



HAL
open science

**Etude et optimisation des propriétés
technofonctionnelles et biologiques de co-produits
marins ayant subi une hydrolyse enzymatique suivie
d'une glycation**

Claire Sabourin

► **To cite this version:**

Claire Sabourin. Etude et optimisation des propriétés technofonctionnelles et biologiques de co-produits marins ayant subi une hydrolyse enzymatique suivie d'une glycation. Autre [q-bio.OT]. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2012. Français. NNT : 2012BRES0071 . tel-02144001

HAL Id: tel-02144001

<https://theses.hal.science/tel-02144001>

Submitted on 29 May 2019

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.

**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE
OCCIDENTALE**

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE
OCCIDENTALE**

Mention : Biologie Marine

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Claire Sabourin

Préparée à l'Institut Universitaire Européen de
la Mer

Laboratoire de l'environnement Marin UMR
CNRS- UBO - IRD 6539.

Étude et optimisation des
propriétés technofonctionnelles
et biologiques de co-produits
marins ayant subi une
hydrolyse enzymatique suivie
d'une glycation

Thèse soutenue le 2 juillet 2012

devant le jury composé de :

Mme Isabelle Chevalot

Professeur, ENSAIA Nancy - *rapporteur*.

Mr Laurent Dufossé

Professeur, Université de la Réunion - *rapporteur*

Mr Thierry Aubry

Professeur, Université de Bretagne Occidentale - *examineur*

Mr José Luis Zambonino-Infante

Directeur de Recherche, IFREMER - *examineur*

Mme Fabienne Guérard

Professeur, Université de Bretagne Occidentale - *directrice de thèse*

Mr Nicolas Decourcelle

Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale, -
co-directeur de thèse

À justine
« *En écrivant cette parole – À peu que le cœur ne me fend. »*
François Villon

« *N'ayez pas peur des fausses notes... ça n'existe pas »*
Miles Davies

Sommaire

Liste des abréviations	v
Production scientifique	vii
Introduction	1
1 Etude Bibliographique	5
1.1 La réaction de Maillard	5
1.1.1 La chimie de la réaction	5
1.1.2 Facteurs influençant la réaction de Maillard	12
1.1.2.1 Nature des réactifs	13
1.1.2.2 Température et durée de chauffage	15
1.1.2.3 pH	17
1.1.2.4 Activité de l'eau et humidité relative	17
1.1.2.5 Rôle des sels	18
1.1.2.6 Milieu sec/milieu liquide	19
1.1.2.7 Autres facteurs	21
1.2 Propriétés tensioactives, émulsifiants, émulsions	23
1.2.1 Tension superficielle	23
1.2.2 Les émulsifiants	25
1.2.2.1 Les différentes classes d'émulsifiants	25
1.2.2.2 Les propriétés d'un émulsifiant	26
1.2.3 Le caséinate de sodium	27
1.2.4 Les hydrolysats issus de produits marins	28
1.2.5 Les émulsions	29
1.2.5.1 Définition d'une émulsion	29
1.2.5.2 Mécanismes de stabilisation physico-chimiques d'une émulsion	31
1.2.5.3 Mécanismes de déstabilisation physico-chimiques d'une émulsion	34
1.2.6 Mesures et évaluation des propriétés émulsifiantes	39
1.2.6.1 Mesure par absorbance	39
1.2.6.2 Mesures rhéologiques	39
1.2.6.3 Suivi du déphasage	41
1.2.6.4 Granulométrie laser	43
1.2.6.5 Méthodes microscopiques	43
1.3 Origines biologiques des processus oxydatifs et mécanismes de défenses	44
1.3.1 Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	45
1.3.2 La production des radicaux libres par les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	46
1.3.3 Conséquences de la présence de radicaux libres	48

1.3.4	Systèmes antiradicalaires endogènes et exogènes.....	50
1.3.4.1	<i>Systèmes antiradicalaires endogènes</i>	50
1.3.4.2	<i>Systèmes antiradicalaires exogènes</i>	52
1.4	Modification des propriétés biologiques et technofonctionnelles de sources protéiques par la réaction de Maillard	58
1.4.1	Propriétés biologiques	58
1.4.1.1	<i>Effet de la réaction de Maillard sur la capacité antioxydante</i>	58
1.4.1.2	<i>Propriétés antibiotiques</i>	62
1.4.1.3	<i>Formation de composés cytotoxiques</i>	64
1.4.1.4	<i>Propriétés mutagènes</i>	65
1.4.1.5	<i>Perte de la valeur nutritionnelle des aliments</i>	66
1.4.1.6	<i>Autres effets de la réaction de Maillard</i>	67
1.4.2	Propriétés technofonctionnelles	69
1.4.2.1	<i>Formation d'arômes</i>	69
1.4.2.2	<i>Solubilité</i>	70
1.4.2.3	<i>Propriétés émulsifiantes</i>	72
1.5	Conclusion.....	75
2	Matériel et méthodes.....	79
2.1	Caractérisation des réactifs utilisés	79
2.1.1	Sources protéiques	79
2.1.2	Glucides.....	80
2.2	Réaction de Maillard en milieu sec.....	82
2.3	Hydrolyse enzymatique des protéines	85
2.4	Dosages biochimiques.....	87
2.4.1	Dosage des fonctions aminés libres	87
2.4.2	Mesure du brunissement.....	88
2.5	Evaluation des propriétés physico-chimiques	88
2.5.1	Solubilité des glycoconjugués.....	88
2.5.2	Mesure de la tension de surface	89
2.5.3	Cinétique de déphasage des émulsions.....	90
2.5.4	Mesures rhéologiques	92
2.5.4.1	<i>Mesures de la viscosité</i>	92
2.5.4.2	<i>Mesures oscillatoires</i>	93
2.6	Evaluation de l'activité antiradicalaire	94
2.6.1	Dosage du fer réducteur.....	94
2.6.2	Dosage au DPPH	95
2.6.3	Pouvoir chélateur	98
2.7	Analyse des PRM par chromatographie d'exclusion de taille	99

2.8 Traitements statistiques	102
3 Résultats et discussion	103
3.1 Mises en œuvre et validation des conditions de réaction de Maillard et de l'émulsion modèle	103
3.1.1 Maîtrise du procédé de la réaction de Maillard en milieu sec.....	103
3.1.1.1 <i>Milieux réactionnels et conditions de réaction</i>	103
3.1.1.2 <i>Reproductibilité du protocole de fabrication des PRM</i>	107
3.1.2 Mise en œuvre des émulsions modèles	113
3.1.2.1 <i>Choix du ratio H/E</i>	113
3.1.2.2 <i>Effet d'un colorant ajouté à l'émulsion.</i>	114
3.1.2.3 <i>Détermination de la concentration de protéines dans l'émulsion pour l'étude</i>	114
3.1.2.4 <i>pH des solutions aqueuses</i>	116
3.1.2.5 <i>Validation de l'effet du tampon phosphate résiduel</i>	117
3.1.2.6 <i>Reproductibilité des émulsions</i>	118
3.1.2.7 <i>Mise en place des mesures rhéologiques</i>	119
3.1.3 Conclusion.....	122
3.2 La réaction de Maillard	123
3.2.1 Effet du type de glucide et de la source protéique	123
3.2.1.1 <i>Brunissement</i>	124
3.2.1.2 <i>Dosage des fonctions aminées libres</i>	128
3.2.1.3 <i>Etude des profils chromatographiques</i>	134
3.2.2 Effet du poids moléculaire de la source protéique.....	141
3.2.2.1 <i>L'hydrolyse du caséinate</i>	141
3.2.2.2 <i>Dosage des fonctions aminées libres</i>	145
3.2.2.3 <i>Brunissement</i>	148
3.2.2.4 <i>Etude des profils chromatographiques</i>	151
3.2.3 Mise en évidence d'un facteur limitant	156
3.2.3.1 <i>Brunissement</i>	156
3.2.3.2 <i>Dosage des fonctions aminées libres</i>	157
3.2.3.3 <i>Etude des profils chromatographiques</i>	159
3.2.4 Conclusion.....	164
3.3 Solubilités, tensions de surface et propriétés émulsifiantes des produits de la réaction de Maillard	165
3.3.1 Solubilité	165
3.3.2 Tension de surface	172
3.3.3 Facteurs influençant les propriétés émulsifiantes	178
3.3.3.1 <i>Type de glucide</i>	179
3.3.3.2 <i>Concentration en glucide</i>	185
3.3.3.3 <i>Hydrolyse enzymatique.</i>	187

3.3.3.4 Poids moléculaire du Dextran.	191
3.3.4 Caractéristiques rhéologiques des émulsions	192
3.3.4.1 Viscosimétrie à cylindres coaxiaux	192
3.3.4.2 Mesures oscillatoires	Erreu
r ! Signet non défini.	
3.3.4.3 Microscopie de Force Atomique	197
3.3.5 Conclusion	198
3.4 La capacité antioxydante	201
3.4.1 Effet de la capacité antioxydante en fonction du type de glucide et de la source protéique utilisée lors de la réaction de Maillard	201
3.4.2 Influence du poids moléculaire de la source protéique	220
3.4.3 Influence de la concentration en glucide	231
3.4.4 Conclusion	236
4 Conclusion générale et perspectives	237
5 Annexes	241
6 Références	259

Liste des abréviations

AAO : activité antioxydante
AAR : activité antiradicalaire
ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine I
AGE : produits avancés de la réaction de Maillard
 a_w : activité de l'eau
Blg : β -lactoglobuline
BHA : hydroxyanisole butylé
BSA : sérum albumine bovine
CGA : acide chlorogénique
CMC : concentration micellaire critique
CPP : caséinaosphopeptides
CS : Caséinate de sodium
CSH : Caséinate de sodium hydrolysé
Dex : Dextran
DH : degré d'hydrolyse
DP : degré de polymérisation
DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
Ed : eau distillée
EDTA : acide éthylène diamine triacétique
ERA : espèce réactive de l'azote
ERO : espèce réactive de l'oxygène
FAAL : 3-(2-furyl)-acryloyl-Ala-lys-OH
FOS : fructooligosaccharides
Glc : Glucose
HAT : réaction impliquant un transfert d'hydrogène
LDL : low density lipoprotein
OPA : orthophtaldialdéhyde
ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity
pI : point isolélectrique

PM : poids moléculaire
PPP : protéine de plasma de porc
PRM : produits de la réaction de Maillard
RH : humidité relative
RL : radical libre
RM : réaction de Maillard
RT : temps de rétention
SDS : sodium dodécyl sulfate
SET : réaction impliquant un transfert d'électron
SH : hydrolysate de crevette
SOD : superoxyde dismutase
SPI : isolat de protéine de Soja
TBARS : substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TCA : acide trichloroacétique
TFA : acide trifluoroacétique
 T_g : température de transition vitreuse
 T_p : tampon phosphate
TS : tension de surface
USDA : United State Department of Agriculture
UV: ultra violet
 V_T : volume total
Xyl : Xylose

Production scientifique

Communications dans des congrès internationaux:

- 41st WEFTA meeting – 27-30 September – Gothenburg – Suède.
Effect of the Maillard reaction on antioxidant activity and functional properties of a sugar – shrimp hydrolysate system.
Sabourin C., Decourcelle N., Grohens Y., Benvegna T., Aubry T. & Guérard F. – communication orale
- 5th International symposium and business meeting, COSM'ING, saint Malo, France. 23-25 June 2010
Comparative Study of Emulsifying Properties of Sodium Caseinate and Shrimp Hydrolysate (*Pandalus borealis*) Modified Through the Maillard Reaction with or without phosphate and in “Dry State”.
Claire Sabourin, Nicolas Decourcelle & Fabienne Guérard. Communication affichée.
- *ESBM 2009 “Biotechnological exploitation of marine resources”*, Concarneau, France, 1-3 september 2009
Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: a review.
Guérard F., Decourcelle N., Sabourin C., Le Grel L., Le Floch P. , Gourlay F., Le Delezir R., Jaouen P. & Bourseau P. Communication orale.
- *ESBM 2009 “Biotechnological exploitation of marine resources”*, Concarneau, France, 1-3 septembre 2009
Emulsifying properties of a Shrimp hydrolysate (*Pandalus borealis*) modified through the Maillard reaction with Xylose.
Decourcelle N., Sabourin C. & **Guérard F.** Communication orale.
- 4th european symposium POLYMERIX, Rennes, France, 28-29 mai 2009
Modification of emulsifying properties of sodium caseinate using Xylose and FOS.
Sabourin C., Decourcelle D., Dauer G. & Guérard F. Communication affichée

Communication dans des congrès, colloques nationaux:

- Session technique BIOTECMAR, Quimper, France, 28 mai 2010
Propriétés tensioactives d'hydrolysats d'origine protéique
Sabourin C., Decourcelle N. & Guérard F. Communication orale
- GlycoNetWest,,Nantes, France, 26 mars 2010
Emulsifying Properties of Sodium Caseinate Modified Through the Maillard Reaction.
Sabourin C. Decourcelle N. & Guérard F. Communication affichée.

Publications:

- «Effect of the Maillard reaction with Xylose on the emulsifying properties of a shrimp hydrolysate (*pandalus borealis*)» Decourcelle N., Sabourin C., Dauer G. and Guérard F. Food research international. 2010. 43. 2155-2160
- « Comparison of the emulsifying properties of sodium Caseinate and a Shrimp Hydrolysate (*Pandalus borealis*) glycosylated in dry state with Xylose or Dextran » Sabourin C., Decourcelle N., Aubry T., Benvegna T., Grohens Y. & Guérard F. en préparation
- « Characteristics and antioxidant activity of a shrimp hydrolysate (*Pandalus borealis*) heated in dry state with different sugars or polysaccharide » Sabourin C., Decourcelle N., Aubry T., Benvegna T., Grohens Y. & Guérard F. en preparation

Introduction

L'exploitation du milieu marin produit chaque année une biomasse estimée à 144 millions de tonnes de produits divers, poissons, mollusques et crustacés, issus d'espèces sauvages ou cultivées (rapport SOFIA 2009, FAO, www.fao.org). La démonstration récente des effets bénéfiques de la consommation de poissons gras et maigres dans la prévention des maladies cardio-vasculaires et du tractus gastro-intestinal a renforcé l'intérêt des consommateurs pour les produits de la mer et encouragé une utilisation complète des captures, y compris les coproduits comme les peaux, les têtes, les viscères, les os ou les cartilages (Guérard, 2009). On extrait désormais des co-produits une grande variété de molécules : huiles marines, enzymes, pigments, squalène, dérivés de la chitine, etc... La production halieutique française est évaluée à 500 000 tonnes dont 50% sont éliminées sous forme de co-produits (faux poissons, peaux, arrêtes,...) susceptibles d'être valorisés. A ce jour, la principale voie de valorisation (52%) est la transformation de ces co-produits en farines et en huiles pour l'alimentation animale, l'agriculture et la consommation humaine (rapport OFIMER, 2007). Néanmoins cette voie de valorisation donne des produits à faible valeur ajoutée, seulement 25% des co-produits ont une valorisation à forte valeur ajoutée (utilisation en pharmacologie, produit alimentaire intermédiaire,...).

Confrontés à des enjeux environnementaux (notamment la raréfaction de la ressource), mais également à des enjeux économiques et sociaux, les professionnels de la filière pêche et transformation des produits de la mer se sont associés aux chercheurs pour promouvoir une utilisation rationnelle des biomasses marines (produits et co-produits). Ainsi, plusieurs projets à l'échelle régionale comme le PSDR GO (Programme de Recherche pour et sur le Développement Régional dans le Grand Ouest – 2008-2011) ou européenne comme les programmes SEAFOODplus (6ème PCRD) ou BIOTECMAR (INTERREG IVB Espace Atlantique), ont été menés avec pour objectif de (1) faire un état des lieux des biomasses disponibles, et (2) d'explorer de nouvelles voies de valorisation des biomasses marines. Parmi les procédés biotechnologiques offrant un champ très dynamique de recherche et d'applications industrielles, l'hydrolyse enzymatique constitue une approche d'un intérêt stratégique majeur pour réhabiliter la fraction protéique des co-produits marins. L'utilisation combinée de l'hydrolyse enzymatique, et des procédés de filtration sur membrane est susceptible de conduire à l'obtention de nouveaux actifs ou molécules, dotés de propriétés fonctionnelles, nutritionnelles et/ou biologiques. Par ailleurs, la

modification chimique des mélanges peptidiques par des substrats carbonylés (Réaction de Maillard ou RM) s'est s'avérée intéressante pour renforcer et standardiser les niveaux d'activité antioxydante des hydrolysats protéiques (Sumaya-Martinez *et al.*, 2005; Guérard *et al.*, 2007) ou pour modifier les propriétés fonctionnelles des protéines telles que les propriétés émulsifiantes ou moussantes (Chevalier *et al.*, 2001a ;Kato, 2002 ; Wooster et Augustin, 2006 ; Corzo-Martinez *et al.*, 2010). Les applications visées sont l'alimentation humaine et animale, la nutraceutique, mais également la production de nouveaux ingrédients naturels destinés aux industries alimentaires. Parallèlement, le développement de nouveaux produits, ayant des textures ou caractéristiques complexes (doubles émulsions, produits aérés,...) a conduit les industriels à rechercher de nouveaux ingrédients fonctionnels, d'origine naturelle, pour répondre aux souhaits des consommateurs en attente d'une réduction de la teneur en composés d'origine chimique dans les produits transformés.

