (8), 757-762.

López-Nicolás, J. M. et García-Carmona, F. 2007. Use of Cyclodextrins as Secondary Antioxidants to Improve the Color of Fresh Pear Juice. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (15), 6330-6338.

López-Nicolás, J. M., Núñez-Delicado, E., Sánchez-Ferrer, Á. et García-Carmona, F. 2007. Kinetic model of apple juice enzymatic browning in the presence of cyclodextrins: The use of maltosyl-β-cyclodextrin as secondary antioxidant. *Food Chem.*, 101 (3), 1164-1171.

López-Nicolás, J. M., Pérez-López, A. J., Carbonell-Barrachina, Á. et García-Carmona, F. 2007a. Kinetic Study of the Activation of Banana Juice Enzymatic Browning by the Addition of Maltosyl-β-cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (23), 9655-9662.

López-Nicolás, J. M., Pérez-López, A. J., Carbonell-Barrachina, Á. et García-Carmona, F. 2007b. Use of Natural and Modified Cyclodextrins as Inhibiting Agents of Peach Juice Enzymatic Browning. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (13), 5312-5319.

López-Rubio, A. et Lagaron, J. M. 2012. Whey protein capsules obtained through electrospraying for the encapsulation of bioactives. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 13, 200-206.

Lott, J. N. A., Ockenden, I., Raboy, V. et Batten, G. D. 2000. Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: a global estimate. *Seed Sci. Res.*, 10 (1), 11–33.

Lybeck Sørensen, K., Vergara Meersohn, M., Sonne, J., Larsen, L., Edelsten, D. et Gudmand-Høyer, E. 1983. A new type of low-lactose milk. Tolerance by lactose malabsorbers and evaluation of protein nutritional value. *Scand. J. Gastroenterol.*, 18 (8), 1063-1068.

Lynch, J. M., Barbano, D. M., Schweisthal, M. et Fleming, J. R. 2006. Precalibration Evaluation Procedures for Mid-Infrared Milk Analyzers1. *J. Dairy Sci.*, 89 (7), 2761-2774.

Maciel, G. M., Chaves, K. S., Grosso, C. R. F. et Gigante, M. L. 2014. Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. *J. Dairy Sci.*, 97 (4), 1991-1998.

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J. et Desobry, S. 2006. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 41 (1), 1-21.

Mahoney, R. 2002. β-Galactosidase. Dans J. Whitaker, A. Voragen et D. Wong (dir.), *Handbook of Food Enzymology*, CRC Press.

Mahoney, R. . 1997. Lactose: enzymatic modification. Dans P. F. Fox (dir.), *Advanced dairy chemistry (2 nd ed.). Lactose, water, salts and vitamins, Vol. 3* (Chapman & Hall, p. 77-125).

Mahoney, R. R. 1998. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. *Food Chem.*, 63 (2), 147-154.

Mahoney, R. R. 2002. Enzymes exogenous to milk in dairy technology | Beta-D-Galactosidase. Dans H. Roginski (dir.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (p. 907-914), Oxford : Elsevier.

Mahoney, R. R. et Wilder, T. 1988. Thermostability of yeast lactase (Kluyveromyces marxianus) in milk. *J. Dairy Res.*, 55 (3), 423–433.

Mainoya, J. R. 1975. Effect of prolactin on sugar and amino acid transport by the rat jejunum. *J. Exp. Zool.*, 192 (2), 149-154.

Maksimainen, M. M., Lampio, A., Mertanen, M., Turunen, O. et Rouvinen, J. 2013. The crystal structure of acidic β-galactosidase from Aspergillus oryzae. *Int. J. Biol. Macromol.*, 60, 109-115.

Malagelada, J. R. 1977. Quantificantion of gastric solid-liquid discrimination during digestion of ordinary meals. *Gastroenterology*, 72 (6), 1264-1267.

Malagelada, J.-R. et Azpiroz, F. 2011. Determinants of gastric emptying and transit in the small intestine. Dans R. Terjung (dir.), *Comprehensive Physiology*, Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc.

Malamud, A. et Wilson, K. T. 2000. Treatment of gastrointestinal infections. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 16 (1), 51-55.

Mañas, M., Martínez de Victoria, E., Gil, A., Yago, M. D. et Mathers, J. C. 2010. The Gastrointestinal Tract. Dans *Nutrition and metabolism*, Wiley-Blackwell.

Mandal, S., Puniya, A. K. et Singh, K. 2006. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated Lactobacillus casei NCDC-298. *Int. Dairy J.*, 16 (10), 1190-1195.

Marconi, E., Ruggeri, S., Cappelloni, M., Leonardi, D. et Carnovale, E. 2000. Physicochemical, Nutritional, and Microstructural Characteristics of Chickpeas (Cicer arietinum L.) and Common Beans (Phaseolus vulgaris L.) Following Microwave Cooking. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (12), 5986-5994.

Marteau, A. et Marteau, P. 2005. Entre intolérance au lactose et maldigestion. *Lait Santé*, 40, Supplement 1 (0), 20-23.

Marteau, P., Flourie, B., Pochart, P., Chastang, C., Desjeux, J. F. et Rambaud, J. C. 1990. Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *Br. J. Nutr.*, 64 (1), 71-79.

Martini, M. C., Lerebours, E. C., Lin, W. J., Harlander, S. K., Berrada, N. M., Antoine, J. M. et Savaiano, D. A. 1991. Strains and species of lactic acid bacteria in fermented milks (yogurts): effect on in vivo lactose digestion. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54 (6), 1041-1046.

Masters, P. M. et Friedman, M. 1980. Amino Acid Racemization in Alkali-Treated Food Proteins - Chemistry, Toxicology, and Nutritional Consequences. Dans *Chemical Deterioration of Proteins* (p. 165-194), Washington, DC : American Chemical Society.

Matsumura, K., Miki, T., Jhomori, T., Gonoi, T. et Seino, S. 2005. Possible role of PEPT1 in gastrointestinal hormone secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 336 (4), 1028-1032.

Matthews, S. B., Waud, J. P., Roberts, A. G. et Campbell, A. K. 2005. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad. Med. J.*, 81 (953), 167-173.

McCleary, B. V. et Monaghan, D. A. 2002. Measurement of resistant starch. *J. AOAC Int.*, 85 (3), 665-675.

McClements, D. J. 2012. Requirements for food ingredient and nutraceutical delivery systems. Dans *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals* (Elsevier).

McDougall, G. J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A. et Stewart, D. 2005. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit alpha-amylase and alpha-glucosidase. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (7), 2760-2766.

McGregor, R. A. et Poppitt, S. D. 2013. Milk protein for improved metabolic health: a review of the evidence. *Nutr. Metab.*, 10, 46.

McMaster, L. D. et Kokott, S. A. 2005. Micro-encapsulation of Bifidobacterium lactis for incorporation into soft foods. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21 (5), 723-728.

Mei, J.-Q., Zhou, D.-N., Jin, Z.-Y., Xu, X.-M. et Chen, H.-Q. 2015. Effects of citric acid esterification on digestibility, structural and physicochemical properties of cassava starch. *Food Chem.*, 187, 378‑384.

Mellentin, J. 2012. *Lactose-free dairy: Opportunities, strategies and key case studies*.

Meng, Y. et Cloutier, S. 2014. Gelatin and Other Proteins for Microencapsulation. Dans *Microencapsulation in the Food Industry* (p. 227‑239), Elsevier.

Meyer, J. H., Dressman, J., Fink, A. et Amidon, G. 1985. Effect of size and density on canine gastric emptying of nondigestible solids. *Gastroenterology*, 89 (4), 805‑813.

Miao, M., Jiang, B., Zhang, T., Jin, Z. et Mu, W. 2011. Impact of mild acid hydrolysis on structure and digestion properties of waxy maize starch. *Food Chem.*, 126 (2), 506‑513.

Miller, J. B., Pang, E. et Broomhead, L. 1995. The glycaemic index of foods containing sugars: comparison of foods with naturally-occurring v. added sugars. *Br. J. Nutr.*, 73 (4), 613‑623.

Millqvist-Fureby, A., Malmsten, M. et Bergenståhl, B. 1999. Spray-drying of trypsin — surface characterisation and activity preservation. *Int. J. Pharm.*, 188 (2), 243‑253.