Dans ce contexte, des travaux ont été menés au laboratoire sur la valorisation des co-produits marins par hydrolyse enzymatique couplée à des réactions de glycation (Sumaya-Martinez, 2004 ; Laroque, 2008) ou des procédés de fractionnement sur membranes (Chabeaud, 2008). L'utilisation de la réaction de Maillard, menée dans des conditions de réaction suffisamment douces pour prévenir la production de molécules toxiques, a permis de développer des composés dotés d'une forte capacité antioxydante. Toutefois, l'impact de la RM sur les propriétés fonctionnelles des protéines n'avait pas encore été exploré au laboratoire.

La thèse porte sur la production de nouveaux actifs bifonctionnels, à la fois émulsifiants et antioxydants, à partir d'un hydrolysat de crevette modifié par RM menée en conditions contrôlées. Pour aboutir à une modification de ses propriétés émulsifiantes et antioxydantes initiales, cet hydrolysat a subi une RM avec des glucides réducteurs ou peu réducteurs, et en présence ou en absence d'un catalyseur. Parallèlement, du caséinate de sodium natif, et hydrolysé à différents degrés, a été étudié en tant que référence et témoin dans les mêmes conditions. La difficulté majeure rencontrée dans le cadre de la présente étude concerne la faible réactivité de certains des glucides utilisés, palliée par des conditions d'activité de l'eau très spécifiques.

Le premier objectif de ce travail a donc été de déterminer les conditions de RM pour la thèse. Ainsi, les paramètres tels que la présence d'un catalyseur et d'une faible a_w ont tout

d'abord été définis. Puis, les effets de la source protéique (hydrolysate de crevette ou caséinate) couplés à la réactivité des glucides (mono ou polysaccharides, réducteur, ou peu réducteur) et de leur concentration, ont été étudiés. Sur ces aspects, les présents travaux visent à élargir le champ des connaissances sur la RM menée en conditions contrôlées. Son second objectif est la caractérisation des propriétés des composés néoformés issus de la RM. Il s'agit de leurs propriétés émulsifiantes étudiées dans des émulsions modèles, huile/eau, et de leurs propriétés antioxydantes mesurées par des méthodes *in vitro*.

Le premier chapitre de la thèse présente dans un premier temps l'état de l'art des connaissances dans le domaine de la chimie de la RM, des émulsifiants et des émulsions, puis aborde l'origine biologique des processus oxydatifs et leurs mécanismes de défense. Enfin, une seconde partie porte sur le rôle de la RM en tant que procédé capable de moduler ou modifier les propriétés émulsifiantes ou antioxydantes des sources protéiques.

Le second chapitre est consacré à la présentation des matériels et méthodes. La démarche scientifique permettant d'aboutir à la combinaison des paramètres de la RM pour la production de composés émulsifiants et antioxydants est traitée, et les méthodes analytiques mises en œuvre sont décrites.

Les résultats sont présentés dans le troisième chapitre en commençant par les étapes de mises au point des conditions de la RM et des méthodes de caractérisation des émulsions. Les résultats traitent ensuite des mécanismes de la RM selon les réactants utilisés. Puis, les conséquences de la RM sur les propriétés émulsifiantes et antioxydantes sont analysées.

Ces points sont abordés selon trois angles :

- impact du type de glucides par comparaison entre une protéine de référence (le caséinate de sodium) et l'hydrolysate marin
- influence du poids moléculaire de la source protéique
- effet de la concentration en glucide

Pour terminer, un bilan des résultats portant sur les différents aspects et conséquences de la réaction de Maillard étudiés au cours de cette thèse ainsi que les perspectives qui en découlent sont présentés.

1 Etude Bibliographique

1.1 La réaction de Maillard

La réaction de Maillard est l'ensemble des interactions résultant de la réaction initiale entre une fonction aminée et une fonction carbonylée. Cette réaction est à la fois souhaitée et redoutée. En effet, la réaction de Maillard a une importance considérable dans la chimie des aliments. Elle est la principale responsable des saveurs, et de la couleur des aliments cuits. Néanmoins, certains des composés produits entraînent une dégradation de l'aspect et du goût, ou sont toxiques (cancérogènes, mutagènes, . . .).

Ces réactions de brunissement non enzymatique, plus connues sous les termes de caramélisation et réaction de Maillard sont associées à la formation de nouveaux composés dotés de propriétés antioxydantes et fonctionnelles. La réaction de Maillard joue un rôle majeur dans la stabilité des produits alimentaires, la nutrition, le développement d'arôme et la santé. Elle a été décrite pour la première fois par Louis Camille Maillard en 1912.

1.1.1 La chimie de la réaction

La réaction de Maillard a lieu entre des composés carbonylés, essentiellement des glucides réducteurs, et des groupes aminés issus d'acides aminés libres, de peptides ou de protéines. Dans les matrices alimentaires, les principaux glucides réducteurs concernés sont des monosaccharides et des disaccharides. Depuis une vingtaine d'années, la réaction de Maillard est aussi utilisée dans la production d'ingrédients fonctionnels. Dans ce cas, les glucides utilisés peuvent être des glucides dits simples, les mono et disaccharides (Gu *et al.*, 2010 ; Laroque *et al.*, 2008 ; Chobert *et al.*, 2006 ; Chevalier *et al.*, 2001a) , ou des glucides dits complexes, les polysaccharides (Corzo-Martinez *et al.*, 2010 ; Wooster et Augustin, 2006 ; 2007 ; Jiménez-Castaño *et al.*, 2005 ; 2007).

Les conséquences de la réaction de Maillard sont nombreuses :

- Apparition de pigments bruns, appelés mélanoidines. Ces composés ont un haut poids moléculaire, des propriétés fonctionnelles et biologiques variables. Leur structure et leur formation sont encore peu élucidées (Wang *et al.*, 2011).
- Formation de composés volatils. Ces composés sont souvent des composés d'arômes développés au cours de la cuisson ou de la torréfaction des aliments (Ames *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2011).
- Production de molécules ayant des activités biologiques. Ces molécules peuvent être antioxydantes (Sumaya Martinez *et al.*, 2005) , antibiotiques (Rufian – Henares et Morales, 2008) ou antimutagènes (Kikugawa *et al.*, 2000 ; Gökmen et Senyuva, 2007). Ces activités biologiques sont en partie dues à l'apparition de réductones.
- Perte de la valeur nutritionnelle des aliments. La réaction de Maillard entraîne une diminution de la disponibilité d'acides aminés essentiels tels que la lysine, l'arginine et la méthionine (Gibson *et al.*, 2006), une diminution de la digestibilité des protéines (Rawel *et al.*, 2007) ainsi qu'une perte en vitamine C et K.
- Génération de composés potentiellement cytotoxiques tels que l'acrylamide ou des amines hétérocycliques produites, sous certaines conditions, lors de la réaction de Maillard.

La réaction dont le mécanisme simplifié est donné en figure 1.1 se déroule en trois étapes : la phase précoce, la phase avancée et la phase tardive.

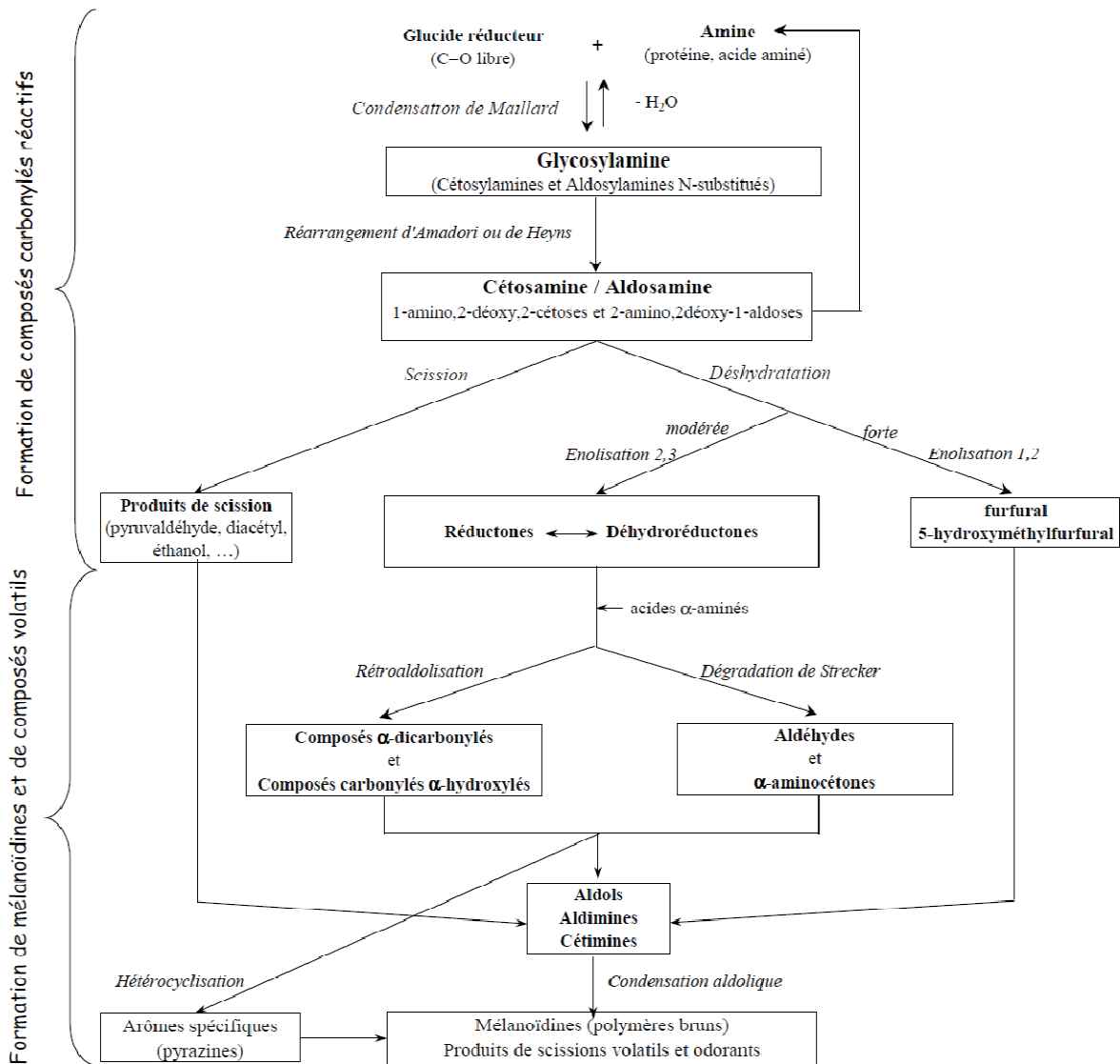


Figure 1.1 – Schéma simplifié de la réaction de Maillard (d'après Hodge, 1953)

Phase précoce :

La première étape de la réaction de Maillard est l'addition nucléophile d'une fonction aminée libre (ex : protéine, peptide, acide aminé) sur la fonction carbonylée d'un glucide réducteur ou d'un composé possédant une fonction carbonyle libre (figure 1.2). Cette réaction de condensation entraîne l'élimination d'une molécule d'eau et la formation d'une base de Schiff. Celle-ci s'isomérise en glycosylamine N-substituée (aldosylamine ou cétylamine).

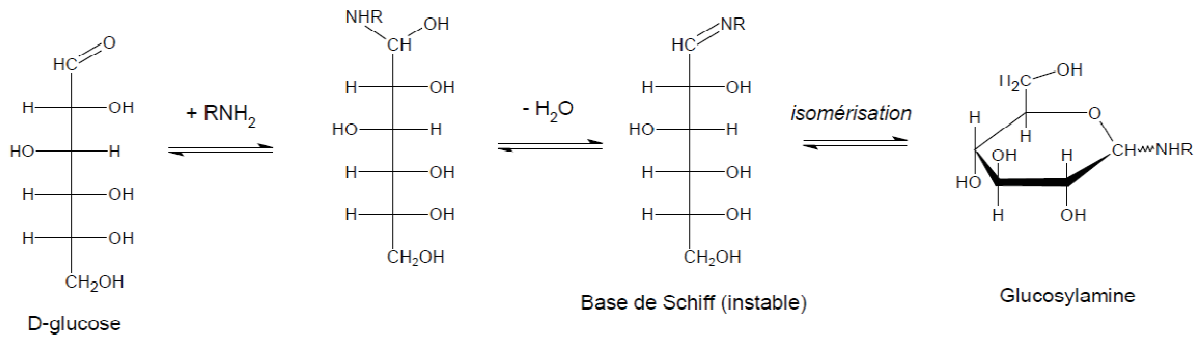


Figure 1.2 – Addition nucléophile d’une fonction amine sur la fonction carbonyle du D-Glucose lors de la phase précoce de la réaction de Maillard (d’après Davidek et Davidek, 2004)

Cette réaction est réversible et le glucide réducteur et l’acide aminé peuvent être régénérés. Les aldosylamines donnent, en milieu acide, des cétosamines : c’est le réarrangement d’Amadori (figure 1.3). Les cétosylamines donnent des aldosamines par réarrangement de Heyns. La fonction carbonylée des acides aminés catalyse ces réactions et produit des molécules spécifiques de la réaction de Maillard. Cette phase précoce est assez bien comprise et documentée.

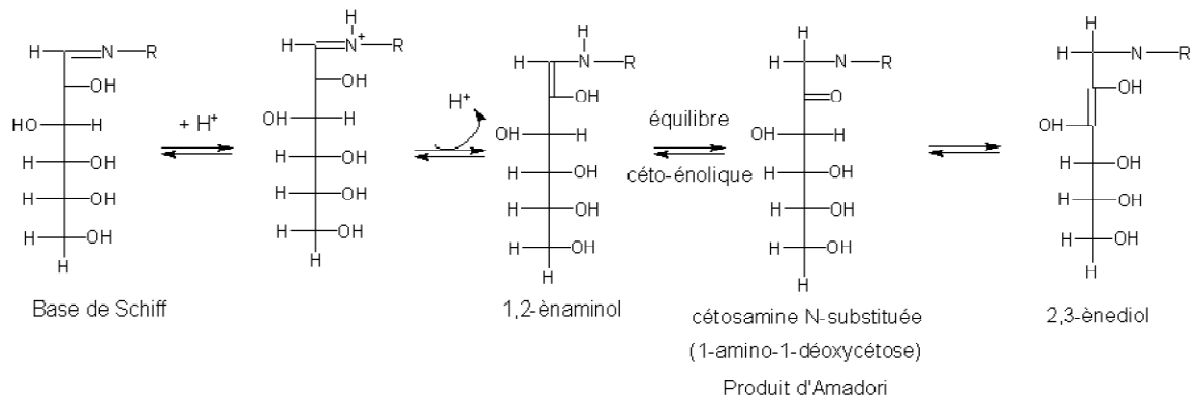


Figure 1.3 – Formation d’un composé d’Amadori lors de la réaction de Maillard entre le Glucose et un composé aminé (d’après Davidek et Davidek, 2004)

Phase avancée :

Elle comprend de nombreuses réactions qui se déroulent en parallèle. Toutefois trois voies principales peuvent être mises en exergue : la déshydratation forte, la déshydratation modérée et les phénomènes de scissions. La prépondérance d’une voie sur une autre dépend des conditions expérimentales, notamment de la température et du pH.

La déshydratation forte

L'énolisation en position 1,2 des produits d'Amadori/Heyns donne, par chauffage en milieu acide, des composés α -dicarboxylés insaturés (figure 1.4).

Ainsi les cétosamines, par chauffage en milieu acide, peuvent générer des composés de type furaldéhyde (dans le cas d'un pentose) ou déshydrofuraldéhyde (dans le cas d'un hexose), en particulier le 5-hydroxyméthylfurfural qui absorbe à 285nm (Ames *et al.*, 1999). La formation et la disparition de ce composé caractéristique de l'avancée de la réaction de Maillard peuvent être suivies par chromatographie liquide.

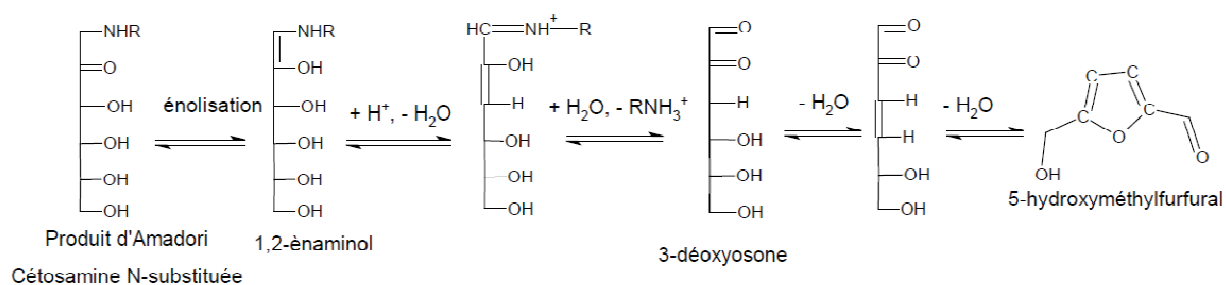


Figure 1.4 – Schéma du mécanisme de la déshydratation forte

La déshydratation modérée

Elle est favorisée en milieu alcalin ou quand l'amine liée au sucre réducteur est très basique. Dans ce cas, les produits d'Amadori/Heyns sont dégradés par énoilisation en position 2,3 formant des substances réductrices, les réductones et les désoxyréductones (figure 1.5). Ces composés peuvent ensuite réagir avec une amine secondaire pour former des polymères hétérocycliques comme les pyranones et furanones ou subir une scission hydrolytique et produire des cétones, des aldéhydes et des acides parfois odorants et volatils.

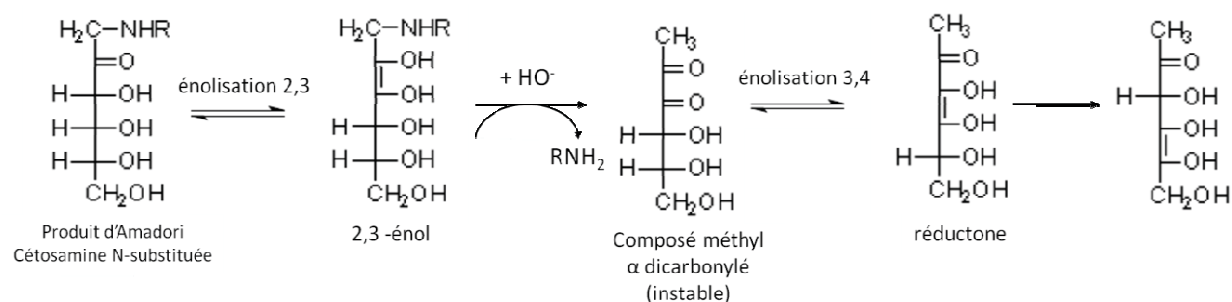


Figure 1.5 – Schéma du mécanisme de la déshydratation modérée

Les composés α -dicarbonylés sont capables de réagir à nouveau avec un acide aminé et entraîner sa dégradation (dégradation de Stecker). Cette réaction est autocatalytique, en effet, les réductones réagissent avec les acides aminés selon le même schéma que la réaction initiale de la réaction de Maillard (figure 1.6). Cette réaction se manifeste par un dégagement d'anhydride carbonique, par l'apparition d'un aldéhyde et, par désamination, elle régénère la réductone, augmentant considérablement le brunissement.

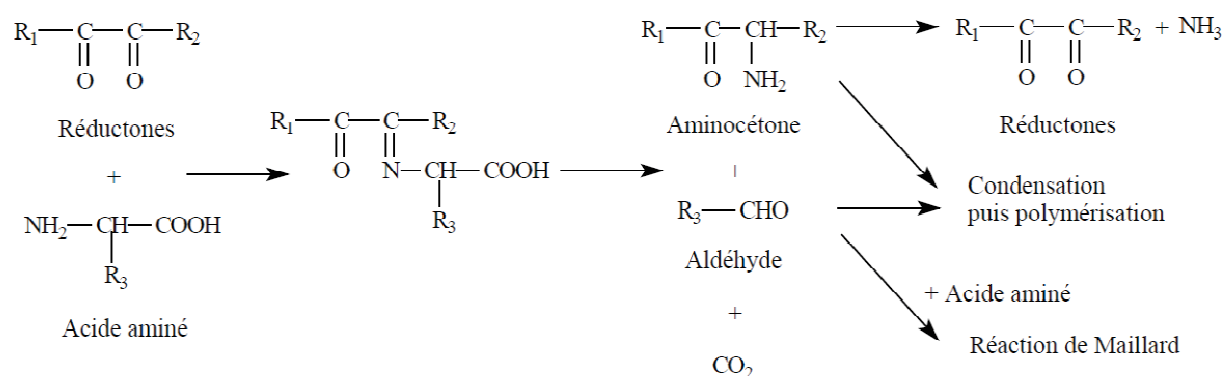


Figure 1.6 – Mécanisme de la dégradation de Stecker (R₁ – R₂ – R₃ différents radicaux)

Les réactions de scissions

Les réactions de scissions se déroulent à pH alcalin et à haute température, la coupure des aldosamines et cétosamines obtenues conduit à la formation d'une grande variété de produits de scissions.

Phase tardive :

Lors de la phase tardive, les produits avancés de la réaction de Maillard subissent des scissions donnant des produits volatils et odorants ou des polymérisations (par condensation aldolique) formant des pigments bruns caractéristiques de la réaction de Maillard : les mélanoïdines. La structure et la formation des mélanoïdines ne sont pas encore bien connues.

Toutefois, dans le cas des protéines de soja, Lan *et al.* (2010) ont montré que la réaction de Maillard entraîne la formation de composés de masses moléculaires supérieures à 1000Da par polymérisation des peptides de masses moléculaires inférieures à 1000Da et des acides aminés libres.

La structure conformationnelle de la protéine et du glucide a une influence lors de la réaction de Maillard (Hiller et Lorenzen, 2010). Ainsi les protéines globulaires entrent de façon limitée dans la réaction de Maillard du fait de leur structure compacte liée notamment à la présence de ponts disulfures, alors que les protéines linéaires entrent plus facilement dans la réaction de Maillard du fait de leur structure dépliée.

Dans les systèmes modèles, le pH apparaît comme un facteur important qui influence la structure des mélanoidines alors que la température et la durée de chauffage vont, quant à eux, dicter le poids moléculaire des mélanoidines (Wang *et al.*, 2011). Trois hypothèses sur la formation des mélanoidines de haut poids moléculaire ont été décrites dans la littérature.

La première théorie est que les structures colorées de haut poids moléculaire sont formées par polymérisation des intermédiaires de la réaction de Maillard de faibles poids moléculaires, tels que les furanes, les pyrroles et leurs dérivés (Tressl *et al.*, 1998). Ces composés, de par leur activité polymérisante, pourraient être des intermédiaires réactionnels pendant la polycondensation, rendant le poids moléculaire final des mélanoidines dépendant de la durée de chauffage.

La deuxième a été émise par Hofmann (1998). Il a postulé que les mélanoidines de haut poids moléculaire (> 100 kDa) dérivent de liaisons entre les produits intermédiaires de la réaction de Maillard avec les chaînes latérales d'acides aminés réactifs tels que la lysine, l'arginine ou la cystéine.

Enfin, une troisième théorie propose que les glucides peuvent ne pas être dégradés en hétérocycles lors de la RM et entrer directement dans la formation des mélanoidines. Cette théorie est supportée par Cämmerer *et al.* (2002) qui ont mis en évidence des structures glucidiques intactes après hydrolyse acide des mélanoidines.

1.1.2 Facteurs influençant la réaction de Maillard

La réaction de Maillard est un ensemble de réactions, principalement des réactions d'oxydation et de déshydratation, conduisant à la formation d'une kyrielle de produits dont la concentration et la composition dépendent des conditions opératoires et des réactants mis en présence.

La réaction de Maillard est influencée par des paramètres tels que la température, le pH, le temps de chauffage, l'activité de l'eau, la nature et la concentration des réactifs (sources aminées et glucides), le type et la concentration du tampon, la présence d'ions métalliques, etc. Le changement d'un de ces facteurs peut favoriser une voie de réaction, la vitesse des différentes réactions et les produits finaux (figure 1.7). Ainsi, la température et le pH sont les deux facteurs jouant un rôle prépondérant dans l'orientation de la réaction. Ces facteurs influencent la formation des arômes, du goût, de l'aspect du produit ainsi que la présence ou non de composés toxiques.

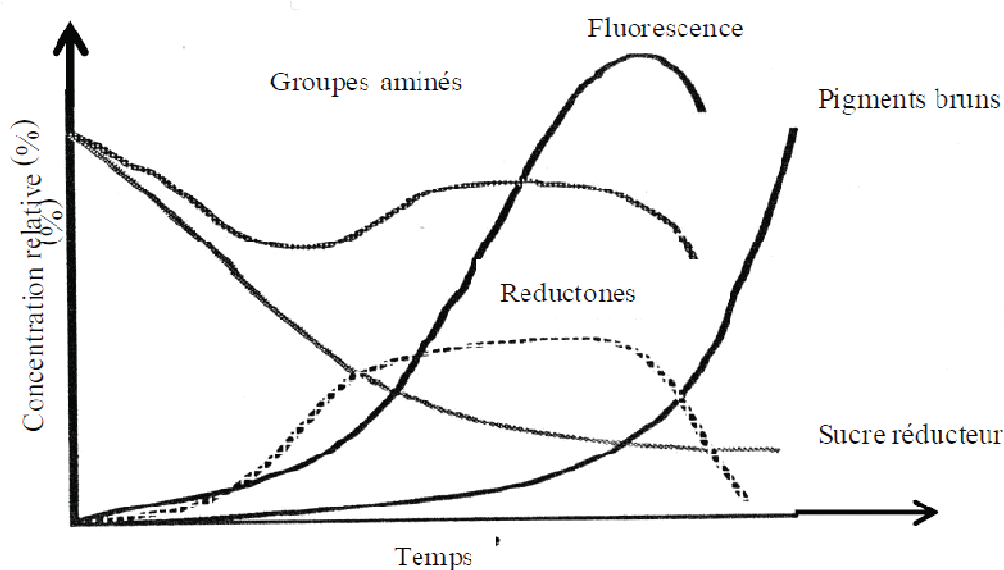


Figure 1.7 : Concentration des réactants et produits de la réaction de Maillard en fonction du temps de chauffage (d'après Davies et Labuza, 1997).

1.1.2.1 Nature des réactifs

Nature de la source aminée :

Les protéines ou les peptides impliqués dans la réaction de Maillard subissent des dommages, dus à des pertes en certains acides aminés basiques tels que la lysine, l'arginine et l'histidine. Les glucides réducteurs réagissent avec les fonctions aminées libres, dans le cas des protéines, il s'agit de l'acide aminé N-terminal et/ou les fonctions aminées latérales des acides aminés basiques. Toutefois les fonctions aminées latérales (ϵ -aminés) sont moins réactives que les fonctions aminées terminales (α -aminés).

Ajandouz et Puigserver (1999) ont montré que la thréonine est l'acide aminé le plus réactif après la lysine. Ils soulignent aussi l'influence du pH sur la réactivité des acides aminés. En effet, lorsque le pH est proche du pKa de l'acide aminé, la réactivité augmente. En fonction du type d'acide aminé, l'intensité du brunissement est différente. Ainsi, un brunissement intense lors de la réaction de Maillard est obtenu avec les acides aminés basiques auxquels s'ajoute la tyrosine alors qu'en présence de thréonine, d'acide aspartique et glutamique et de cystéine, on observe les plus faibles intensités de brunissement (Ashoor et Zent, 1984). L'importance de ces pertes en acides aminés dépend aussi de la nature du glucide intervenant dans la réaction (Alaiz *et al.*, 1997).

En plus de la composition en acides aminés, le poids moléculaire de la source protéique joue un rôle important dans la réaction de Maillard. Ainsi à masse égale, plus la source protéique est de faible poids moléculaire, plus la concentration en acides aminés libres est importante, ces différences de concentrations entraînent des changements de vitesse de réaction même si les paramètres de réaction (température, temps, ...) sont identiques (Ter Haar *et al.*, 2011).

De plus, les protéines ont une conformation propre qui peut être globulaire ou linéaire. Cette conformation influe sur la réactivité vis-à-vis de la réaction de Maillard. Ainsi les protéines globulaires sont moins réactives que les protéines linéaires car leur conformation limite voire masque certaines fonctions aminées latérales réactives (Eihorn *et al.*, 2005 ; Hiller et Lorenzen 2010).

Nature des glucides

La réactivité des glucides est liée à leur forme acyclique en solution. La forme acyclique correspond à la forme active des sucres, c'est-à-dire qu'ils peuvent réagir avec les groupements aminés. Les sucres les plus réactifs sont les pentoses (ribose, Xylose, arabinose) suivis des hexoses (mannose, fructose et Glucose), puis des diosides et enfin les polysaccharides (Buera *et al.*, 1987 ; Laroque *et al.*, 2008).

En milieu aqueux, Guan *et al.* (2006) ont montré que la vitesse de réaction entre un disaccharide (lactose ou maltose) et des protéines de soja est 30 fois supérieure à celle d'un polysaccharide, le Dextran, en utilisant des conditions similaires de glycation.

De même, Li *et al.* (2009b) ont montré qu'en milieu liquide, dans les mêmes conditions de réaction, le degré de substitution des acides aminés libres est deux fois supérieur en présence de monosaccharide (Glucose ou lactose) qu'en présence d'un polysaccharide (maltodextrine ou Dextran).

Toutefois peu d'études comparent la réactivité des sucres simples et des polysaccharides.

Les différences de réactivité entre les glucides simples (mono et disaccharides) et complexes (oligo et polysaccharides) peuvent être dues à différents facteurs tels que le poids moléculaire du glucide et la proportion de forme acyclique/cyclique. Seule la forme acyclique est réactive vis-à-vis de la réaction de Maillard en raison de la présence d'une fonction réductrice. En milieu aqueux, les deux formes cycliques et acycliques sont présentes et la proportion de l'une par rapport à l'autre dépend principalement de la stabilité de la forme cyclique.

Cette stabilité est en premier lieu thermique. Ainsi, plus la température du milieu est élevée, plus la proportion de forme acyclique augmente. Toutefois la stabilité, principalement dans le cas des oligo et des polysaccharides, est fonction du poids moléculaire de la molécule. L'augmentation du nombre d'unités glucidique entraîne une augmentation de la stabilité thermique et donc une diminution de la réactivité (Oliver *et al.*, 2006 ; Corzo-Martinez *et al.*, 2010).

La stabilité de la forme cyclique est en second lieu conformationnelle. En fonction du glucide, les groupements hydroxyles s'orientent différemment, de ce fait il peut se créer des encombrements et des tensions stériques entre groupements hydroxyles du même côté du cycle

provoquant le passage à la forme acyclique plus stable. C'est le cas notamment pour le Xylose dont la forme acyclique est plus stable que la forme cyclique (Laroque *et al.*, 2008).

Le deuxième facteur est le poids moléculaire des glucides. Celui-ci intervient à deux niveaux : la mobilité moléculaire et l'encombrement stérique.

Bien qu'intervenant dans la proportion de forme cyclique/acyclique, le poids moléculaire régit la diffusion des molécules dans le milieu réactionnel. Plus les molécules sont mobiles dans le milieu réactionnel, plus celle-ci sont réactives (Acevedo *et al.*, 2006). Dans le cas des glucides simples, la différence de mobilité entre un pentose et un hexose est faible mais, dans le cas des oligo et polysaccharides, cette mobilité devient un facteur clé.

Pour une protéine ou un peptide, il peut exister plusieurs sites réactionnels pour la réaction de Maillard. Dans le cas de glucides de faible poids moléculaire, plusieurs molécules peuvent réagir avec une protéine ou un peptide. Toutefois, dans le cas des oligo et polysaccharides, la glycation d'une molécule peut entraîner soit un encombrement stérique limitant la glycation d'autres polysaccharides, soit masquer un second site réactionnel. Ces deux hypothèses sont corroborées par différents auteurs (Kato, 2002 ; Li *et al.*, 2009b ; Xu *et al.*, 2010 ; Ter Haar *et al.*, 2011).

1.1.2.2 Température et durée de chauffage

La température et la durée de chauffage sont deux paramètres qui interviennent sur la cinétique de réaction ainsi que sur les produits formés. Une augmentation de la température entraîne une augmentation de la réactivité entre les glucides et les groupements aminés libres, notamment en augmentant les formes acycliques – et donc réactives – des glucides (Yaylayan, 1997 ; Martins *et al.*, 2001).