Mills, J. N. et Tang, J. 1967. Molecular weight and amino acid composition of human gastricsin and pepsin. *J. Biol. Chem.*, 242 (13), 3093‑3097.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W. et Brodkorb, A. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct.*, 5 (6), 1113‑1124.

Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R. et others. 1995. Multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *Altern. Lab. Anim. ATLA*.

Mishra, M. K. 2015. Materials of Natural Origin for Encapsulation. Dans *Handbook of Encapsulation and Controlled Release* (p. 493‑515), CRC Press.

Mishra, S., Monro, J. et Hedderley, D. 2008. Effect of Processing on Slowly Digestible Starch and Resistant Starch in Potato. *Starch - Stärke*, 60 (9), 500‑507.

Montalto, M., Nucera, G., Santoro, L., Curigliano, V., Vastola, M., Covino, M., Cuoco, L., Manna, R., Gasbarrini, A. et Gasbarrini, G. 2005. Effect of exogenous beta-galactosidase in patients with lactose malabsorption and intolerance: a crossover double-blind placebo-controlled study. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 59 (4), 489‑493.

Moracci, M., La Volpe, A., Pulitzer, J. F., Rossi, M. et Ciaramella, M. 1992. Expression of the thermostable beta-galactosidase gene from the archaebacterium Sulfolobus solfataricus in Saccharomyces cerevisiae and characterization of a new inducible promoter for heterologous expression. *J. Bacteriol.*, 174 (3), 873‑882.

Moracci, M., Nucci, R., Febbraio, F., Vaccaro, C., Vespa, N., La Cara, F. et Rossi, M. 1995. Expression and extensive characterization of a beta-glycosidase from the extreme thermoacidophilic archaeon Sulfolobus solfataricus in Escherichia coli: authenticity of the recombinant enzyme. *Enzyme Microb. Technol.*, 17 (11), 992‑997.

Moreau, D. l. et Rosenberg, M. 1996. Oxidative Stability of Anhydrous Milkfat Microencapsulated in Whey Proteins. *J. Food Sci.*, 61 (1), 39‑43.

Morris, C. G. et Press, A. 1992. *Academic Press Dictionary of Science and Technology*, Gulf Professional Publishing.

Morselli, P. L. et Garattini, S. 1970. Monosodium Glutamate and the Chinese Restaurant Syndrome. *Nature*, 227 (5258), 611-612.

Moughan, P. J. 2009. Digestion and absorption of proteins and peptides. Dans E. A. Decker (dir.), *Designing Functional Foods* (p. 148-170), Woodhead Publishing.

Murray, J. C. F. 2009. Cellulosics. Dans *Handbook of Hydrocolloids* (p. 710-723), Elsevier.

Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C. I. et Martínez-Bustos, F. 2009. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *J. Food Eng.*, 91 (3), 380-386.

Mustapha, A., Jiang, T. et Savaiano, D. A. 1997. Improvement of lactose digestion by humans following ingestion of unfermented acidophilus milk: influence of bile sensitivity, lactose transport, and acid tolerance of Lactobacillus acidophilus. *J. Dairy Sci.*, 80 (8), 1537-1545.

Naranjo, G. B., Pereyra Gonzales, A. S., Leiva, G. E. et Malec, L. S. 2013. The kinetics of Maillard reaction in lactose-hydrolysed milk powder and related systems containing carbohydrate mixtures. *Food Chem.*, 141 (4), 3790-3795.

Näslund, E., Bogefors, J., Grybäck, P., Bjellerup, P., Jacobsson, H., Holst, J. J. et Hellström, P. M. 2001. GLP-1 inhibits gastric emptying of water but does not influence plasma. *Scand. J. Gastroenterol.*, 36 (2), 156-162.

Näslund, E., Bogefors, J., Skogar, S., Grybäck, P., Jacobsson, H., Holst, J. J. et Hellström, P. M. 1999. GLP-1 slows solid gastric emptying and inhibits insulin, glucagon, and PYY release in humans. *Am. J. Physiol.*, 277 (3 Pt 2), R910-916.

Nauck, M. A., Niedereichholz, U., Ettler, R., Holst, J. J., Orskov, C., Ritzel, R. et Schmiegel, W. H. 1997. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am. J. Physiol.*, 273 (5 Pt 1), E981-988.

Navab, F. et Winter, C. G. 1988. Effect of aging on intestinal absorption of aromatic amino acids in vitro in the rat. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, 254 (4), G630-G636.

Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., Sada, A. et Orlando, P. 2009. Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated Lactobacillus acidophilus and survival under simulated gastrointestinal conditions. *J. Funct. Foods*, 1 (3), 319-323.

Newcomer, A. D., McGill, D. B., Thomas, P. J. et Hofmann, A. F. 1978. Tolerance to lactose among lactase-deficient American Indians. *Gastroenterology*, 74 (1), 44-46.

Nguyen, S., Alund, S. J., Hiorth, M., Kjøniksen, A.-L. et Smistad, G. 2011. Studies on pectin coating of liposomes for drug delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 88 (2), 664-673.

Nguyen, T. T. P., Bhandari, B., Cichero, J. et Prakash, S. 2015. Gastrointestinal digestion of dairy and soy proteins in infant formulas: An in vitro study. *Food Res. Int.*, 76, Part 3, 348-358.

Nielsen, C. U., Amstrup, J., Nielsen, R., Steffansen, B., Frokjaer, S. et Brodin, B. 2003. Epidermal growth factor and insulin short-term increase hPepT1-mediated glycylsarcosine uptake in Caco-2 cells. *Acta Physiol. Scand.*, 178 (2), 139-148.

Nishi, T., Hara, H. et Kasai, T. 1998. Guanidinated casein hydrolysate stimulates pancreatic secretagogue release by direct action to the intestine in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N*, 218 (4), 357-364.

Noh, D. O. et Gilliland, S. E. 1994. Influence of Bile on β-Galactosidase Activity of Component

Species of Yogurt Starter Cultures. *J. Dairy Sci.*, 77 (12), 3532-3537.

Nugent, A. P. 2005. Health properties of resistant starch. *Nutr. Bull.*, 30 (1), 27-54.

Oates, C. G. 1997. Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends Food Sci. Technol.*, 8 (11), 375-382.

O'Connell, S. et Walsh, G. 2006. Physicochemical characteristics of commercial lactases relevant to their application in the alleviation of lactose intolerance. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 134 (2), 179-191.

Ojetti, V., Gigante, G., Gabrielli, M., Ainora, M. E., Mannocci, A., Lauritano, E. C., Gasbarrini, G. et Gasbarrini, A. 2010. The effect of oral supplementation with Lactobacillus reuteri or tilactase in lactose intolerant patients: randomized trial. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 14 (3), 163-170.

Okubo, K., Iijima, M., Kobayashi, Y., Yoshikoshi, M., Uchida, T. et Kudou, S. 1992. Components Responsible for the Undesirable Taste of Soybean Seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56 (1), 99-103.

Onwulata, C. I., Rao, D. R. et Vankineni, P. 1989. Relative efficiency of yogurt, sweet acidophilus milk, hydrolyzed-lactose milk, and a commercial lactase tablet in alleviating lactose maldigestion. *Am. J. Clin. Nutr.*, 49 (6), 1233-1237.

Oostergetel, G. T. et van Bruggen, E. F. J. 1989. On the Origin of a Low Angle Spacing in Starch. *Starch - Stärke*, 41 (9), 331-335.

O'Regan, J., Ennis, M. P. et Mulvihill, D. M. 2009. Milk proteins. Dans *Handbook of Hydrocolloids* (p. 298-358), Elsevier.

Oria, M. P., Hamaker, B. R. et Schull, J. M. 1995. In vitro protein digestibility of developing and mature sorghum grain in relation to α-, β-, and γ-kafirin disulfide crosslinking. *J. Cereal Sci.*, 22 (1), 85-93.

Orskov, C., Wettergren, A. et Holst, J. J. 1996. Secretion of the incretin hormones glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide correlates with insulin secretion in normal man throughout the day. *Scand. J. Gastroenterol.*, 31 (7), 665-670.

Ortakci, F., Broadbent, J. R., McManus, W. R. et McMahon, D. J. 2012. Survival of microencapsulated probiotic Lactobacillus paracasei LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. *J. Dairy Sci.*, 95 (11), 6274-6281.

Ortiz, S. E. M., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. A., Santana, A. S. et Favaro-Trindade, C. S. 2009. Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. *LWT - Food Sci. Technol.*, 42 (5), 919-923.

Ouwendijk, J. 1998. Routing and Processing of Lactase-Phlorizin Hydrolase in Transfected Caco-2 Cells. *J. Biol. Chem.*, 273 (12), 6650-6655.

Owusu, R. K. et Cowan, D. A. 1989. Correlation between microbial protein thermostability and resistance to denaturation in aqueous: organic solvent two-phase systems. *Enzyme Microb. Technol.*, 11 (9), 568-574.

Pagington, J. S. 1986. Beta-cyclodextrin and its uses in the flavour industry. *Dev. Food Flavours Ed. GG Birch MG Lindley*.

Paige, D. M. 2005. Lactose intolerance. Dans B. Caballero (dir.), *Encyclopedia of Human Nutrition (Second Edition)* (p. 113-120), Oxford : Elsevier.

Paige, D. M., Bayless, T. M., Huang, S. S. et Wexler, R. 1975. Lactose hydrolyzed milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 28 (8), 818-822.

Panesar, P. S., Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J. F. et Kumar, H. 2006. Microbial production, immobilization and applications of β-D-galactosidase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 81 (4), 530-543.

Papagianni, M. et Anastasiadou, S. 2009. Encapsulation of Pediococcus acidilactici cells in corn and olive oil microcapsules emulsified by peptides and stabilized with xanthan in oil-in-water emulsions: Studies on cell viability under gastro-intestinal simulating conditions. *Enzyme Microb. Technol.*, 45 (6–7), 514‑522.

Pappenheimer, J. R., Karnovsky, M. L. et Maggio, J. E. 1997. Absorption and excretion of undegradable peptides: role of lipid solubility and net charge. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 280 (1), 292‑300.

Paramita, V., Furuta, T. et Yoshii, H. 2012. High-Oil-Load Encapsulation of Medium-Chain Triglycerides and d-Limonene Mixture in Modified Starch by Spray Drying. *J. Food Sci.*, 77 (2), E38‑E44.

Park, Y. K., De SANTI, M. s. s. et Pastore, G. M. 1979. Production and characterization of β-galactosidase from Aspergillus Oryzae. *J. Food Sci.*, 44 (1), 100‑103.

Parris, N., Cooke, P. H. et Hicks, K. B. 2005. Encapsulation of Essential Oils in Zein Nanospherical Particles. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (12), 4788‑4792.

Partanen, R., Hakala, P., Sjövall, O., Kallio, H. et Forssell, P. 2005. Effect of Relative Humidity on the Oxidative Stability of Microencapsulated Sea Buckthorn Seed Oil. *J. Food Sci.*, 70 (1), E37‑E43.

Partanen, R., Raula, J., Seppänen, R., Buchert, J., Kauppinen, E. et Forssell, P. 2008. Effect of Relative Humidity on Oxidation of Flaxseed Oil in Spray Dried Whey Protein Emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (14), 5717‑5722.

Partanen, R., Yoshii, H., Kallio, H., Yang, B. et Forssell, P. 2002. Encapsulation of sea buckthorn kernel oil in modified starches. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79 (3), 219‑223.

Payan, I. L., Cadilla-Perezrios, R., Fisher, G. H. et Man, E. H. 1985. Analysis of problems encountered in the determination of amino acid enantiomeric ratios by gas chromatography. *Anal. Biochem.*, 149 (2), 484‑491.

Payne, D. L., Welsh, J. D., Manion, C. V., Tsegaye, A. et Herd, L. D. 1981. Effectiveness of milk products in dietary management of lactose malabsorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34 (12), 2711–2715.

Peace, R. W., Sarwar, G. et Touchburn, S. P. 1992. Trypsin inhibitor levels in soy-based infant formulas and commercial soy protein isolates and concentrates. *Food Res. Int.*, 25 (2), 137‑141.

Pedersen, B. et Eggum, B. O. 1983. Prediction of protein digestibility by an in vitro enzymatic pH-stat procedure. *Z. Für Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelkunde*, 49 (4‑5), 265‑277.

Pelletier, X., Laure-Boussuge, S. et Donazzolo, Y. 2001. Hydrogen excretion upon ingestion of dairy products in lactose-intolerant male subjects: importance of the live flora. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 55 (6), 509‑512.

Pereira-Rodríguez, Á., Fernández-Leiro, R., González-Siso, M. I., Cerdán, M. E., Becerra, M. et Sanz-Aparicio, J. 2012. Structural basis of specificity in tetrameric Kluyveromyces lactis β-galactosidase. *J. Struct. Biol.*, 177 (2), 392‑401.

Perino, S. et Chemat, F. 2015. Chauffage micro-ondes comme éco-procédé en industrie agroalimentaire. *Tech. Ing.*, F3070.

Perlman, R. 2013. *Evolution and Medicine*, OUP Oxford.

Perman, J. A., Modler, S. et Olson, A. C. 1981. Role of pH in production of hydrogen from carbohydrates by colonic bacterial flora. Studies in vivo and in vitro. *J. Clin. Invest.*, 67 (3), 643‑650.

Pessela, B. C. C., Vian, A., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., García, J. L., Guisán, J. M. et Carrascosa, A. V. 2003. Overproduction of Thermus sp. Strain T2 β-Galactosidase in

Escherichia coli and Preparation by Using Tailor-Made Metal Chelate Supports. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (4), 1967-1972.

Phillips, G. O. 1998. Acacia gum (Gum Arabic): a nutritional fibre; metabolism and calorific value. *Food Addit. Contam.*, 15 (3), 251-264.

Picon, A., Gaya, P., Medina, M. et Nuñez, M. 1994. The Effect of Liposome Encapsulation of Chymosin Derived by Fermentation on Manchego Cheese Ripening. *J. Dairy Sci.*, 77 (1), 16-23.

Pierucci, A. P. T. R., Andrade, L. R., Baptista, E. B., Volpato, N. M. et Rocha-Leão, M. H. M. 2006. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. *J. Microencapsul.*, 23 (6), 654-662.

Pierucci, A. P. T. R., Andrade, L. R., Farina, M., Pedrosa, C. et Rocha-Leão, M. H. M. 2007. Comparison of alpha-tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. *J. Microencapsul.*, 24 (3), 201-213.

Pinto, S. S., Verruck, S., Vieira, C. R. W., Prudêncio, E. S., Amante, E. R. et Amboni, R. D. M. C. 2015. Influence of microencapsulation with sweet whey and prebiotics on the survival of Bifidobacterium-BB-12 under simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT - Food Sci. Technol.*, 64 (2), 1004-1009.

Plimmer, R. H. A. 1906. On the presence of lactase in the intestines of animals and on the adaptation of the intestine to lactose. *J. Physiol.*, 35 (1-2), 20-31.

Pochart, P., Bisetti, N., Bourlioux, P. et Desjeux, J. F. 1989. Effect of daily consumption of fresh or pasteurized yogurt on intestinal lactose utilisation in lactose malabsorbers. *Microecol. Ther.*, 18, 105-110.

Poncelet, D., Dreffier, C., Subra-Paternault, P. et Vandamme, T. F. 2007. Introduction aux techniques de microencapsulation. Dans *Microencapsulation: des sciences aux technologies* (Editions Tec & Doc).

Porcelli, M., Cacciapuoti, G., Fusco, S., Massa, R., d'Ambrosio, G., Bertoldo, C., De Rosa, M. et Zappia, V. 1997. Non-thermal effects of microwaves on proteins: thermophilic enzymes as model system. *FEBS Lett.*, 402 (2–3), 102-106.

Portincasa, P., Di Ciaula, A., Vacca, M., Montelli, R., Wang, D. Q.-H. et Palasciano, G. 2008. Beneficial effects of oral tilactase on patients with hypolactasia. *Eur. J. Clin. Invest.*, 38 (11), 835-844.

Prasad, K. et Kadokawa, J. 2009. Alginate-Based Blends and Nano/Microbeads. Dans B. H. A. Rehm (dir.), *Alginates: Biology and Applications* (p. 175-210), Springer Berlin Heidelberg.

Prasertmanakit, S., Praphairaksit, N., Chiangthong, W. et Muangsin, N. 2009. Ethyl Cellulose Microcapsules for Protecting and Controlled Release of Folic Acid. *AAPS PharmSciTech*, 10 (4), 1104-1112.