Cette augmentation de réactivité est dépendante de la gamme de températures utilisées. Il peut y avoir formation, dès 45°C, de produits monocycliques et de produits hétérocycliques. Ainsi, même à cette température, les conditions thermodynamiques sont favorables à la formation et à la polymérisation des cycles et à l'évolution vers la synthèse des mélanoïdines (Georgescu *et al.*, 1998). Ames *et al.* (2001) ont identifié et quantifié les principaux composés volatils issus de la réaction de Maillard entre la cystéine et le Glucose ou le Xylose. Ces auteurs montrent que pour

un même pH, plus la température de réaction est importante, plus la concentration en composés volatils augmente et ce, pour tous les composés identifiés.

L'augmentation du temps d'incubation n'entraîne pas, dans tous les cas, une augmentation de la glycation des protéines. Ainsi Aminlari *et al.* (2005) montrent qu'il y a plus de molécules de Dextran glyquées au caséinate après 48h de chauffage à 60°C qu'après 72h. Ces différences peuvent être liées à la décomposition des composés d'Amadori au cours de la réaction de Maillard. Le même phénomène a été montré par Brands et Van Boekel (2002) entre la caséine et des disaccharides.

Les températures élevées, bien qu'elles accélèrent les vitesses de réactions, favorisent aussi la production de composés toxiques comme l'acrylamide. Ce composé est produit et dégradé en partie lors de la réaction de Maillard, l'augmentation de la température accélère les vitesses de formation/élimination de l'acrylamide. La voie prédominante de formation de ce composé est consécutive à l'interaction entre l'asparagine et les glucides réducteurs à des températures supérieures à 100°C (De Vleeschouwer *et al.*, 2009a) .

La réaction de Maillard se produit également à faible température. Ainsi, une diminution du pourcentage de fonctions aminées libres présentes dans des poudres de lait stockées à 37°C peut être observée. Cette diminution est liée aussi à l'activité de l'eau de la poudre et au temps de stockage. Ainsi une diminution de 60% des fonctions aminées libres est atteinte après 50 jours de stockage pour une a_w de 0.47 contre 150 jours pour une a_w de 0.85.

La réaction de Maillard a aussi lieu dans le corps humain. Cette réaction provoque une altération irréversible des protéines fonctionnelles. Ces dommages ne sont pas seulement impliqués dans les mécanismes de vieillissement « naturel » mais aussi dans les mécanismes de maladies liées à l'âge telles que le diabète, l'athérosclérose et les maladies neurodégénératives. Ces réactions ont lieu au niveau cellulaire à température modérée (37°C).

La réaction de Maillard au niveau cellulaire et son impact sur les cellules dépendent de paramètres physiologiques tels que le renouvellement des protéines, les concentrations en Glucose cellulaire ainsi que les mécanismes d'élimination des produits de la réaction de Maillard *in vivo* (Tessier, 2010).

1.1.2.3 pH

Au cours de la réaction de Maillard on observe une diminution du pH du fait de la production d'acides organiques de plus faible pKa (parmi lesquels l'acide formique et acétique) ainsi que la perte en acides aminés basiques. De plus, de nombreuses réactions se développant au cours du brunissement non-enzymatique sont dépendantes du pH et on remarque une diminution des vitesses de réactions avec l'acidification du milieu (Brands and Van Boekel, 2002).

L'initiation de la réaction de Maillard est favorisée par un pH alcalin, augmentant ainsi la nucléophilie du composé aminé (Ames, 1988 ; Ajandoux et Puigserver, 1999). Néanmoins, les vitesses de réactions ne sont pas uniquement dépendantes du pH, d'autres paramètres réactionnels rentrent également en jeu. Le pH a une forte influence sur les mécanismes réactionnels, notamment la voie réactionnelle prépondérante lors de la phase avancée, le type de composés intermédiaires et les produits finaux. Ainsi Martins *et al.* (2005) ont montré qu'à pH inférieur à 6, les composés majoritaires de la réaction de Maillard entre le Glucose et la glycine sont les composés d'Amadori et que la baisse du pH augmente la formation de 5-hydroxyméthylfurfural. Les auteurs montrent notamment que la constante de réaction de fabrication des mélanoidines est fortement dépendante du pH.

Cette influence sur les composés formés au cours de la réaction de Maillard en fonction du pH a été montrée par d'autres auteurs. Ainsi, les pH acides, par le mécanisme de la déshydratation forte, favorisent la formation de furfural, de 5-hydroxyméthylfurfural, de méthional ou de composés sulfurés (Yalayan, 1990 ; Ames *et al.*, 2001 ; Martins *et al.*, 2005), tandis que les pH alcalins favorisent la voie de la déshydratation modérée qui entraîne la formation de pyrazines.

1.1.2.4 Activité de l'eau et humidité relative

La réaction de Maillard est dépendante de la teneur en eau du milieu réactionnel. Dans le cas de réaction de Maillard en milieu liquide on parle d'activité de l'eau (a_w) et, dans le cas de réaction de Maillard en milieu sec, d'humidité relative (RH).

L'activité de l'eau est un facteur majeur de la réaction de Maillard, car l'eau joue à la fois le rôle de réactif et de matrice mais est aussi un des nombreux produits de cette réaction. Une teneur en eau trop élevée est néfaste car elle entraîne une dilution des substances réactives et une trop faible teneur en eau ne permet pas aux réactants de se rencontrer. L'idéal pour un bon développement des réactions de Maillard correspond à des produits ayant une a_w intermédiaire ($0,7 < a_w < 0,8$) (Ames, 1988).

Lorsque la réaction de Maillard se déroule en milieu sec, on ne parle plus d'activité de l'eau mais d'humidité relative. De la même façon qu'en milieu liquide, il existe une humidité relative optimale pour les réactions en milieu sec. Cette humidité relative va contrôler la mobilité moléculaire des réactifs et donc l'étendue de la réaction de Maillard (White et Bell, 1999).

Pan et Melton (2007) ont réalisé des réactions de Maillard en milieu sec à 60°C entre le caséinate et le lactose pour des humidités relatives (RH) allant de 29% à 95%. Ils montrent que la dégradation des produits d'Amadori augmente avec le temps d'incubation quelle que soit l'humidité relative utilisée, néanmoins cette dégradation est plus importante pour des humidités relatives comprises entre 50% et 75%. Dans la littérature, lorsque la réaction de Maillard est conduite en milieu sec, l'humidité relative utilisée est généralement comprise entre 60% et 80% (Scaman *et al.*, 2006 ; Wooster et Augustin, 2006 ; Medrano *et al.*, 2009)

1.1.2.5 Rôle des sels

Bell (1997) a démontré que le type de tampon et sa concentration avaient un effet sur la réaction de Maillard, aussi plus le tampon a une concentration élevée, plus la réaction est à un stade avancé.

Guérard *et al.* (2007) ont montré que lors de la réaction de Maillard, en milieu aqueux, entre un hydrolysate de crevette et le ribose, le brunissement est multiplié par 16 entre une réaction en milieu non tamponnée et une réaction dans du tampon phosphate 0,5M, pH 6,5.

Cette augmentation d'activité peut être expliquée par la double activité catalytique du tampon phosphate : l'anion phosphate serait capable de donner et d'accepter simultanément un proton nécessaire pour la conversion en dicétopipérazine dans la réaction de Maillard (Bell et Wetzel, 1995). L'ion phosphate agirait de deux façons au niveau de la réaction nucléophile entre une amine et un carbonyle : il catalyserait le réarrangement d'Amadori/Heyns et augmenterait la proportion de la forme acyclique des glucides en solution (Watkins *et al.*, 1987).

L'activité catalytique des ions phosphates pourrait aussi être due à un mécanisme intramoléculaire (figure 1.8). Ainsi Rizzi (2004) suppose que l'addition de XO_2^- sur le groupement réducteur d'un glucide oriente la fonction $X=O$ dans une position favorable au piègeage d'un proton du carbone α du glucide. Ce piègeage entraîne l'énolisation (voie A) ou sa déshydratation (voie B).

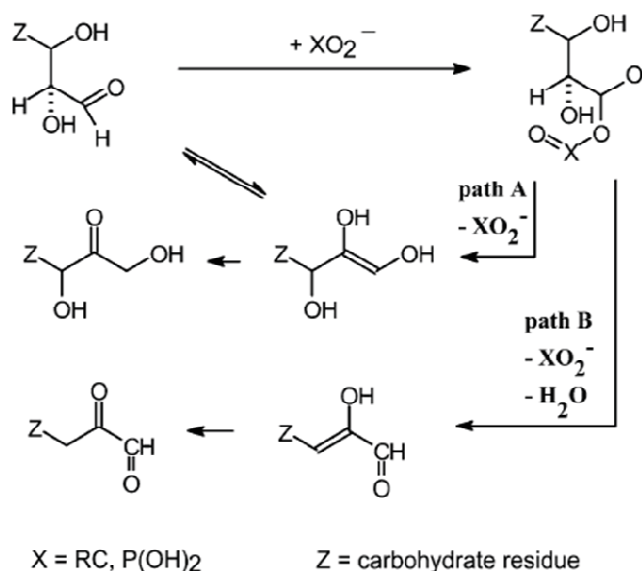


Figure 1.8 : Réaction des aldoses en présence d'anions polyatomiques (d'après Rizzi, 2004).

Lors du chauffage en milieu sec des solutions réactionnelles, les protéines et/ou les glucides pourraient se phosphoryler. Cette phosphorylation serait susceptible d'augmenter la réactivité de la réaction de Maillard en milieu sec. En effet Li *et al.* (2004, 2009a, 2010) ont montré que la présence de phosphate lors du chauffage de protéines ou de peptides basiques en milieu sec peut entraîner une phosphorylation. Une fois la phosphorylation achevée, la répulsion due aux charges négatives introduites par le phosphate tendrait à provoquer un déplissement des protéines. Ce déplissement exposerait à la réaction de Maillard des groupements aminés masqués par la conformation de la protéine.

1.1.2.6 Milieu sec/milieu liquide

En présence de glucides simples, la réaction de Maillard est souvent menée en milieu liquide à des températures variables (allant de 4°C à 200°C). Toutefois en présence de polysaccharides, le milieu liquide semble ne pas offrir les meilleures conditions de glycation.

Selon Kato (2002), les glycoconjugués issus de la réaction de Maillard, entre un polysaccharide et une protéine, peuvent être obtenus efficacement par incubation des poudres lyophilisées à 60°C sous des humidités relatives de 65% à 79% dans des dessiccateurs. Dans ces conditions, la réaction entre les groupements α -aminés et les groupements carbonyles des polysaccharides est accélérée par la faible activité de l'eau.

En milieu sec, tout comme en milieu liquide, la présence de tampon phosphate augmente le brunissement en présence de glucide simple. Les forts taux de brunissement en milieu sec, ne sont pas seulement dus à la catalyse de la condensation de Maillard (première étape de la réaction), comme dans le cas des solutions. Ainsi, il semblerait que le tampon phosphate catalyserait aussi les réactions des étapes suivantes, dont le réarrangement d'Amadori (Bell *et al.*, 1998).

Kawai *et al.* (2005) proposent un modèle pour la réaction de Maillard en milieu sec (Figure 1.9), entre le Glucose et la lysine. Ce modèle prend en compte le type de matrice du milieu sec. Cette matrice est un composé ajouté au mélange avant lyophilisation (disaccharide, polymère) et qui sert de support inerte à la réaction. Selon eux, le taux de réaction de Maillard dans une matrice polymère est supérieur à celui d'une matrice disaccharidique. En effet, lors de l'utilisation de disaccharides comme support inerte, des liaisons hydrogènes se créent entre la matrice et les réactants limitant leur mobilité et donc la réaction de Maillard, ce qui n'est pas le cas lors de l'utilisation d'une matrice polymère. Ainsi la matrice polymère n'empêche pas la mobilité et la rencontre des molécules et donc permet une réaction de Maillard plus importante.

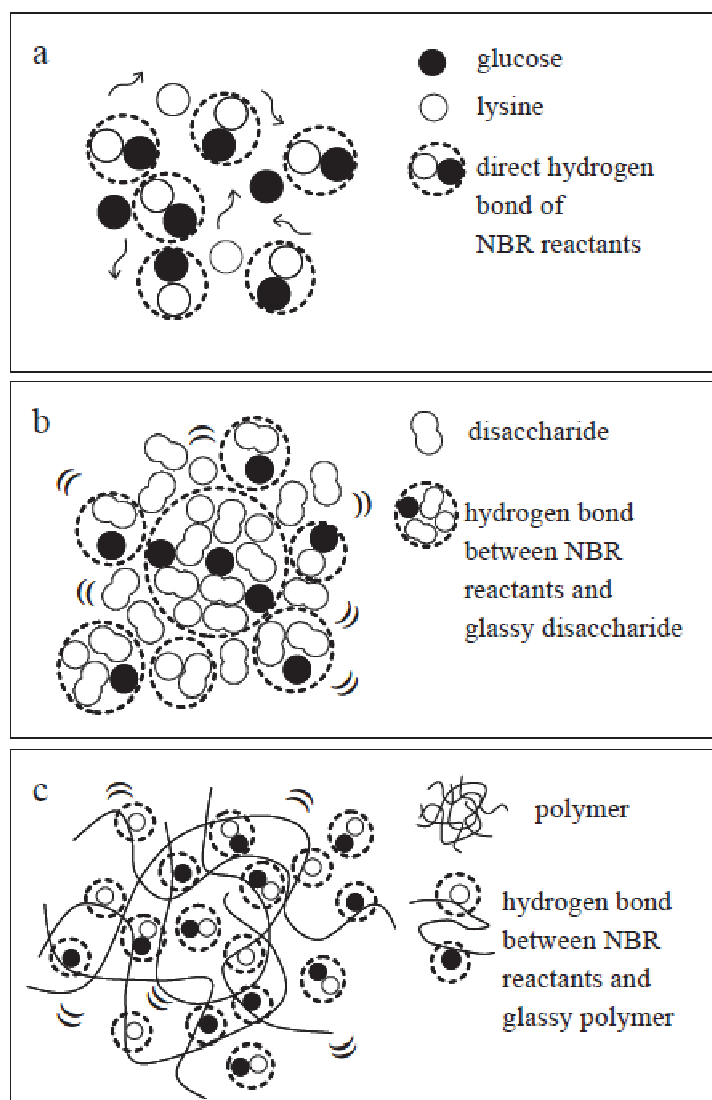


Figure 1.9 – Modèle de la réaction de maillard dans différentes matrices sèches (a : sans matrice, b : matrice dissacharidique et c : matrice polymère) (d'après Kawai *et al.* 2005).

Toutefois, dans cette approche les composants de la matrice sont des supports inertes n'intervenant pas lors de la réaction de Maillard. En utilisant des oligosaccharides ou des polysaccharides à la place des polymères, d'autres interactions peuvent intervenir et la matrice devient réactive.

1.1.2.7 Autres facteurs

D'autres facteurs que ceux précités peuvent aussi influencer sur la réaction de Maillard que ce soit en tant que réactifs, catalyseurs ou encore procédés de chauffage.

L'acide ascorbique, la vitamine K, les orthophénols, les arômes naturels et les produits de l'oxydation des lipides peuvent intervenir comme substrats de la réaction de Maillard puisqu'ils

possèdent des fonctions carbonylées (Hidalgo *et al.*, 1999). Ces réactions entre lipides oxydés (notamment les produits secondaires) et les composés aminés génèrent, par des mécanismes complexes, la formation de nombreux produits parmi lesquels des composés de faible et de haut poids moléculaire.

Les ions métalliques (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) peuvent former au cours de la réaction de Maillard des complexes avec différents produits, oxyder les composés d'Amadori et leurs dérivés et catalyser d'autres interactions entre les composés. Ramonaityté *et al.* (2009) ont réalisé une étude sur l'influence de la concentration et du type d'ions métalliques présents au cours du chauffage d'un mélange glycine/lactose sur le brunissement et la chélation des métaux. De manière générale, ils observent que la présence d'ions métalliques dans le mélange diminue la période d'induction du brunissement, ce qui est en accord avec les travaux de Rendleman et Inglet (1990). Toutefois, en fonction du métal utilisé, l'influence sur le brunissement est différente. En effet, la présence de cuivre à 1mg/ml augmente le brunissement pendant toute la durée du chauffage ; à l'inverse, la présence d'une concentration de 5mg/ml de cuivre entraîne une inhibition du brunissement par rapport au contrôle (mélange sans métal). Le même comportement, à des concentrations plus élevées, est observé pour le zinc. Cet effet inhibiteur serait expliqué par la capacité des groupements amines, carboxyles ou hydroxyles à chélater les métaux diminuant ainsi la propagation de la réaction de Maillard dans les mélanges, lorsque les ions métalliques sont en forte concentration.

En revanche, dans le cas du Fer, le taux de brunissement augmente dès le début du chauffage et on observe un effet dose positif, c'est-à-dire que plus la concentration en fer est importante, plus le brunissement l'est aussi. Dans ce cas, c'est l'influence redox des ions métalliques libres qui augmente la réaction de Maillard et c'est la capacité à servir de métal de transition pour différentes étapes de la réaction de Maillard qui est mise en exergue.