Purr, A. 1933. The influence of vitamin C on intracellular enzyme action. *Biochem. J.*, 27 (5), 1703-1705.

Qi, Z. H. et Hedges, A. R. 1995. Use of cyclodextrins for flavors.

Quispe-Condori, S., Saldaña, M. D. A. et Temelli, F. 2011. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. *LWT - Food Sci. Technol.*, 44 (9), 1880-1887.

Raben, A., Andersen, K., Karberg, M. A., Holst, J. J. et Astrup, A. 1997. Acetylation of or beta-cyclodextrin addition to potato beneficial effect on glucose metabolism and appetite sensations. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66 (2), 304-314.

Rackis, J. J. 1974. Biological and physiological factors in soybeans. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 51 (1), 161A-174A.

Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G. S. et Anandharamakrishnan, C. 2012. Effect of whey protein – alginate wall systems on survival of microencapsulated Lactobacillus plantarum in simulated gastrointestinal conditions. *J. Funct. Foods*, 4 (4), 891-898.

Ramakrishnan, A., Pandit, N., Badgujar, M., Bhaskar, C. et Rao, M. 2007. Encapsulation of endoglucanase using a biopolymer Gum Arabic for its controlled release. *Bioresour. Technol.*, 98 (2), 368-372.

Ramirez, F. C., Lee, K. et Graham, D. Y. 1994. All lactase preparations are not the same: results of a prospective, randomized, placebo-controlled trial. *Am. J. Gastroenterol.*, 89 (4), 566-570.

Rask Pedersen, E., Jensen, B. H., Jensen, H. J., Keldsbo, I. L., Hylander Møller, E. et Nørby Rasmussen, S. 1982. Lactose malabsorption and tolerance of lactose-hydrolyzed milk. A double-blind controlled crossover study. *Scand. J. Gastroenterol.*, 17 (7), 861-864.

Ravindran, V., Cabahug, S., Ravindran, G. et Bryden, W. L. 1999. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. *Poult. Sci.*, 78 (5), 699-706.

Read, N. W., Welch, I. M., Austen, C. J., Barnish, C., Bartlett, C. E., Baxter, A. J., Brown, G., Compton, M. E., Hume, K. E. et Storie, I. 1986. Swallowing food without chewing; a simple way to reduce postprandial glycaemia. *Br. J. Nutr.*, 55 (1), 43-47.

Reddy, N. R. 2001. Occurrence, Distribution, Content, and Dietary Intake of Phytate. Dans *Food Phytates* (vol. 1-0), CRC Press.

Reddy, V. et Pershad, J. 1972. Lactase deficiency in Indians. *Am. J. Clin. Nutr.*, 25 (1), 114-119.

Regier, M. et Schubert, H. 2005. Introducing microwave processing of food: principles and technologies. Dans *The Microwave Processing of Foods* (p. 3-21), Woodhead Publishing.

Rehman, Z. et Shah, W. H. 2005. Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chem.*, 91 (2), 327-331.

Reimann, F., Williams, L., da Silva Xavier, G., Rutter, G. A. et Gribble, F. M. 2004. Glutamine potently stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *Diabetologia*, 47 (9), 1592-1601.

Reineccius, G. A. 1995. Liposomes for controlled release in the food industry.

Relkin, P. 2006. Microcalorimétrie à balayage DSC. *Tech. Ing.*, P1270.

Rémésy, C. 2008. Les bases d'une nutrition présentive. Dans *Aliments fonctionnels* (Tec & Doc).

Remya, R. et Jyothi, A. N. 2015. A Comparative Study on the Resistant Starch Content in Starches from Different Botanical Sources in Relation to their Physicochemical Properties. *J. ROOT CROPS*, 41 (1), 37-47.

Rérat, A., Calmes, R., Vaissade, P. et Finot, P.-A. 2002. Nutritional and metabolic consequences of the early Maillard reaction of heat treated milk in the pig. Significance for man. *Eur. J. Nutr.*, 41 (1), 1-11.

Richmond, M. L., Gray, J. I. et Stine, C. M. 1981. Beta-Galactosidase: Review of Recent Research Related to Technological Application, Nutritional Concerns, and Immobilization. *J. Dairy Sci.*, 64 (9), 1759-1771.

Rizkalla, S. W., Luo, J., Kabir, M., Chevalier, A., Pacher, N. et Slama, G. 2000. Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breath-hydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. *Am. J. Clin. Nutr.*, 72 (6), 1474-1479.

Robert, P., García, P., Reyes, N., Chávez, J. et Santos, J. 2012. Acetylated starch and inulin as

encapsulating agents of gallic acid and their release behaviour in a hydrophilic system. *Food Chem.*, 134 (1), 1-8.

Robin, J. P. 1976. *Comportement du grain d'amidon à l'hydrolyse acide ménagée. Etude physico-chimique et enzymatique de la fraction insoluble : Contribution à la connaissance de la structure de l'amylopectine* (Thèse), Université Paris VI.

Robin, J. P., Mercier, C., Charbonniere, R. et Guilbot, A. 1974. Lintnerized Starches. Gel Filtration and Enzymatic Studies of Insoluble Residues from Prolonged Acid Treatment of Potato Starch. *Cereal Chem*, p. 389-406.

Rojas-Escudero, E., Alarcón-Jiménez, A. L., Elizalde-Galván, P. et Rojo-Callejas, F. 2004. Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1027 (1-2), 117-120.

Rolin, C. 1993. Pectin. Dans *Industrial Gums: Polysaccharides and their Derivative* (p. 257-293), Academic Press.

Rooney, L. W. et Pflugfelder, R. L. 1986. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. *J. Anim. Sci.*, 63 (5), 1607-1623.

Rorick, M. H. et Scrimshaw, N. S. 1979. Comparative tolerance of elderly from differing ethnic backgrounds to lactose-containing and lactose-free dairy drinks: a double-blind study. *J. Gerontol.*, 34 (2), 191-196.

Rosado, J. L., Deodhar, A. D., Bourges, H. et Solomons, N. W. 1986. The effect of the digestion products of lactose (glucose and galactose) on its intraintestinal, in vivo hydrolysis by exogenous microbial beta-D-galactosidase. *J. Am. Coll. Nutr.*, 5 (3), 281-290.

Rosado, J. L., Solomons, N. W. et Allen, L. H. 1992. Lactose digestion from unmodified, low-fat and lactose-hydrolyzed yogurt in adult lactose-maldigesters. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 46 (1), 61-67.

Rosado, J. L., Solomons, N. W., Lisker, R. et Bourges, H. 1984. Enzyme replacement therapy for primary adult lactase deficiency. Effective reduction of lactose malabsorption and milk intolerance by direct addition of beta-galactosidase to milk at mealtime. *Gastroenterology*, 87 (5), 1072-1082.

Roustel, S., Chapet et Bouvier. 2000. Cuisson-extrusion des aliments. *Tech. Ing.*, F3120.

Rudloff, S. et Lönnerdal, B. 1992. Solubility and digestibility of milk proteins in infant formulas exposed to different heat treatments. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 15 (1), 25-33.

Rustom, I. Y. S., Foda, M. I. et López-Leiva, M. H. 1998. Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis — analysis of factors. *Food Chem.*, 62 (2), 141-147.

Rutherfurd, S. M., Fanning, A. C., Miller, B. J. et Moughan, P. J. 2015. Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats. *J. Nutr.*, jn.114.195438.

Ryden, P. et Selvendran, R. R. 1993. Phytic acid. Dans *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition* (p. 3582-3587), London : Academic Press.

Sahi, T. 1994. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, 202, 7-20.

Sajilata, M. g., Singhal, R. S. et Kulkarni, P. R. 2006. Resistant Starch–A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 5 (1), 1-17.

Salloum, R. M., Stevens, B. R., Schultz, G. S. et Souba, W. W. 1993. Regulation of small intestinal glutamine transport by epidermal growth factor. *Surgery*, 113 (5), 552-559.

Salunkhe, D. K., Chavan, J. K. et Kadam, S. S. 1990. Occurence, nature and composition.

Dans *Dietary Tannins: Consequences and Remedies* (p. 29-68), CRC Press.

Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Vioque, J., Bautista, J. et Millán, F. 1999. Protein isolates from chickpea (Cicer arietinum L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chem.*, 64 (2), 237-243.