Le mode de chauffage peut aussi influencer la réaction de Maillard. Ainsi Guan *et al.* (2006) ont montré que les vitesses de disparition des groupements amines libres dans des systèmes réactionnels aqueux chauffés dans un bain marie étaient 6 à 7 fois plus faibles, dans le cas du lactose et du maltose et 57 fois plus faibles dans le cas du Dextran, que lorsque le système était chauffé par cycles au micro-onde.

D'autres techniques pour la promotion de la réaction de Maillard ont récemment été montrées. L'utilisation de rayon gamma (Chawla *et al.*, 2009) sur des concentrats protéiques de lait entraîne la réaction de Maillard. L'impact de l'intensité de la radiation sur la réaction de Maillard a été mesurée par absorbance à 284 nm (composés intermédiaires de la réaction) et 420nm (composés bruns). Ainsi plus la dose de radiation gamma est importante, plus la production de composés intermédiaires et bruns augmente.

L'utilisation de champ électrique pulsé est une méthode non-thermique utilisée principalement pour tuer les microorganismes pathogènes. Guan *et al.*, (2010) ont montré que l'utilisation de champ électrique pulsé entre l'albumine et le Dextran accélère la réaction de Maillard (composés intermédiaires et brunissement) comparativement au mélange chauffé à 30°C.

1.2 Propriétés tensioactives, émulsifiants, émulsions

1.2.1 Tension superficielle

La tension superficielle (ou de surface) est liée à la force existant à la surface d'un liquide due à la cohésion des molécules du liquide qui s'oppose à la rupture de la surface. Lorsque deux phases non miscibles se superposent, ce phénomène est à l'origine d'une tension interfaciale. Pour permettre de disperser les deux phases l'une dans l'autre, et donc créer une émulsion, il faut alors apporter une énergie extérieure au système, par exemple, par agitation ou ultrasons. (Le Neindre, 1993). La valeur de la tension interfaciale dépend de différents paramètres tels que la nature et les propriétés des phases (propriétés rhéologiques, interfaciales, force ionique), la température, la présence de substance tensioactives, et l'hydrodynamique du système. Plus la température augmente, plus les molécules sont mobiles et donc plus la tension interfaciale diminue.

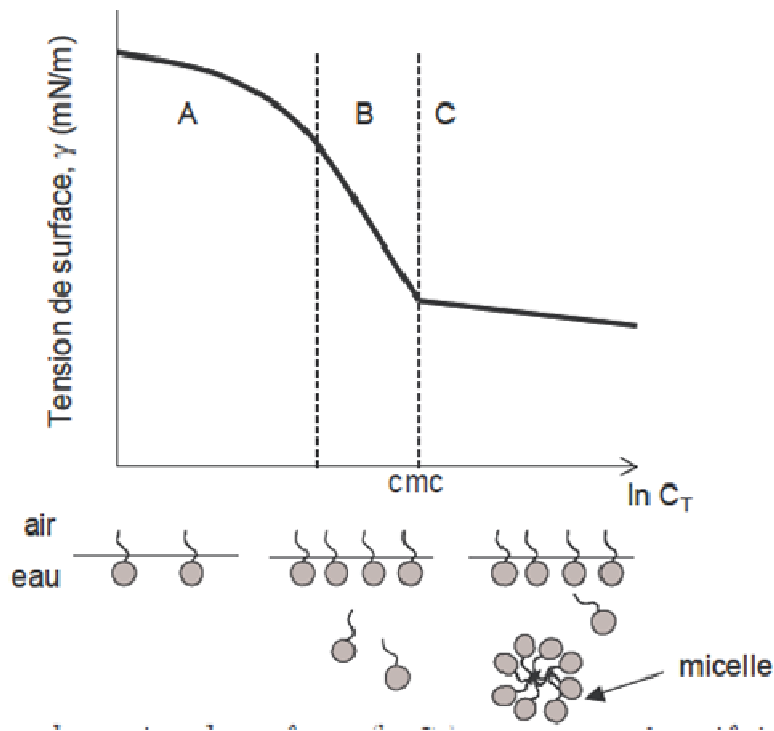


Figure 1.10 : Isotherme de tension de surface pour un tensioactif simple (d'après Monteux, 2004).

La figure 1.10 représente l'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration d'un tensioactif simple en solution. Pour les faibles concentrations (partie A), les molécules s'orientent aux interfaces mais il reste une forte portion de surface non couverte. Avec l'augmentation de la concentration, la tension de surface diminue linéairement (partie B) ce qui signifie que le nombre de molécules adsorbées reste constant. L'interface est proche de la saturation en tensioactifs. A partir d'une certaine concentration, appelée concentration micellaire critique (CMC), la diminution de la tension de surface est beaucoup plus faible (partie C). La surface est totalement saturée et les molécules de tensioactifs forment désormais des micelles dans la solution.

1.2.2 Les émulsifiants

1.2.2.1 Les différentes classes d'émulsifiants

Les émulsifiants peuvent être de différentes origines : naturelle (phospholipides, protéines,...) ou synthétique (lécithine,...) mais aussi de différents types : anionique (Sodium dodécyl sulfate), cationique (sels d'ammonium) amphiphile, ou encore non-ionique (Tween) auxquels s'ajoutent les émulsifiants utilisés sous forme de particules solides (émulsions de Pickering)

Il existe, au niveau alimentaire, deux grands types d'émulsifiants : ceux de faibles poids moléculaires (comme la lécithine) et les biopolymères de poids moléculaires plus importants, dont font partie les protéines. Ces molécules sont indispensables au procédé d'émulsification, de par leur rôle stabilisant mais aussi car ils influencent le type de dispersion H/E ou E/H.

La première catégorie regroupe les émulsifiants ioniques, nonioniques et amphotères (cas des phospholipides). Ils peuvent aussi être caractérisés par leur habilité à se dissoudre soit dans la phase aqueuse ou dans la phase huileuse caractérisée par la valeur HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) de Griffin. Elle est calculée grâce au rapport entre la proportion de groupements hydrophiles et la longueur de la chaîne lipophile. Cette valeur permet de classer les surfactants par hydrophilie croissante. Pour des valeurs de HLB inférieures à 9, on parle d'émulsifiants lipophiles et pour des valeurs comprises entre 11 et 20, d'émulsifiants hydrophiles (Brochette, 1999).

Le deuxième groupe comprend les protéines qui, par leur caractère amphiphile, ont tendance à se placer aux interfaces huile/eau et à s'y adsorber. C'est pourquoi elles sont utilisées comme stabilisants des émulsions alimentaires.

Ces émulsifiants vont avoir des effets stabilisant différents : les répulsions stériques vont prédominer dans le cas des émulsifiants de hauts poids moléculaires alors que ceux de faibles poids moléculaires vont engendrer majoritairement des répulsions électrostatiques (Brochette, 1999).

1.2.2.2 Les propriétés d'un émulsifiant

Les agents émulsifiants tels que les molécules de faible poids moléculaires (Low Molecular Weight Emulsifier – Fig.1.11) ou des molécules de plus haut poids moléculaire (biopolymer, protein, polysaccharides Fig. 1.11) jouent à la fois un rôle dans la fabrication mais aussi dans la stabilisation des émulsions (Bos et Van Vliet, 2001). Le point commun de ces composés est leur caractère amphiphile, c'est-à-dire qu'ils possèdent à la fois un caractère hydrophile et hydrophobe. Ils se caractérisent ainsi par :

- La capacité des molécules à s'adsorber aux interfaces.
- Leur capacité à diminuer les tensions interfaciales
- Leur capacité à changer de conformation pendant et après l'adsorption
- L'épaisseur de la couche interfaciale.
- Les interactions entre les molécules adsorbées.

La vitesse de migration des tensioactifs vers l'interface est aussi un critère important pour leur efficacité.

Ces caractéristiques et leurs conséquences à l'échelle interfaciale sont résumées dans la figure 1.11 (d'après Rodriguez Patino *et al.*, 2008).

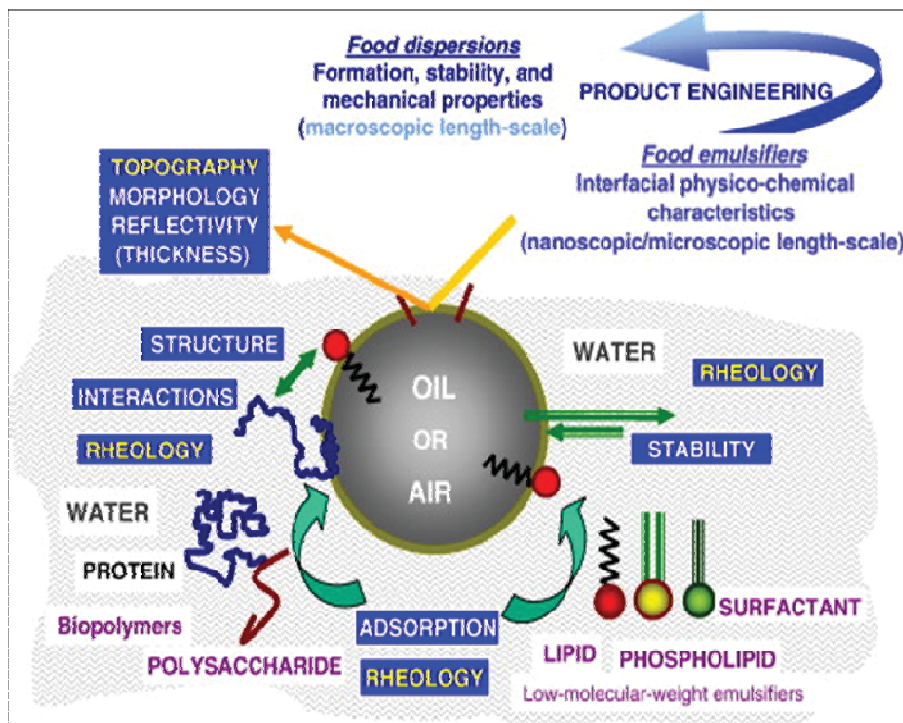


Figure 1.11 – Caractéristiques interfaciales physico-chimiques des émulsifiants alimentaires (d'après Rodriguez Patino *et al.*, 2008)

La plupart des agents émulsifiants sont capables de diminuer les tensions interfaciales diminuant ainsi l'énergie nécessaire à l'émulsification. Les agents émulsifiants de faibles poids moléculaires sont plus efficaces que les biopolymères pour abaisser les tensions interfaciales et leur vitesse d'adsorption est généralement plus rapide.

Une fois adsorbés aux interfaces, la conformation des biopolymères, spécialement celle des protéines, peut changer radicalement, s'apparentant dans certains cas à une dénaturation. Cette modulation de conformation des biopolymères limite fortement les phénomènes de désorption des interfaces. Dans le cas des protéines, ce phénomène n'intervient que dans le cas de compétition avec d'autres biopolymères. En présence d'une faible concentration de surfactants, la stabilité des émulsions diminue, ce qui entraîne la désorption des protéines par compétition (Wilde *et al.*, 2004)

La présence de biopolymères aux interfaces entraîne une épaisseur de la couche interfaciale plus importante qu'en présence de surfactant. Une couche interfaciale épaisse, en plus de promouvoir les répulsions stériques, peut généralement être assimilée à un film viscoélastique qui diminue la mobilité des gouttelettes. Cette épaisseur est amplifiée d'une part par la taille des biopolymères et d'autre part par la formation de liaisons non-covalentes (Bos et Van Vliet, 2001).

1.2.3 Le caséinate de sodium

Le caséinate de sodium est une protéine utilisée fréquemment dans l'industrie alimentaire pour ses propriétés émulsifiantes. Ces caractéristiques moléculaires et propriétés émulsifiantes ont été aussi décrites abondamment dans la littérature scientifique (Dickinson and Golding, 1997a ; 1997b ;McClement, 2004).

Les bonnes propriétés émulsifiantes du caséinate peuvent être attribuées à l'amphiphilie des différentes caséines qui le constituent notamment l' α et la β -caséine ainsi qu'à leur structure linéaire. Ces monomères existent en solutions en tant que chaînes linéaires désordonnées ayant une charge négative nette à pH neutre (Dickinson et Golding 1998). En effet, il s'adsorbe rapidement aux interfaces et se réorganise pour former une couche protéique interfaciale. A pH

neutre cette couche entraîne des répulsions à la fois stériques et électrostatiques stabilisant les gouttelettes et prévenant les phénomènes de floculation et crémage (Dickinson et Golding, 1997)

Une diminution de la stabilité au crémage peut se produire dans des émulsions contenant du caséinate en excès, c'est-à-dire que les interfaces sont saturées en protéines et qu'il y a des protéines dans la phase aqueuse. La présence de ces protéines dans la phase aqueuse peut entraîner une floculation par déplétion des gouttelettes possédant une couche de protéines adsorbées et le caséinate non-adsorbé présent dans la phase aqueuse. Dans ce cas un temps d'induction du crémage peut être observé (Dickinson et Golding, 1997 ; Manoj *et al.* 1998).

A l'inverse, une faible concentration en caséinate peut aussi entraîner une déstabilisation des émulsions. Dans ce cas, des molécules de caséinates peuvent s'adsorber sur deux gouttelettes adjacentes provoquant une déstabilisation par pontage et donc un crémage accéléré.

La présence de certains éléments, comme des cations divalents, peut perturber les propriétés fonctionnelles du caséinate de sodium. L'addition ou la présence de calcium (Ca^{2+}) peut provoquer la déstabilisation des émulsions contenant du caséinate par diminution de la charge négative nette des protéines adsorbées diminuant ainsi les répulsions électrostatiques. De plus, la liaison d'ions divalents avec les protéines adsorbées diminue l'épaisseur de la couche interfaciale diminuant de ce fait les répulsions stériques. Les ions divalents peuvent aussi se lier à deux molécules différentes provoquant la floculation par pontage. (Dickinson et Golding, 1998)

1.2.4 Les hydrolysats issus de produits marins

L'hydrolyse enzymatique des protéines marines génère un mélange d'acides aminés libres, et de di - , tri - et oligopeptides, ce qui augmente le nombre de groupements polaires et la solubilité de l'hydrolysate par rapport à la protéine native. De ce fait, les caractéristiques fonctionnelles des protéines sont modifiées (Kristinsson et Rasco, 2000). Ainsi, de nombreuses études ont montré que l'hydrolyse enzymatique de protéines issues de co-produits marins, si elle n'est pas trop poussée, permet la fabrication de composés ayant de propriétés technofonctionnelles intéressantes.

Gbogouri *et al.* (2004) ont montré que l'hydrolyse enzymatique de protéines de tête de saumon par l'Alcalase entraîne la production de peptides plus solubles que les protéines natives.

En outre, plus l'hydrolyse est poussée, plus la solubilité est augmentée sur toute la gamme de pH. Quand aux propriétés émulsifiantes, les hydrolysats de faible degré d'hydrolyse ont une capacité émulsifiante importante alors qu'une hydrolyse extensive entraîne une perte de ces propriétés. Ce phénomène peut s'expliquer par une adsorption rapide aux interfaces des petits peptides (poids moléculaires inférieurs à 2,5kDa) mais ils présentent une plus faible efficacité pour réduire les tensions interfaciales et pour se déplier ou se réorienter aux interfaces comme les peptides de plus haut poids moléculaire. Lee *et al.* (1987) ont suggéré que pour qu'un peptide présente de bonnes propriétés émulsifiantes, il faut qu'il soit constitué d'au moins 20 acides aminés.

Des résultats comparables ont été obtenus avec des protéines de Selar (Klompong *et al.*, 2007), de carcasses de cabillaud (Šližytė *et al.*, 2009), d'œufs de carpe indienne (Chalamaiah *et al.*, 2010) ou de Brèmes (Nanilanon *et al.*, 2011). Tous ces auteurs supposent que les petits peptides ne sont plus assez amphiphiles pour avoir de bonnes propriétés émulsifiantes. En effet, si l'hydrolyse est trop poussée, l'équilibre entre les zones hydrophobes et hydrophiles du peptide est rompu.

1.2.5 Les émulsions

1.2.5.1 Définition d'une émulsion

Une émulsion est un système hétérogène comprenant au moins un liquide immiscible dispersé dans un autre sous forme de gouttelettes. Les deux phases ou liquides formant les émulsions sont appelés symboliquement eau (E) et huile (H). De tels systèmes se caractérisent par une stabilité minimale. La persistance de l'état dispersé est accrue par la présence d'additifs tels que les tensioactifs et agents émulsifiants. Ces molécules, en s'adsorbant aux interfaces, entraînent une organisation et un maintien de l'émulsion.