Sanders, S. W., Tolman, K. G. et Reitberg, D. P. 1992. Effect of a single dose of lactase on symptoms and expired hydrogen after lactose challenge in lactose-intolerant subjects. *Clin. Pharm.*, 11 (6), 533-538.

Sankarikutty, B., Sreekumar, M. M., Narayanan, C. S. et Mathew, A. G. 1988. Studies on microencapsulation of cardamom oil by spray drying technique. *J. Food Sci. Technol.*, 25 (6).

Santé Canada. 2012. *Bromélaïne de tige*.

Sarwar, G., Peace, R. W. et Botting, H. G. 1989. Differences in protein digestibility and quality of liquid concentrate and powder forms of milk-based infant formulas fed to rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 49 (5), 806-813.

Sauer, W. C. et Ozimek, L. 1986. Digestibility of amino acids in swine: Results and their practical applications. A review. *Livest. Prod. Sci.*, 15 (4), 367-388.

Saunders, R. M., Connor, M. A., Booth, A. N., Bickoff, E. M. et Kohler, G. O. 1973. Measurement of digestibility of alfalfa protein concentrates by in vivo and in vitro methods. *J. Nutr.*, 103 (4), 530-535.

Savaiano, D. A. 2014. Lactose digestion from yogurt: mechanism and relevance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 99 (5), 1251S-1255S.

Savaiano, D. A., AbouElAnouar, A., Smith, D. E. et Levitt, M. D. 1984. Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 40 (6), 1219-1223.

Savaiano, D. A., Boushey, C. J. et McCabe, G. P. 2006. Lactose intolerance symptoms assessed by meta-analysis: a grain of truth that leads to exaggeration. *J. Nutr.*, 136 (4), 1107-1113.

Schägger, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.*, 1 (1), 16-22.

Schirra, J., Kuwert, P., Wank, U., Leicht, P., Arnold, R., Göke, B. et Katschinski, M. 1997. Differential effects of subcutaneous GLP-1 on gastric emptying, antroduodenal motility, and pancreatic function in men. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, 109 (1), 84-97.

Schuck, P. 2007. Séchage par atomisation des émulsions. Dans *Microencapsulation : des sciences aux technologies*.

Sciarretta, G., Giacobazzi, G., Verri, A., Zanirato, P., Garuti, G. et Malaguti, P. 1984. Hydrogen breath test quantification and clinical correlation of lactose malabsorption in adult irritable bowel syndrome and ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.*, 29 (12), 1098-1104.

Seiquer, I., Díaz-Alguacil, J., Delgado-Andrade, C., López-Frías, M., Muñoz Hoyos, A., Galdó, G. et Navarro, M. P. 2006. Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11-14 y. *Am. J. Clin. Nutr.*, 83 (5), 1082-1088.

Selle, P. H., Ravindran, V., Caldwell, A. et Bryden, W. L. 2000. Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. *Nutr. Res. Rev.*, 13 (2), 255-278.

Sepúlveda, F. V. et Smith, M. W. 1979. Different mechanisms for neutral amino acid uptake by new-born pig colon. *J. Physiol.*, 286, 479-490.

Serfert, Y., Drusch, S. et Schwarz, K. 2010. Sensory odour profiling and lipid oxidation status of fish oil and microencapsulated fish oil. *Food Chem.*, 123 (4), 968-975.

Shahidi, F. et Pegg, R. 2007. Encapsulation, Stabilization, and Controlled Release of Food Ingredients and Bioactives. Dans M. Shafiur

Rahman (dir.), *Handbook of Food Preservation, Second Edition* (vol. 20070849, p. 509-568), CRC Press.

Shakourzadeh. 2002. Techniques de fluidisation. *Tech. Ing.*, J3390.

Shatin, R. 1968. Evolution and lactase deficiency. *Gastroenterology*, 54 (5), 992.

Shaw, P. E., Tatum, J. H. et Wilson, C. W. 1984. Improved flavor of navel orange and grapefruit juices by removal of bitter components with .beta.-cyclodextrin polymer. *J. Agric. Food Chem.*, 32 (4), 832-836.

Sheldon, R. A. et van Pelt, S. 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.*, 42 (15), 6223-6235.

Shermak, M. A., Saavedra, J. M., Jackson, T. L., Huang, S. S., Bayless, T. M. et Perman, J. A. 1995. Effect of yogurt on symptoms and kinetics of hydrogen production in lactose-malabsorbing children. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62 (5), 1003-1006.

Sheu, D.-C., Li, S.-Y., Duan, K.-J. et Chen, C. W. 1998. Production of galactooligosaccharides by β-galactosidase immobilized on glutaraldehyde-treated chitosan beads. *Biotechnol. Tech.*, 12 (4), 273-276.

Shewry, P. R., Jenkins, J. A., Beaudoin, F. et Mills, E. N. C. 2003. The Classification, Functions and Evolutionary Relationships of Plant Proteins in Relation to Food Allergies. Dans E. N. C. Mills et P. R. Shewry (dir.), *Plant Food Allergens* (p. 24-41), Blackwell Publishing Ltd.

Shi, G., Leray, V., Scarpignato, C., Bentouimou, N., Varannes, S., Cherbut, C. et Galmiche, J. 1997. Specific adaptation of gastric emptying to diets with differing protein content in the rat: is endogenous cholecystokinin implicated? *Gut*, 41 (5), 612-618.

Shi, X.-Y. et Tan, T.-W. 2002. Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of Vitamin D2. *Biomaterials*, 23 (23), 4469-4473.

Shiga, H., Yoshii, H., Nishiyama, T., Furuta, T., Forssele, P., Poutanen, K. et Linko, P. 2001. Flavor encapsulation and release characteristics of spray-dried powder by the blended encapsulant of cyclodextrin and gum arabic. *Dry. Technol.*, 19 (7), 1385-1395.

Shiraga, T., Miyamoto, K.-I., Tanaka, H., Yamamoto, H., Taketani, Y., Morita, K., Tamai, I., Tsuji, A. et Takeda, E. 1999. Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H+/peptide transporter PepT1. *Gastroenterology*, 116 (2), 354-362.

Shukla, H. et Chaplin, M. 1993. Nocompetitive inhibition of β-galactosidase (A. oryzae) by galactose. *Enzyme Microb. Technol.*, 15 (4), 297-299.

Sievert, D. et Pomeranz, Y. 1990. Enzyme-resistant starch. II, Differential scanning calorimetry studies on heat-treated starches and enzyme-resistant starch residues. *Cereal Chem.*, 67 (3), 217-221.

Siljeström, M. et Björck, I. 1990. Digestible and undigestible carbohydrates in autoclaved legumes, potatoes corn. *Food Chem.*, 38 (2), 145-152.

Siljeström, M., Eliasson, A. C. et Björck, I. 1989. Characterization of Resistant Starch from Autoclaved Wheat Starch. *Starch - Stärke*, 41 (4), 147-151.

Silva, D. f., Favaro-Trindade, C. s., Rocha, G. a. et Thomazini, M. 2012. Microencapsulation of Lycopene by Gelatin–Pectin Complex Coacervation. *J. Food Process. Preserv.*, 36 (2), 185-190.

Simmons, B. et Agrawal, A. 2012. Flow and Dropsize Measurements in Glycerol Spray Flames. Dans *50th AIAA Aerospace Sciences Meeting including the New Horizons Forum and Aerospace Exposition*, Nashville, Tenessee : American Institute of Aeronautics and Astronautics.

Singh, J., Dartois, A. et Kaur, L. 2010. Starch digestibility in food matrix: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, 21 (4), 168-180.

Singh, J., Kaur, L. et McCarthy, O. J. 2007. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. *Food Hydrocoll.*, 21 (1), 1-22.

Singh, J., McCarthy, O. J. et Singh, H. 2006. Physico-chemical and morphological characteristics of New Zealand Taewa (Maori potato) starches. *Carbohydr. Polym.*, 64 (4), 569-581.

Singh, J., McCarthy, O. J., Singh, H. et Moughan, P. J. 2008. Low temperature post-harvest storage of New Zealand Taewa (Maori potato): Effects on starch physico-chemical and functional characteristics. *Food Chem.*, 106 (2), 583-596.

Singh, M., Sharma, R. et Banerjee, U. C. 2002. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol. Adv.*, 20 (5–6), 341-359.