La fabrication d'une émulsion nécessite un apport d'énergie qui permet de déformer et de rompre les gouttelettes, augmentant ainsi l'aire interfaciale entre les deux phases. Cette énergie correspond à l'énergie nécessaire pour rompre les liaisons faibles existant entre les molécules d'une même phase. Elle est apportée par des procédés mécaniques (agitation) ou non mécaniques (injecteurs, valves d'homogénéisation, sonication). L'énergie à apporter au système dépend de nombreux paramètres : les tensions et propriétés interfaciales, les propriétés

rhéologiques des deux liquides, l'hydrodynamique du système (turbulent ou laminaire) , la présence de tensioactifs (Poux et Canselier, 2004 ; Brochette, 1999), et les conditions du milieu (salinité, pH).

Caractéristiques des émulsions

Il est possible de caractériser une émulsion suivant différents paramètres : type, qualité de la dispersion, stabilité et éventuellement propriétés rhéologiques. On caractérise le type d'une émulsion par ces deux phases. Ainsi dans une émulsion, on dit que la phase présente sous forme de gouttelettes dispersées est la phase dispersée ou interne, tandis que la phase qui constitue le milieu dans lequel les gouttelettes se trouvent en suspension est dite phase continue ou externe. On distingue donc deux types d'émulsions : les émulsions huile dans eau (H/E) où la phase continue est la phase aqueuse et les émulsions eau dans huile (E/H) où la phase continue est la phase huileuse.

Il existe des émulsions simples ou des émulsions multiples. Les émulsions multiples sont souvent désignées par e/H/E ou h/E/H. Il s'agit d'une émulsion constituée de petites gouttelettes de phase continue, elles-mêmes dispersées dans des gouttelettes de phase dispersée, comme le montre la figure 1.12. Le type d'émulsion créé dépend principalement de la formulation et du procédé de fabrication.

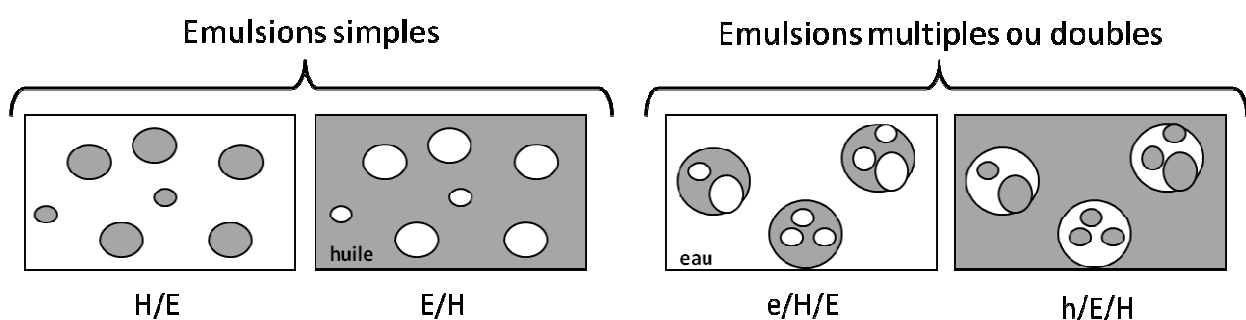


Figure 1.12 : Les différents types d'émulsions

La prédiction du type d'émulsion peut être lue sur une carte de formulation-composition (figure 1.13) qui tient compte à la fois du ratio entre la phase huileuse et la phase aqueuse (composition du système) mais aussi de la formulation (HLD). La valeur HLD traduit la somme des contributions des composants du système.

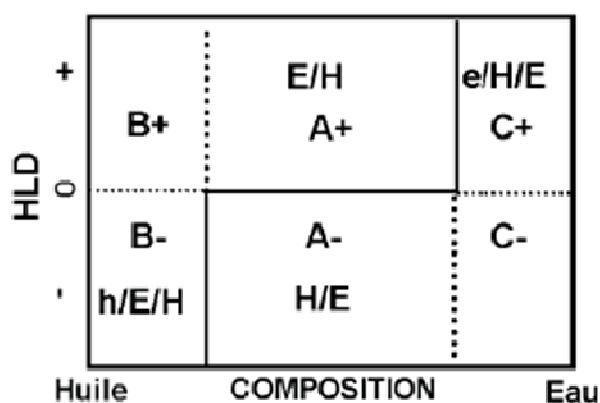


Figure 1.13 : Carte bidimensionnelle de formulation - composition (d'après Salager, 2000)

Dans les zones B+ et A+ de la Fig. 1.13, l'affinité de l'émulsifiant est plus marquée pour la phase huileuse favorisant les émulsions type eau dans huile. En revanche, dans la zone C+, la quantité d'eau est importante, entraînant la formation d'émulsions multiples de type e/H/E. L'analyse est similaire pour la partie inférieure du diagramme (zone -), en considérant que dans ce cas, l'émulsifiant a une affinité plus marquée pour la phase aqueuse.

Le trait en gras représente la ligne d'inversion standard. La traversée de ce trait, de manière horizontale ou verticale, implique un changement du type d'émulsion, c'est-à-dire le passage d'une émulsion eau dans huile à une émulsion huile dans eau ou inversement.

1.2.5.2 Mécanismes de stabilisation physico-chimiques d'une émulsion

Les émulsions sont des systèmes dispersés métastables. La stabilité dans le temps d'une émulsion est alors assurée par la formulation, qui entraîne un ralentissement ou une inhibition des mécanismes physiques qui conduiront inéluctablement à la séparation des deux phases immiscibles. Quatre processus de stabilisation se mettent en œuvre afin de permettre d'accroître la stabilité dans le temps : rhéologique, stérique, électrostatique et électrostérique (Brochette, 1999).

La théorie DLVO

L'un des mécanismes sur lequel repose les phénomènes de stabilisation et de déstabilisation, plus particulièrement les phénomènes de floculation et de coagulation, est expliqué par la théorie énoncée par Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek (DLVO). Selon cette

théorie, les gouttelettes sont soumises à deux forces : les forces attractives (négatives) de Van der Waals, et les forces répulsives (positives) de nature électrique.

Lorsque deux gouttes chargées se rapprochent, un potentiel de répulsion électrique apparaît. L'énergie globale d'interaction provient de la somme de l'énergie d'attraction et de l'énergie de répulsion, comme le montre la figure 1.14.

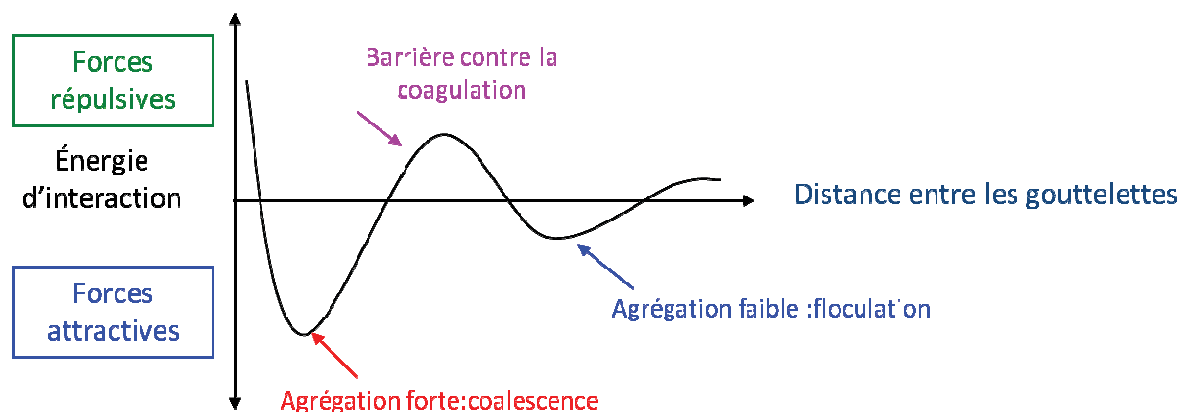


Figure 1.14 – Energie potentielle résultant de la théorie DLVO (d'après Rodriguez Rojas, 2007)

Le premier minimum de la courbe, à courte distance, correspond à une très forte agrégation des particules : la coagulation, ce phénomène est irréversible. Dans cette hypothèse les forces de répulsions sont négligeables. Le deuxième minimum de la courbe, pour une longue distance, correspond au processus de floculation, le minimum étant peu profond et les agrégations peu résistantes permettent avec un faible cisaillement de l'émulsion une séparation facile.

Pour une distance intermédiaire, il existe un potentiel positif, qui constitue une barrière contre la coagulation, s'il est suffisamment élevé par rapport à l'agitation thermique.

Stabilisation rhéologique

La stabilisation rhéologique vise à incorporer des additifs tels que les agents viscosants ou certains tensioactifs pour augmenter la viscosité de la phase continue. Cela permet de limiter la mobilité des gouttelettes au sein de la phase continue diminuant ainsi la probabilité de chocs. Cette méthode limite les phénomènes de crémage et de floculation (Osmond *et al.*, 1975 ; Vincent, 1974 ; Brochette, 1999).

Stabilisation stérique

La stabilité stérique consiste à ajouter des macromolécules non-ioniques, telles que des polymères amphiphiles qui vont s'adsorber à l'interface des gouttelettes formant ainsi une couche macromoléculaire à la surface de celles-ci. Ces couches créent une barrière physique qui augmente la distance entre les gouttelettes.

Stabilisation électrostatique

Dans un milieu aqueux les particules acquièrent une charge électrique en surface qui dépend de leur structure, de la présence de groupements ionisables et/ou de l'adsorption sélective d'ions présents dans le milieu. Il apparaît alors une charge superficielle, positive ou négative selon le pH du milieu. Les ions avec une charge de signe opposé à celle de la particule (contre-ions) vont se concentrer autour de sa surface tandis que les ions avec la charge de même signe (co-ions) seront repoussés vers l'extérieur. Loin de la surface des particules, la concentration en ions positifs et négatifs est la même, ce qui conduit à un milieu électriquement neutre. Cette distribution non-homogène est appelée double couche électrique ou couche de Stern.

Lorsque deux particules chargées se rapprochent, chacune avec sa charge ionique un potentiel de répulsion électrostatique est créé. L'adsorption à la surface des gouttelettes de telles particules permet de créer une charge non nulle près de l'interface et la répulsion correspondante.

La présence de sels dans le système augmente la force ionique ce qui provoque une diminution de la portée des répulsions et peut entraîner des phénomènes d'agrégation.

Ces deux mécanismes de stabilisation des émulsions sont résumés dans la figure 1.15.

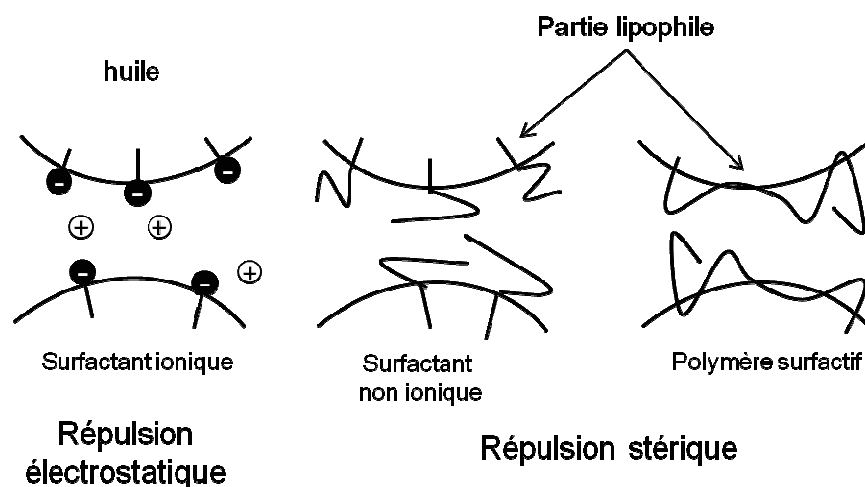


Figure 1.15 : Exemple de deux cas de répulsion entre deux gouttes (d'après Allouche, 2003)

Stabilisation électrosterique

Il s'agit d'une combinaison des deux effets expliqués précédemment, provoquée par des macromolécules présentant des groupements ioniques distribués dans la chaîne principale ou dans les ramifications. Ces molécules apportent un effet stérique (stabilisation à courte portée) et un effet électrostatique (stabilisation à longue portée) à la gouttelette.

1.2.5.3 Mécanismes de déstabilisation physico-chimiques d'une émulsion

Au cours du temps une émulsion évolue invariablement vers la séparation des deux phases qui la constitue ; les mécanismes de déstabilisation d'une émulsion peuvent être répartis en deux catégories (Brochette, 1999), schématisées sur la figure 1.16 :

- La première regroupe les phénomènes de migration des gouttes et met en jeu des phénomènes réversibles : floculation, sédimentation et crémage.

- La seconde concerne la variation de la taille des gouttes, consistant en des processus irréversibles : coalescence, mûrissement d'Ostwald ou inversion de phase.

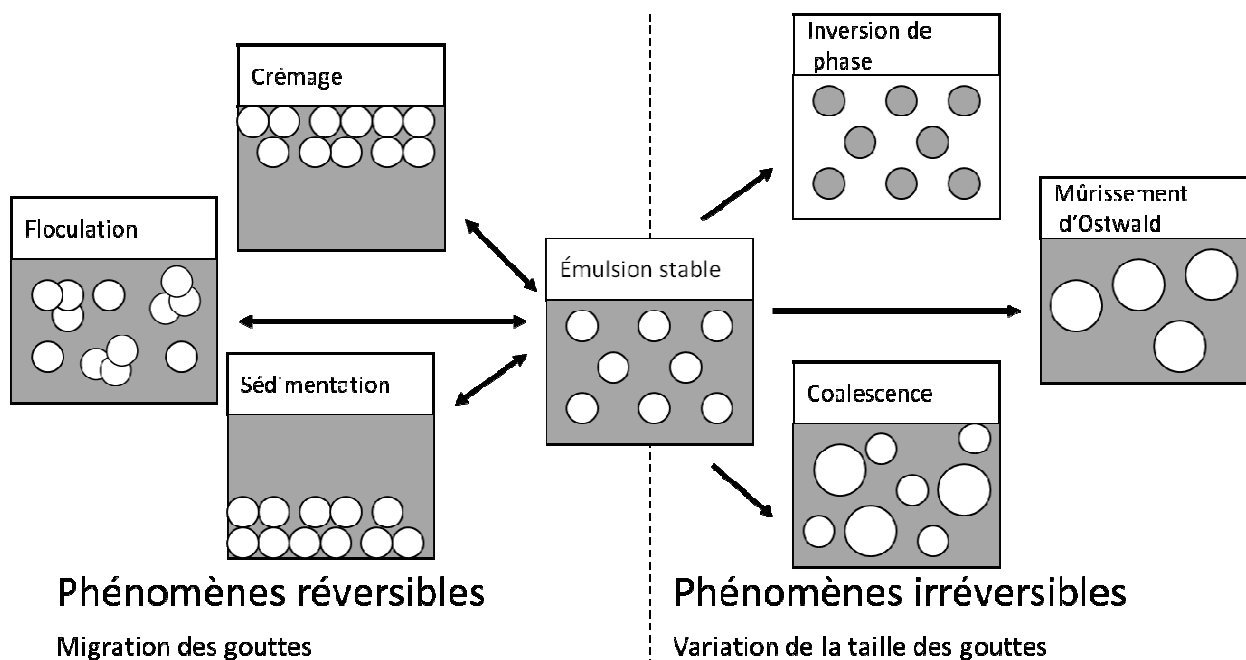


Figure 1.16 – Phénomènes d'instabilité des émulsions (d'après Tadros, 2004)

Phénomènes réversibles

Le crémage et la sédimentation

La sédimentation et le crémage résultent du même phénomène, dont le moteur est la pesanteur. Dans la mesure où le système est nécessairement en équilibre cinétique, une goutte de la phase dispersée est animée de mouvements browniens induits par les molécules de solvant (Van Aken *et al.*, 2003). La même goutte est soumise au champ de pesanteur qui tend à imposer un mouvement vers le bas si la goutte est plus dense que la phase continue ou vers le haut dans le cas contraire.

Soit une goutte, de masse m et de rayon r , plongée dans une phase continue de viscosité η , soumise au champ de pesanteur, la vitesse limite (v) est alors atteinte quand les forces de frottement de la goutte sur le fluide constituant la phase continue sont compensées par la force de pesanteur. Cette vitesse est la vitesse de sédimentation ou de crémage.

$$v = \frac{mg}{6\pi\eta r}$$

avec : v = vitesse de sédimentation ou de crémage (m.s^{-1})

m = masse de la gouttelette (g)

η = viscosité de la phase continue (Pa.s)

r = rayon de la gouttelette (m)

g = accélération de la pesanteur terrestre (m.s^{-2})

D'après Manoj *et al.* (1998) il existe deux types de crémage. Le crémage de type I correspond à une émulsion opaque à la base de l'échantillon pendant une période significative pendant qu'une couche concentrée en crème se développe dans la partie supérieure de l'échantillon. Ceci est retrouvé dans les descriptions de Robins (2000) qui explique que, notamment dans le cas d'émulsion dont les gouttelettes sont polydisperses, il y a un front de séparation diffus entre l'émulsion et la couche concentrée en surface.

Le crémage de type II correspond à un front de séparation net entre l'émulsion et le sérum. Ces émulsions sont dites « simples », les gouttelettes sont monodisperses et hautement chargées ou recouvertes d'un bon surfactant. Les gouttelettes se repoussent entre-elles et crèment comme des particules individuelles et ce, à la même vitesse (Robins, 2000).

Robins (2000) propose un troisième type de crémage quand la fraction volumique est importante et où il y a des fortes interactions de déplétion, l'émulsion forme une structure de réseau qui peut être décrite comme un gel de particules. Le front de séparation est généralement limpide et l'évolution de l'émulsion comporte trois étapes : i) une phase de latence sans mouvement visible, ii) une augmentation linéaire du front jusqu'à la crème, et iii) une compaction de l'émulsion entre la phase liquide et la phase crème.

La floculation.

La floculation intervient quand les gouttelettes formées ne restent pas indépendantes. Il y a donc agrégation des gouttes, sous forme de grappe, sans fusion. Ce phénomène est précurseur de la sédimentation/crémage des grappes ainsi formées. La floculation est soumise à trois principaux mécanismes :

- La force de Van der Waals qui tend à rapprocher les gouttelettes entre elles.
- Un mécanisme de déplétion, qui est induit en présence de micelles ou de polymères dans la phase continue. Quand deux gouttes se rapprochent, les particules initialement réparties dans tout le volume de la phase continue n'accèdent plus à l'espace entre les gouttes. Dans cette zone de phase continue, il y a une augmentation de la pression osmotique qui favorise un flux de liquide de la zone séparant les deux gouttes vers le reste de la phase continue. L'accolement des gouttes est donc favorisé (figure 1.17). L'importance de ce phénomène augmente avec le volume de la goutte.

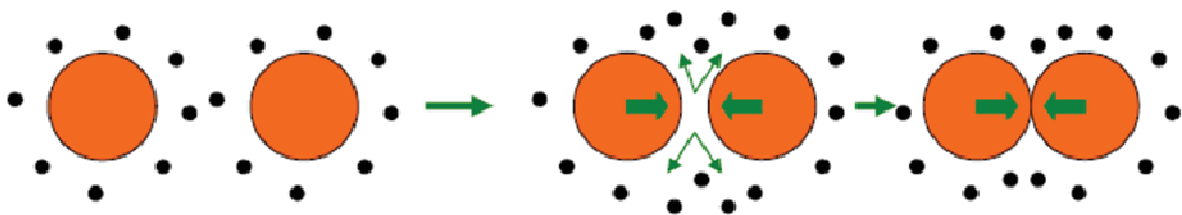


Figure 1.17 – Floculation par déplétion

- Un mécanisme par pontage entre les gouttes. Ce phénomène est provoqué par l'adsorption de macromolécules utilisées pour promouvoir la stabilité stérique. Si les polymères choisis sont trop longs (*i.e.* possèdent un haut poids moléculaire), il existe un risque que ces polymères s'adsorbent sur plusieurs gouttes simultanément en réalisant un pontage entre gouttes. Ce pontage favorise du même coup la floculation que l'on cherche à éviter (figure 1.18).

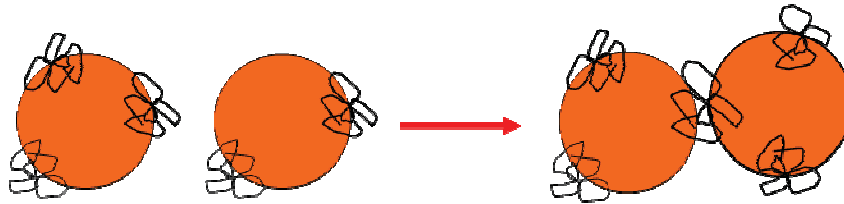


Figure 1.18 – Flocculation par pontage

Selon Dickinson (1998), ces différents phénomènes de flocculation peuvent être entraînés par:

- Une diminution du pH vers le point isoélectrique des protéines
- Une augmentation de la force ionique
- Une diminution de la qualité du solvant pour les protéines adsorbées.
- La déplétion des molécules adsorbées du fait de la présence d'autres molécules non adsorbées.

Les propriétés des émulsions flocculées varient considérablement du fait de la grande variété des types de mécanismes de flocculation et des forces d'interactions gouttelettes-gouttelettes. Toutefois, dans le cas des émulsions flocculées, un front de séparation net correspondrait à une migration des floccs à la même vitesse ce qui impliquerait une répartition monodisperse des floccs. Ainsi, Dickinson et Golding (1998) expliquent que dans les émulsions stabilisées par la caséine, si la concentration substantielle en protéine non adsorbée dans le milieu est importante, il se produit une flocculation par déplétion induite par les sub-micelles de caséine non adsorbées.

Phénomènes irréversibles

Le mûrissement d'Ostwald.

A l'issue de l'émulsification, si la population de gouttelettes est polydisperse, il existe une pression de Laplace (P) différente entre gouttelettes. Plus la gouttelette est petite, plus cette pression est importante. L'existence de cette surpression implique que le potentiel chimique (μ) dans les petites gouttes est plus élevé que dans les grosses. Le retour vers l'équilibre thermodynamique s'accompagne d'un flux de matière des petites vers les grosses gouttes

dépendant de la solubilité partielle de l'huile dans l'eau. Ce flux entraîne une modification de la granulométrie du fait de la disparition des classes de petites tailles (Kabalnov *et al.*, 1987).

La coalescence.

La coalescence est le phénomène de dégradation ultime des émulsions (figure 1.19). C'est l'inverse de l'étape de dispersion : deux ou plusieurs gouttes vont fusionner pour former une goutte plus grosse (Van Aken *et al.*, 2003). Le processus se répétant, la phase dispersée se sépare et l'on revient au système diphasique initial. Tous les phénomènes qui favorisent le rapprochement des gouttelettes placent le système dans une situation à priori favorable à la coalescence.

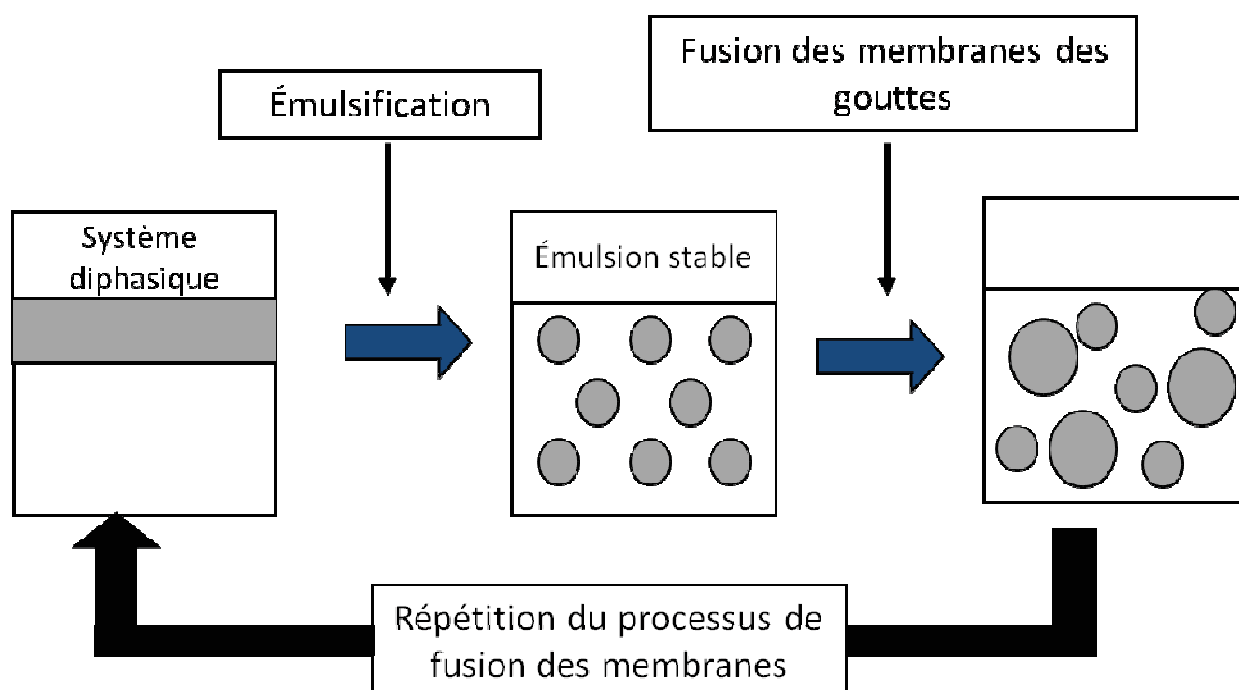


Figure 1.19 : Processus de coalescence

Effet de la concentration en tensioactifs

La teneur en émulsifiant va influencer sur le crémage, la floculation et la coalescence des émulsions. Lorsque la teneur en protéine est trop faible, les émulsions présentent un fort taux de floculation qui s'accompagne d'une coalescence partielle (une protéine stabilise plusieurs gouttelettes). Il existe une concentration optimale d'émulsifiant qui permet le recouvrement total des interfaces entraînant la stabilité de l'émulsion (Brochette, 1999).

1.2.6 Mesures et évaluation des propriétés émulsifiantes

Il existe plusieurs méthodes pour évaluer les propriétés émulsifiantes d'un produit. Elles peuvent être cependant combinées afin d'évaluer les relations structure-fonction de l'émulsifiant.

1.2.6.1 Mesure par absorbance

La mesure de la turbidité des émulsions, par absorbance à 500nm, a été développée par Pearce et Kinsella (1978). La turbidité de l'émulsion, révèle selon ces auteurs l'habilité de l'émulsifiant à s'adsorber aux interfaces huile-eau et les stabiliser. Ainsi, ils supposent que la capacité à stabiliser les interfaces est liée à la surface couverte par les émulsifiants et la stabilité d'une émulsion dépend de la constance de la surface couverte au cours du temps.

Les mesures d'absorbances sont réalisées sur des échantillons dilués dans du sodium dodécyle sulfate (SDS) (0,1%). Le prélèvement de l'émulsion se fait au fond du récipient contenant l'émulsion.

Il en découle deux relations qui permettent de déterminer l'index d'activité émulsifiante (EAI) et l'index de stabilité des émulsions (ESI). Plus l'EAI est important plus l'émulsifiant est considéré comme bon et plus l'ESI est important plus l'émulsion est considérée comme stable.

$$EAI (m^2 \cdot g^{-1}) = \frac{2 * 2,303 * A_{500nm}}{\varphi C}$$

Avec : φ la fraction de phase dispersée (%)
C la concentration en protéines (g.ml⁻¹)

$$ESI (min) = \frac{A_0 * t_x}{A_x - A_0}$$

Avec : A_0 absorbance à t_0
 t_x = temps de mesure (min)
 A_x = absorbance au temps x

1.2.6.2 Mesures rhéologiques

La rhéologie peut être utilisée pour comprendre le comportement et la structure des émulsions. Elle permet d'obtenir des informations sur l'émulsion telles que la viscosité apparente qui peut être reliée par exemple à la fraction volumique de phase dispersée présente dans l'émulsion, voire mettre en évidence une floculation, ou encore si l'émulsion est monodisperse ou polydisperse.

Tadros (2004) a réalisé une synthèse des méthodes rhéologiques utilisées pour caractériser les phénomènes de déstabilisation des émulsions. Dans le cas de crémage, l'étude de la viscosité des émulsions permet de connaître la contrainte de déformation critique (σ_{cr}) au-delà de laquelle la structure de l'émulsion se rompt. Cette contrainte est associée à une viscosité limite $\eta_{(0)}$. Pour limiter le crémage, il faut formuler l'émulsion de façon à ce que la viscosité limite soit la plus grande possible. Dans le cas de la floculation, les mesures rhéologiques peuvent être réalisées en mode permanent ou dynamique.

Les courbes d'écoulement obtenues, soit la représentation de la contrainte (τ en Pa) en fonction des taux de cisaillement appliqués (D en s^{-1}), peuvent être modélisées par des modèles connus :

- Le modèle en puissance ou modèle d'Ostwald

$$\tau = kD^n$$

Avec τ : contrainte (Pa)
 D : taux de cisaillement (s^{-1})
 K : indice de consistance ($Pa \cdot s^n$)
 n : indice d'écoulement (sans dimension)

Dans ce modèle, plus la valeur de n est faible, plus l'émulsion présente alors un comportement rhéofluidifiant. (Tadros, 2004).

- Le modèle de Bingham

$$\tau = \tau_B + \eta_{pl}D$$

Avec τ : contrainte appliquée (Pa)
 D : taux de cisaillement (s^{-1})
 τ_B : contrainte seuil (Pa)
 η_{pl} : viscosité plastique ($Pa \cdot s$)

La contrainte seuil (σ_B) et la viscosité plastique (η_{pl}) peuvent être liées à la floculation. Une augmentation d'une de ces deux valeurs indique que l'émulsion peut être floculée.

- Le modèle de Herschley-Buckley

$$\tau = \tau_B + kD^n$$

Avec τ : contrainte appliquée (Pa)
 D : taux de cisaillement (s^{-1})
 τ_B : contrainte seuil (Pa)
 k : coefficient de consistance ($Pa \cdot s$)
 n : indice de comportement

Pour les mesures en mode dynamique, un balayage en déformations ou en fréquences est généralement utilisé. Ces mesures permettent de déterminer G' (module élastique en Pa) qui correspond à l'énergie stockée et G'' (module visqueux en Pa) qui correspond à l'énergie dissipée.

Une forte floculation est généralement accompagnée d'une augmentation rapide de G' avec l'augmentation de la fréquence. Cette augmentation peut être accompagnée de la déstructuration du système.

La présence de polysaccharide dans une émulsion entraîne un croisement du module élastique (G') et du module visqueux (G'') c'est-à-dire que G'' est supérieur à G' , à de faibles fréquences, ce qui indique une structure plus organisée qui peut être attribuée à :

- La formation d'un réseau de gouttelettes hautement floculées qui entraînent un comportement viscoélastique
- La formation de structure de type gel dans la phase continue par les polysaccharides.

1.2.6.3 Suivi du déphasage

L'une des méthodes de suivi du déphasage est visuelle. Elle consiste à mesurer en volume ou en distance, le front de séparation des phases d'une émulsion placée dans une éprouvette ou tube gradué. L'évolution de ce front de séparation des phases au cours du temps peut révéler des informations sur le comportement des gouttelettes de l'émulsion ainsi que de leur répartition en taille. Ceci est dû au fait que la floculation et le crémage impliquent un réarrangement spatial des gouttelettes. Généralement le crémage est dominé par la floculation des gouttelettes

Robins (2000) décrit le comportement des émulsions en fonction de l'évolution de la hauteur de ce front de séparation des phases au cours du temps. Quatre comportements ont pu être mis en exergue, ceux-ci sont résumés dans la figure 1.20. Les deux premiers graphiques (a et b) montrent l'évolution du front de séparation des phases en fonction de la répartition de taille des gouttelettes dans l'émulsion et les deux suivants (c et d) traitent de l'état de floculation de l'émulsion.

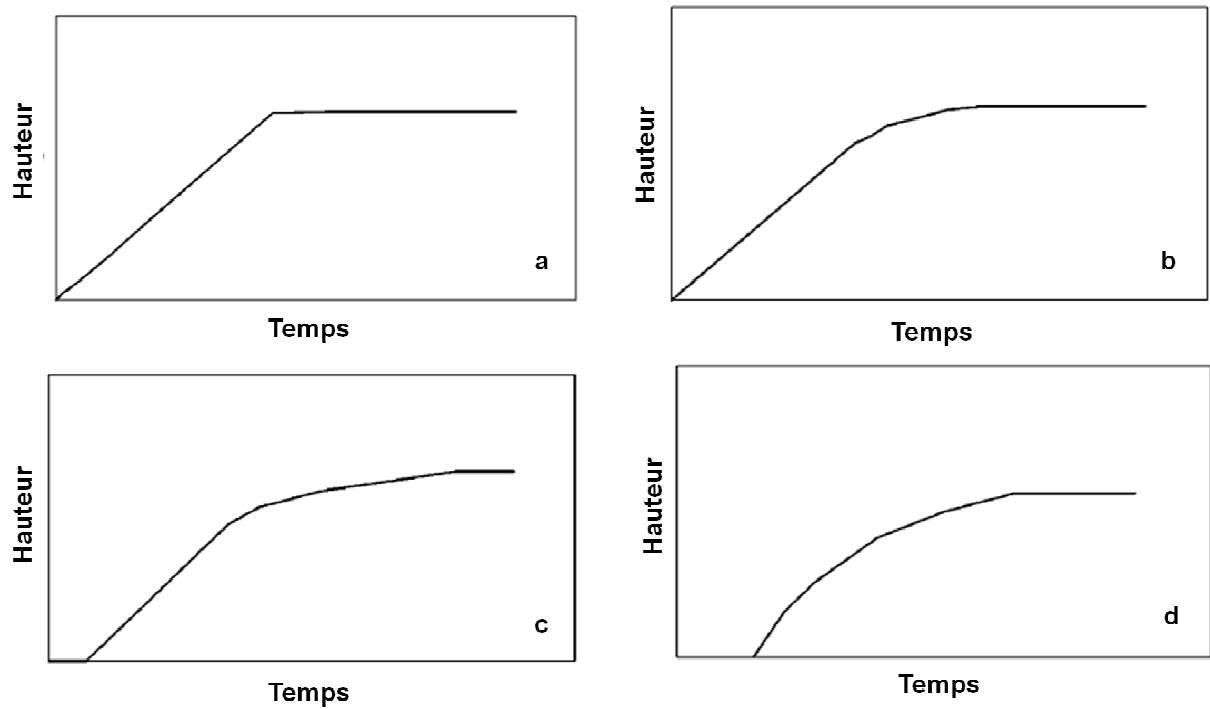


Figure 1.20 : Cinétiques théoriques du front de séparation des phases (a : émulsion monodisperse ; b : émulsion polydisperse ; c : émulsion faiblement floculée et d : émulsion fortement floculée) (d'après Robins, 2000).