Sitohy, M. Z. et Ramadan, M. F. 2001. Degradability of Different Phosphorylated Starches and Thermoplastic Films Prepared from Corn Starch Phosphomonoesters. *Starch - Stärke*, 53 (7), 317-322.

Skude, G. et Ihse, I. 1976. Salivary amylase in duodenal aspirates. *Scand. J. Gastroenterol.*, 11 (1), 17-20.

Slaughter, S. L., Ellis, P. R. et Butterworth, P. J. 2001. An investigation of the action of porcine pancreatic α-amylase on native and gelatinised starches. *Biochim. Biophys. Acta*, 1525 (1–2), 29-36.

Slaughter, S. L., Ellis, P. R., Jackson, E. C. et Butterworth, P. J. 2002. The effect of guar galactomannan and water availability during hydrothermal processing on the hydrolysis of starch catalysed by pancreatic alpha-amylase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1571 (1), 55-63.

Sloth, B. et Astrup, A. 2006. Low glycemic index diets and body weight. *Int. J. Obes.*, 30 (S3), S47-S51.

Soda, M. E., Pannell, L. et Olson, N. 1989. Microencapsulated enzyme systems for the acceleration of cheese ripening. *J. Microencapsul.*, 6 (3), 319-326.

Solomon, N. A. 2013, 7 mars. Lactase Formulations. Brevet US20130058913 A1.

Solomons, N. W., Guerrero, A. M. et Torun, B. 1985. Dietary manipulation of postprandial colonic lactose fermentation: II. Addition of exogenous, microbial beta-galactosidases at mealtime. *Am. J. Clin. Nutr.*, 41 (2), 209-221.

Somoza, V. 2005. Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: an update. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49 (7), 663-672.

Song, M., Li, N., Sun, S., Tiedt, L. R., Liebenberg, W. et de Villiers, M. M. 2005. Effect of Viscosity and Concentration of Wall Former, Emulsifier and Pore-Inducer on the Properties of Amoxicillin Microcapsules Prepared by Emulsion Solvent Evaporation. *Il Farm.*, 60 (3), 261-267.

Southgate, D. A. 1995. Digestion and metabolism of sugars. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62 (1 Suppl), 203S-210S; discussion 211S.

Spada, J. C., Marczak, L. D. F., Tessaro, I. C. et Noreña, C. P. Z. 2012. Microencapsulation of β-carotene using native pinhão starch, modified pinhão starch and gelatin by freeze-drying. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 47 (1), 186-194.

Specht, F., Saugestad, M., Waaler, T. et Miller, B. W. 1999. The application of shellac as an acidic polymer for enteric coating. *Pharm. Technol.*

Sprossler, B. et Plainer, H. 1983. Immobilized lactase for processing whey. *Food Technol.*, 37 (10), 93-95.

Stephenson, L. S. et Latham, M. C. 1974. Lactose intolerance and milk consumption: the relation of tolerance to symptoms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 27 (3), 296‑303.

Sternberg, M., Kim, C. Y. et Schwende, F. J. 1975. Lysinoalanine: presence in foods and food ingredients. *Science*, 190 (4218), 992‑994.

Stevenson, D. E., Stanley, R. A. et Furneaux, R. H. 1996. Oligosaccharide and alkyl β-galactopyranoside synthesis from lactose with Caldocellum saccharolyticum β-glycosidase. *Enzyme Microb. Technol.*, 18 (8), 544‑549.

Stocks, P. et Karn, M. N. 1933. A Co-Operative Study of the Habits, Home Life, Dietary and Family Histories of 450 Cancer Patients and of an Equal Number of Control Patients. *Ann. Eugen.*, 5 (3‑4), 237‑280.

Stougaard, P. et Schmidt, M. 2012, 16 octobre. Cold-active beta-galactosidase, a method of producing same and use of such enzyme.

Struthers, B. J., Dahlgren, R. R. et Hopkins, D. T. 1979. Lysinolanine: biological effects and significance. Dans *Soy Protein and Human Nutrition* (p. 235‑260), New York, N.Y : Academic Press.

Suarez, F. L., Savaiano, D. A. et Levitt, M. D. 1995a. A comparison of symptoms after the consumption of milk or lactose-hydrolyzed milk by people with self-reported severe lactose intolerance. *N. Engl. J. Med.*, 333 (1), 1‑4.

Suarez, F. L., Savaiano, D. A. et Levitt, M. D. 1995b. Review article The treatment of lactose intolerance. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 9 (6), 589‑597.

Suarez, F. L., Savaiano, D., Arbisi, P. et Levitt, M. D. 1997. Tolerance to the daily ingestion of two cups of milk by individuals claiming lactose intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65 (5), 1502‑1506.

Suarez, F. et Levitt, M. D. 1996. Abdominal symptoms and lactose: the discrepancy between patients' claims and the results of blinded trials. *Am. J. Clin. Nutr.*, 64 (2), 251‑252.

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

Sun, W. et Griffiths, M. W. 2000. Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan–xanthan beads. *Int. J. Food Microbiol.*, 61 (1), 17‑25.

Sutaphanit, P. et Chitprasert, P. 2014. Optimisation of microencapsulation of holy basil essential oil in gelatin by response surface methodology. *Food Chem.*, 150, 313‑320.

Swallow, D. M. 2003. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu. Rev. Genet.*, 37, 197‑219.

Sworn, G. 2009. Xanthan gum. Dans *Handbook of Hydrocolloids* (p. 186‑203), Elsevier.

Takeda, Y., Shirasaka, K. et Hizukuri, S. 1984. Examination of the purity and structure of amylose by gel-permeation chromatography. *Carbohydr. Res.*, 132 (1), 83‑92.

Tan, E.-S., Ying-Yuan, N. et Gan, C.-Y. 2014. A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimisation. *Food Chem.*, 152, 447‑455.

Tanaka, Y., Kagamiishi, A., Kiuchi, A. et Horiuchi, T. 1975. Purification and Properties of β-Galactosidase from Aspergillus oryzae. *J. Biochem. (Tokyo)*, 77 (1), 241‑247.

Tang, J. 2005. Dielectric properties of foods. Dans M. Regier (dir.), *The Microwave Processing of Foods* (p. 22‑40), Woodhead Publishing.

Tavassoli-Kafrani, E., Shekarchizadeh, H. et Masoudpour-Behabadi, M. 2016. Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydr. Polym.*, 137, 360-374.

Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D. et Weiss, J. 2005. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45 (7-8), 587-605.

Tessier, F. J. et Birlouez-Aragon, I. 2012. Health effects of dietary Maillard reaction products: the results of ICARE and other studies. *Amino Acids*, 42 (4), 1119-1131.

Tester, R. F. 1997. Starch: the polysaccharide fractions. Dans P. J. Frazier, P. Richmond et A. M. Donald (dir.), *Starch, structure and functionality* (p. 163-171).

Tester, R. F., Qi, X. et Karkalas, J. 2006. Hydrolysis of native starches with amylases. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 130 (1–2), 39-54.

Thamotharan, M., Bawani, S. Z., Zhou, X. et Adibi, S. A. 1999. Hormonal regulation of oligopeptide transporter pept-1 in a human intestinal cell line. *Am. J. Physiol.*, 276 (4 Pt 1), C821-826.

Tharanathan, R. N. 2005. Starch — Value Addition by Modification. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45 (5), 371-384.

Thorne, M. J., Thompson, L. U. et Jenkins, D. J. 1983. Factors affecting starch digestibility and the glycemic response with special reference to legumes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 38 (3), 481-488.

To, D. et Davé, R. N. 2016. Fluid bed film coating of fine ibuprofen particles. *Powder Technol.*, 290, 102-113.

Toft-Nielson, M., Madsbad, S. et Holst, J. J. 1996. The effect of glucagon-like peptide I (GLP-I) on glucose elimination in healthy subjects depends on the pancreatic glucoregulatory hormones. *Diabetes*, 45 (5), 552-556.

Tolhurst, G., Reimann, F. et Gribble, F. M. 2009. Nutritional regulation of glucagon-like peptide-1 secretion: Nutritional regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *J. Physiol.*, 587 (1), 27-32.

Tomasik, P. 2004. *Chemical and functional properties of food saccharides*, Boca Raton : CRC Press.

Tomlin, J., Lowis, C. et Read, N. W. 1991. Investigation of normal flatus production in healthy volunteers. *Gut*, 32 (6), 665-669.

Topping, D. L. et Clifton, P. M. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.*, 81 (3), 1031-1064.

Tovar, J. et Melito, C. 1996. Steam-Cooking and Dry Heating Produce Resistant Starch in Legumes. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (9), 2642-2645.

Treves, C., Favilli, F., Stio, M., Iantomasi, T. et Vincenzini, M. T. 1990. Changes in metabolite transport by small intestine and kidney of young and old rats. *Mech. Ageing Dev.*, 52 (2), 263-276.

Trowers, E. et Tischler, M. 2014. Gastrointestinal Secretion: Aids in Digestion and Absorption. Dans *Gastrointestinal Physiology*, Cham : Springer International Publishing.

Tuomasjukka, S., Kallio, H. et Forssell, P. 2006. Effect of Microencapsulation of Dietary Oil on Postprandial Lipemia. *J. Food Sci.*, 71 (3), S225-S230.

Turkiewicz, M., Kur, J., Białkowska, A., Cieśliński, H., Kalinowska, H. et Bielecki, S. 2003. Antarctic marine bacterium Pseudoalteromonas sp. 22b as a source of cold-adapted beta-galactosidase. *Biomol. Eng.*, 20 (4-6), 317-324.

Turnbull, G. K. 2000. Lactose intolerance and irritable bowel syndrome. *Nutrition*, 16 (7-8), 665-666.

Turner, K. M., Pasut, G., Veronese, F. M., Boyce, A. et Walsh, G. 2011. Stabilization of a supplemental digestive enzyme by post-translational engineering using chemically-activated polyethylene glycol. *Biotechnol. Lett.*, 33 (3), 617-621.

Uddin, M. S. et Hawlader, H. J. Z. 2001. Microencapsulation of ascorbic acid: effect of process variables on product characteristics. *J. Microencapsul.*, 18 (2), 199-209.

United States Pharmacopeial Convention (dir.). 2014. *Food chemicals codex 9th edition* (9. ed), Rockville, Md : United States Pharmacopeil Convention.

Ur-Rehman, S. 2009. Reduced lactose and lactose-free dairy products. Dans P. L. H. McSweeney et P. F. Fox (dir.), *Advanced Dairy Chemistry* (Third edition, vol. Volume 3, p. 98-104).

Usai-Satta, P., Scarpa, M., Oppia, F. et Cabras, F. 2012. Lactose malabsorption and intolerance: What should be the best clinical management? *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.*, 3 (3), 29-33.

Varela-Moreiras, G., Antoine, J. M., Ruiz-Roso, B. et Varela, G. 1992. Effects of yogurt and fermented-then-pasteurized milk on lactose absorption in an institutionalized elderly group. *J. Am. Coll. Nutr.*, 11 (2), 168-171.

Vernia, P., Di Camillo, M., Foglietta, T., Avallone, V. E. et De Carolis, A. 2010. Diagnosis of lactose intolerance and the « nocebo » effect: The role of negative expectations. *Dig. Liver Dis.*, 42 (9), 616-619.

Vernia, P., Di Camillo, M., Marinaro, V. et Caprilli, R. 2003. Effect of predominant methanogenic flora on the outcome of lactose breath test in irritable bowel syndrome patients. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 57 (9), 1116-1119.

Vesa, T. H., Korpela, R. A. et Sahi, T. 1996. Tolerance to small amounts of lactose in lactose maldigesters. *Am. J. Clin. Nutr.*, 64 (2), 197-201.

Vesa, T. H., Lember, M. et Korpela, R. 1997. Milk fat does not affect the symptoms of lactose intolerance. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 51 (9), 633-636.

Vesa, T. H., Marteau, P. R., Briet, F. B., Boutron-Ruault, M. C. et Rambaud, J. C. 1997. Raising milk energy content retards gastric emptying of lactose in lactose-intolerant humans with little effect on lactose digestion. *J. Nutr.*, 127 (12), 2316-2320.

Vesa, T. H., Seppo, L. M., Marteau, P. R., Sahi, T. et Korpela, R. 1998. Role of irritable bowel syndrome in subjective lactose intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 67 (4), 710-715.

Villela, S. B. 2008. Aliments fonctionnels et allégations alimentaires dans l'Union européenne : une approche juridique. Dans *Aliments fonctionnels* (Tec & Doc).

Villemejane, C., Wahl, R., Aymard, P., Denis, S. et Michon, C. 2015. In vitro digestion of short-dough biscuits enriched in proteins and/or fibres, using a multi-compartmental and dynamic system (1): Viscosity measurement and prediction. *Food Chem.*, 182, 55-63.

Vist, G. E. et Maughan, R. J. 1995. The effect of osmolality and carbohydrate content on the rate of gastric emptying of liquids in man. *J. Physiol.*, 486 (Pt 2), 523-531.

Wallick, D. 2014. Cellulose Polymers in Microencapsulation of Food Additives. Dans *Microencapsulation in the Food Industry* (p. 181-193), Elsevier.

Walstra, P., Wouters, J. T. M. et Geurts, T. J. 2006. *Dairy science and technology* (2nd ed), Boca Raton : CRC/Taylor & Francis.

Wandrey, C., Bartkowiak, A. et Harding, S. E. 2010. Materials for Encapsulation. Dans *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, Springer.

Wang, B., Adhikari, B. et Barrow, C. J. 2014. Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin–sodium hexametaphosphate using

complex coacervation. *Food Chem.*, 158, 358-365.

Wang, Y., Harvey, C. B., Pratt, W. S., Sams, V. R., Sarner, M., Rossi, M., Auricchio, S. et Swallow, D. M. 1995. The lactase persistence/non-persistence polymorphism is controlled by a cis-acting element. *Hum. Mol. Genet.*, 4 (4), 657-662.

Wang, Y.-J. et Wang, L. 2000. Structures and Properties of Commercial Maltodextrins from Corn, Potato, and Rice Starches. *Starch - Stärke*, 52 (8-9), 296-304.

Wautier, M.-P., Tessier, F. J. et Wautier, J.-L. 2014. Les produits de glycation avancée : un risque pour la santé humaine. *Ann. Pharm. Fr.*, 72 (6), 400-408.

Wei, Y. et Ding, M.-Y. 2000. Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A*, 904 (1), 113-117.

Weiner, A. L. 2002. Lipid excipients in phamaceutical dosage forms. Dans J. Swarbrick et J. C. Boylan (dir.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (Second edition), CRC Press.

Welsh, J. D., Poley, J. R., Bhatia, M. et Stevenson, D. E. 1978. Intestinal disaccharidase activities in relation to age, race, and mucosal damage. *Gastroenterology*, 75 (5), 847-855.

Wen, J., Phillips, S. F., Sarr, M. G., Kost, L. J. et Holst, J. J. 1995. PYY and GLP-1 contribute to feedback inhibition from the canine ileum and colon. *Am. J. Physiol.*, 269 (6 Pt 1), G945-952.

Wettergren, A., Schjoldager, B., Mortensen, P. E., Myhre, J., Christiansen, J. et Holst, J. J. 1993. Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig. Dis. Sci.*, 38 (4), 665-673.

Whistler, R. L. et Daniel, J. R. 1984. Molecular structure of starch. Dans *Starch: Chemistry and Technology (Second Edition)* (p. 153-182), San Diego : Academic Press.

White Jr., D. R., Hudson, P. et Adamson, J. T. 2003. Dextrin characterization by high-performance anion-exchange chromatography–pulsed amperometric detection and size-exclusion chromatography–multi-angle light scattering–refractive index detection. *J. Chromatogr. A*, 997 (1–2), 79-85.

WHO/FAO/UNU. 2007. *Protein and amino acid requirements in human nutrition* (Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert ConsultationTechnical Report Series 935 n° Technical Report Series 935).

Willett, W. C. 1998. The dietary pyramid: does the foundation need repair? *Am. J. Clin. Nutr.*, 68 (2), 218-219.

Williams, P. A. et Phillips, G. O. 2009. Gum arabic. Dans *Handbook of Hydrocolloids* (p. 252-273), Elsevier.

Wilson, J. D., Bechtel, D. B., Todd, T. C. et Seib, P. A. 2006. Measurement of Wheat Starch Granule Size Distribution Using Image Analysis and Laser Diffraction Technology. *Cereal Chem. J.*, 83 (3), 259-268.

Wilt, T. J., Shaukat, A., Shamliyan, T., Taylor, B. C., MacDonald, R., Tacklind, J., Rutks, I., Schwarzenberg, S. J., Kane, R. L. et Levitt, M. 2010. *Lactose Intolerance and Health. Evidence report/Technology Assessment No. 192.*, Rockville (MD° : Agency for Healthcare Research and Quality (US).

Wolever, T. M., Cohen, Z., Thompson, L. U., Thorne, M. J., Jenkins, M. J., Prokipchuk, E. J. et Jenkins, D. J. 1986. Ileal loss of available carbohydrate in man: comparison of a breath hydrogen method with direct measurement using a human ileostomy model. *Am. J. Gastroenterol.*, 81 (2), 115-122.

Wolin, M. J. 1981. Fermentation in the rumen and human large intestine. *Science*, 213 (4515), 1463-1468.

Woods, S. C. 2004. Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 286 (1), G7-13.

Wright, E. M., Hirayama, B. A. et Loo, D. F. 2007. Active sugar transport in health and disease. *J. Intern. Med.*, 261 (1), 32-43.

Wu, K.-G. et Xiao, Q. 2005. Microencapsulation of Fish Oil by Simple Coacervation of Hydroxypropyl Methylcellulose. *Chin. J. Chem.*, 23 (11), 1569-1572.

Wursch, P. 1989. Starch in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.*, 60, 199-256.

Wurzburg, O. B. 1973. Starch in the food industry. Dans *CRC Handbook of Food Additives, Second Edition*, CRC Press.

Wurzburg, O. B. 2006. Modified starch. Dans *Food Polysaccharides and Their Applications*.

Xenos, K., Kyroudis, S., Anagnostidis, A. et Papastathopoulos, P. 1998. Treatment of lactose intolerance with exogenous beta-D-galactosidase in pellet form. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 23 (2), 350-355.

Yang, S.-T., Marchio, J. L. et Yen, J.-W. 1994. A Dynamic Light Scattering Study of β-Galactosidase: Environmental Effects on Protein Conformation and Enzyme Activity. *Biotechnol. Prog.*, 10 (5), 525-531.

Yang, Y., Cui, S. W., Gong, J., Guo, Q., Wang, Q. et Hua, Y. 2015. A soy protein-polysaccharides Maillard reaction product enhanced the physical stability of oil-in-water emulsions containing citral. *Food Hydrocoll.*, 48, 155-164.

Yoon, J. H., Thompson, L. U. et Jenkins, D. J. 1983. The effect of phytic acid on in vitro rate of starch digestibility and blood glucose response. *Am. J. Clin. Nutr.*, 38 (6), 835-842.

Yoshii, H., Soottitantawat, A., Liu, X.-D., Atarashi, T., Furuta, T., Aishima, S., Ohgawara, M. et Linko, P. 2001. Flavor release from spray-dried maltodextrin/gum arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2 (1), 55-61.

Zaman, H. U. et Beg, M. D. H. 2015. Improvement of physico-mechanical, thermomechanical, thermal and degradation properties of PCL/gelatin biocomposites: Effect of gamma radiation. *Radiat. Phys. Chem.*, 109, 73-82.

Zhang, G., Ao, Z. et Hamaker, B. R. 2006. Slow Digestion Property of Native Cereal Starches. *Biomacromolecules*, 7 (11), 3252-3258.

Zhang, G., Venkatachalam, M. et Hamaker, B. R. 2006. Structural Basis for the Slow Digestion Property of Native Cereal Starches. *Biomacromolecules*, 7 (11), 3259-3266.

Zhang, J., Chen, F., Liu, F. et Wang, Z.-W. 2010. Study on structural changes of microwave heat-moisture treated resistant Canna edulis Ker starch during digestion in vitro. *Food Hydrocoll.*, 24 (1), 27-34.

Zhang, T., Brubaker, P. L., Thompson, J. C. et Greeley, G. H. 1993. Characterization of peptide-YY release in response to intracolonic infusion of amino acids. *Endocrinology*, 132 (2), 553-557.

Zheng, L., Ding, Z., Zhang, M. et Sun, J. 2011. Microencapsulation of bayberry polyphenols by ethyl cellulose: Preparation and characterization. *J. Food Eng.*, 104 (1), 89-95.

Zhong, Q. et Jin, M. 2009. Nanoscalar Structures of Spray-Dried Zein Microcapsules and in Vitro Release Kinetics of the Encapsulated Lysozyme As Affected by Formulations. *J. Agric. Food Chem.*, 57 (9), 3886-3894.

Zhou, Q. Z., Chen, X. D. et Li, X. 2003. Kinetics of lactose hydrolysis by β-galactosidase of Kluyveromyces lactis immobilized on cotton fabric. *Biotechnol. Bioeng.*, 81 (2), 127-133.

Zhou, Q. Z. K. et Chen, X. D. 2001. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β-galactosidase from Kluyveromyces lactis. *Biochem. Eng. J.*, 9 (1), 33‑40.

Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S. et Blanchard, C. 2007. Effect of the addition of fatty acids on rice starch properties. *Food Res. Int.*, 40 (2), 209‑214.

Zhu, L.-J., Liu, Q.-Q., Wilson, J. D., Gu, M.-H. et Shi, Y.-C. 2011. Digestibility and physicochemical properties of rice (Oryza sativa L.) flours and starches differing in amylose content. *Carbohydr. Polym.*, 86 (4), 1751‑1759.

Zobel, H. F. 1988. Molecules to Granules: A Comprehensive Starch Review. *Starch - Stärke*, 40 (2), 44‑50.

Zopf, Y., Hahn, E. G., Raithel, M., Baenkler, H.-W. et Silbermann, A. 2009. The Differential Diagnosis of Food Intolerance. *Dtsch. Ärztebl. Int.*, 106 (21), 359‑370.

Résumé

Actuellement, 70 % de la population mondiale est concernée par la baisse génétiquement programmée de l'activité de la lactase. Pour ces sujets, la consommation de lactose peut entrainer de sévères troubles digestifs. Les produits diététiques étudiés, réhydratés à l'aide de lait par le consommateur, sont donc potentiellement source d'inconforts. La première partie de ce projet s'est par conséquent attachée à développer des moyens permettant l'obtention de produits convenant à la majorité de la population intolérante au lactose. Dans le même temps, de plus en plus conscient du lien étroit liant alimentation, santé et bien-être, le consommateur tend depuis quelques années à modifier ses habitudes alimentaires. Cela se traduit par un intérêt grandissant pour les aliments « santé ». La formulation de tels produits se heurte toutefois encore au manque de connaissances quant à la biodisponibilité de certains macro- et micronutriments. Ce projet à visée industrielle propose par conséquent d'optimiser la digestibilité de l'amidon et des protéines contenus dans différents produits diététiques destinés à remplacer l'intégralité de la ration journalière. Pour ce faire, la digestibilité de différentes sources d'amidon (blé, maïs, maïs cireux, manioc, pomme de terre, riz et riz cireux) et de différentes protéines (caséines, concentrat de protéines de lait, isolat de protéines de pois, poudre de blanc d'œuf, concentrat de protéines sériques et isolat de protéines de soja) a été étudiée *in vitro* et comparée.

Mots-clés : Digestibilité, intolérance au lactose, gastro-intestinal, amidon, protéines

Currently, 70% of the world population is affected by the genetically programmed decline in lactase activity. For these subjects, lactose consumption can cause severe digestive disorders. The studied dietetic products, usually rehydrated with milk by the consumer before use, are hence a potential source of digestive discomfort. The first part of this project deals therefore with development ways in order to obtain suitable products for the majority of lactose intolerant population. Laterraly, increasingly aware of the close link between food and health, consumers tend to change their eating habits. This is reflected by a growing interest in "healthy" foods. The formulation of these products is however still hampered by a lack of knowledge about some macro- and micronutrients bioavailability. This industrial project aims to maximize the digestibility of starch and protein contained in dietary products replacing the entire daily ration. The digestibility of different starch sources (wheat, corn, waxy maize, cassava, potato, waxy rice and rice) and different food proteins (caseins, milk protein concentrate, pea protein isolate, egg white powder, whey protein concentrate and soya protein isolate) has thus been studied and compared *in vitro*.

Keywords: Digestibility, lactose intolerance, gastrointestinal, starch, proteins