La figure 1.20a représente l'évolution d'une émulsion idéale dont les gouttelettes sont monodisperses et migrent comme des particules individuelles. Ce cas peut s'expliquer soit par des gouttelettes ayant une charge nette importante, soit par des gouttelettes recouvertes d'un surfactant efficace. Le front de séparation entre la phase aqueuse et l'émulsion est net.

Dans le cas où les gouttelettes sont polydisperses, l'allure de l'évolution du front de séparation des courbes ressemble à la figure 1.20b. Le front de séparation des phases est diffus entre le sérum et l'émulsion. Ce front est difficilement visible, les gouttelettes migrent généralement selon leur taille. Dans certains cas, quand la fraction volumique d'huile est importante ou qu'il y a de fortes interactions entre les gouttelettes, il se forme dans l'émulsion une structure en réseau due à la floculation des gouttelettes d'huile. Cette émulsion peut être décrite comme un gel de particules.

Les courbes c et d de la figure 1.20 représentent des émulsions dont le déphasage se produit après un temps de retard.

Une autre manière de suivre le déphasage est une méthode par ultrason. Cette méthode se base sur la vitesse de propagation des ultrasons dans une émulsion à différentes hauteurs.

Cette méthode permet notamment de suivre des émulsions polydisperses (front de séparation de phase diffus) et de faire une détection précoce du crémage. En effet, en fonction de la taille des gouttelettes d'huile la vitesse de propagation des ultrasons est différente. La figure 1.21 présente deux graphiques typiques de cette méthode. Le graphique A présente une émulsion avec un front de séparation des phases net et le graphique B une émulsion ayant un front de séparation des phases diffus.

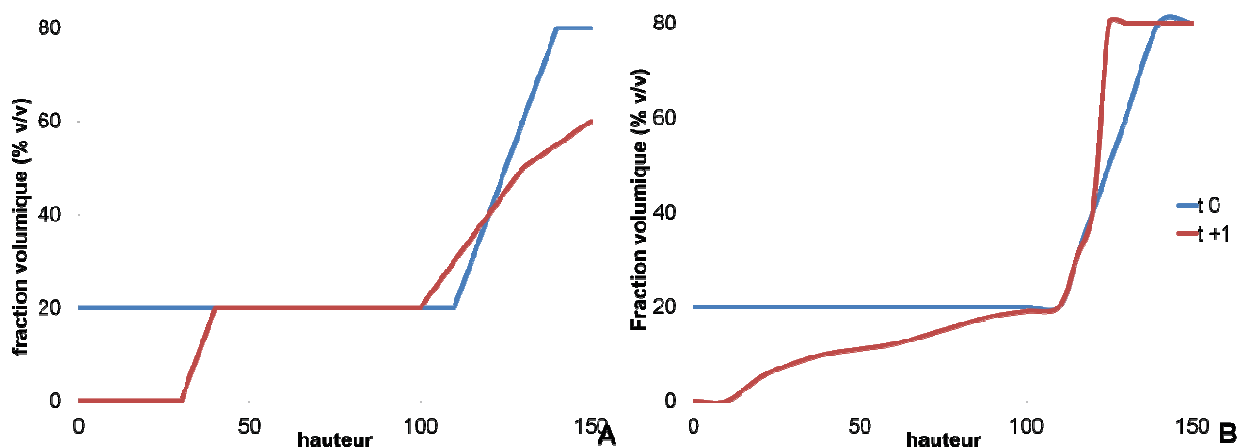


Figure 1.21 : Profil ultrason pendant le déphasage d'une émulsion avec front de séparation de phase net (A) ou avec un front de séparation de phase diffus (B) (d'après Manoj *et al.*, 1998).

Toutefois cette méthode nécessite un appareillage lourd (méthode infrarouge) ainsi qu'une répétition de la calibration entre chaque intervalle de temps.

1.2.6.4 Granulométrie laser

La granulométrie laser permet de mesurer la distribution en taille des gouttelettes dans une émulsion. Premièrement, elle permet de savoir si l'émulsion est monodisperse ou polydispersée. Deuxièmement, elle permet de connaître l'impact du tensioactif utilisé dans l'émulsion.

1.2.6.5 Méthodes microscopiques

Les méthodes microscopiques fournissent le même type d'information que la granulométrie laser. De plus elles permettent d'observer le comportement des gouttelettes entre elles comme l'apparition de flocs ou de pontage entre les gouttelettes. Ces méthodes

comprennent la microscopie : optique, électronique à balayage ou à transmission, confocale à balayage laser, et à force atomique.

La microscopie à force atomique permet de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. Le principe se base sur les interactions entre l'échantillon et une pointe montée sur un microlevier. La pointe balaie (scanne) la surface à représenter, et l'on agit sur sa hauteur selon un paramètre de rétroaction. Un ordinateur enregistre cette hauteur et peut ainsi reconstituer une image de la surface. Cette méthode permet d'observer les molécules individuelles adsorbées sur une interface et donc de comparer leur mobilité et leur organisation aux interfaces (McClements, 1999).

Les émulsions, de part la présence d'une phase grasse, sont sensible aux réactions d'oxydation des lipides. Ces oxydations lipidiques provoquent des altérations physico-chimiques qui ont des conséquences entre autre sur la stabilité des émulsions, leurs propriétés organoleptiques. Il est donc nécessaire de protéger les émulsions contre l'oxydation.

1.3 Origines biologiques des processus oxydatifs et mécanismes de défenses

Tout organisme vivant produit des espèces radicalaires qui sont pro-oxydantes. Leur quantité est régulée par l'organisme car elles sont hautement réactives, réagissant avec toute une série de substrats biochimiques (enzymes, protéines, ADN, ...) et provoquant des dommages sur l'organisme mais elles possèdent aussi des fonctions bénéfiques (signaux intercellulaires, défense contre les agents infectieux,...) (Valko *et al*, 2007). Il existe donc un équilibre entre la production et le piégeage des substances radicalaires. Lorsque cet équilibre est rompu, on parle de stress oxydant. La réaction de Maillard en milieu contrôlée peut produire des substances ayant un pouvoir antioxydant. Les mécanismes impliqués sont divers tels que le piégeage des radicaux libres ou la chélation des métaux induisant l'oxydation. Ce chapitre vise à mettre en évidence les principaux mécanismes du stress oxydant ainsi que les mécanismes antioxydants qui y sont associés.

1.3.1 Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Un radical libre, ou substance pro-oxydante, est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Ces substances sont produites dans l'organisme au cours du métabolisme normal (figure 1.22).

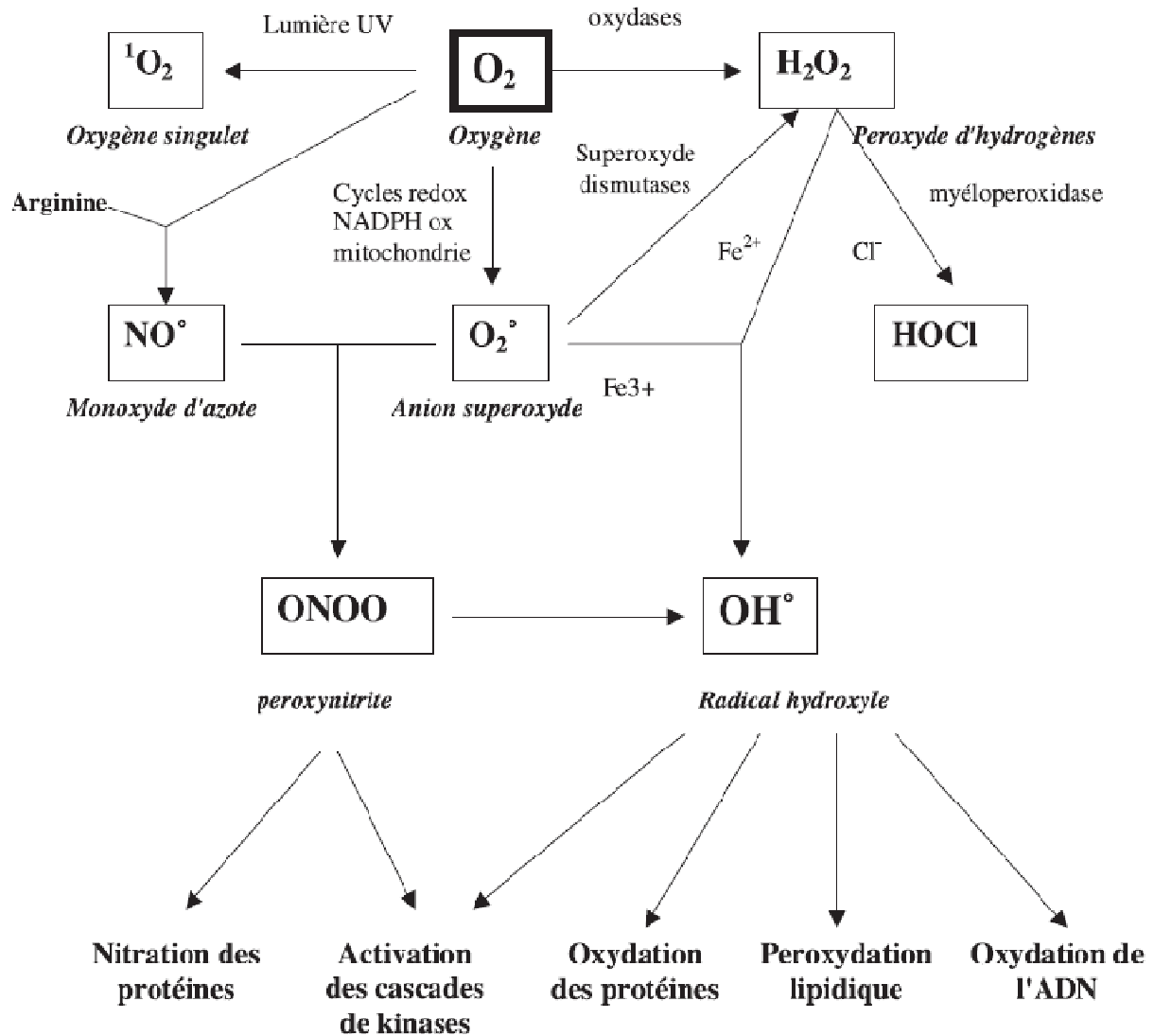


Figure 1.22 : Origine des différents radicaux libres et espèces réactives impliqués dans un organisme biologique (d'après Favier 2003).

Dans la plupart des cas, les radicaux libres sont issus de l'oxygène, on parle alors d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). L'oxygène, bien qu'il soit un élément indispensable au bon fonctionnement des organismes vivants, est aussi le principal générateur de substances radicalaires. En effet, la respiration mitochondriale, dont le dioxygène (O_2) est le dernier accepteur d'électron, est un système présentant des failles. Ces failles, notamment la réduction incomplète du dioxygène en eau, génèrent des espèces réactives de l'oxygène : les radicaux libres. La

première espèce réactive de l'oxygène est l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Ce radical est peu réactif mais il est à l'origine de plusieurs autres ERO plus nocives. Celles-ci sont générées par des cascades de réactions. Par exemple, sa dismutation génère le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui peut diffuser au travers des membranes biologiques.

Toutefois certains radicaux sont aussi issus de l'azote, on parle alors d'espèces réactives de l'azote (ERA). Parmi ces espèces réactives, il y a entre autre le monoxyde d'azote et le peroxydinitrite.

Ces espèces peuvent s'attaquer à différentes molécules de l'organisme telles que les lipides, les protéines et l'ADN. De plus, leur production, si elle n'est pas contrée par des antioxydants entraîne une accumulation de radicaux libres dans les cellules, responsable du vieillissement et de nombreuses pathologies.

1.3.2 La production des radicaux libres par les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Comme dit précédemment, les radicaux libres sont produits par des cascades de réaction. Ces réactions ont lieu entre les ERO et des molécules biologiques avec lesquelles elles entrent en contact. L'attaque radicalaire initie des cascades de réactions appelées généralement oxydation. Ces réactions sont généralement initiées par un composé azoté (figure 1.23). Quatre phases se succèdent et tournent en boucle dans cette réaction : l'**initiation**, la **propagation**, l'**inhibition** et la **termination**.

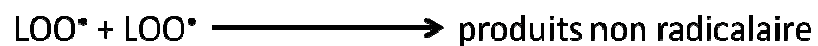
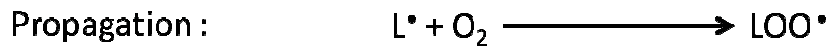
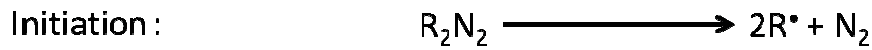


Figure 1.23 : Etapes de l'oxydation lipidique d'après Huang *et al.* (2005) (L = lipide, R = radical, A antioxydant)

L'initiation de la réaction d'oxydation lipidique est due à l'extraction d'un atome d'hydrogène d'une des doubles liaisons carbonées d'un acide gras insaturé. Le radical alkyle (L[•]) généré est oxydé en radical peroxyde (LOO[•]) qui est très instable et réactif vis-à-vis des molécules biologiques environnantes. Ce radical peut aussi réagir avec un autre acide gras produisant de nouveaux radicaux lipidiques et des peroxydes (LOOH). Les radicaux sont ensuite entraînés dans la phase de propagation. Ce processus forme une boucle de réaction jusqu'à l'interruption lors de la phase de terminaison ou lors de l'intervention d'un antioxydant provoquant l'inhibition.

La phase de propagation est caractérisée par une accumulation des peroxydes dans les cellules. Ces peroxydes peuvent poursuivre dans la voie de l'oxydation et de la fragmentation ou être interceptés par des mécanismes antioxydants. Des catalyseurs, tels que les métaux de transition comme le fer et le cuivre, peuvent intervenir dans cette phase oxydative.

La dégradation des produits de cette réaction peut entraîner soit la production de radicaux LO[•] dans le cas des peroxydes, soit la production de produits secondaires de l'oxydation.

Toutefois la phase de propagation peut être interrompue de deux manières. L'une est l'intervention d'un composé antioxydant capable de piéger un radical libre, l'autre est la formation d'un complexe stable et non radicalaire par réaction entre deux substances radicalaires.

La phase d'initiation de la réaction d'oxydation est favorisée par différents facteurs externes tels que les rayonnements UV, les radiations ionisantes, l'absorption d'oxyde d'azote, de dioxyde d'azote présent dans notre environnement ou l'ingestion d'alcool. Des facteurs internes à l'organisme comme certaines enzymes (oxydases, ...) ou la présence de nombreux métaux tels que le cuivre, le fer le cadmium (Jomova et Vlako, 2011) peuvent aussi favoriser cette phase.

1.3.3 Conséquences de la présence de radicaux libres

La production excessive de radicaux libres provoque deux types de dommages : la dégradation des aliments et des dommages oxydatifs *in vivo*.

La dégradation des aliments due à la présence de radicaux libres englobe principalement les réactions d'oxydation lipidique. Ces réactions entraînent une accumulation de produits primaires (hydropéroxydes, diènes conjugués, ...) et de produits secondaires de l'oxydation, dont les molécules volatiles responsables de l'odeur et du goût rance caractéristiques des produits alimentaires oxydés. Ces composés peuvent être détectés par chromatographie en phase gazeuse et certains peuvent devenir toxiques à haute concentration (malondialdéhyde).

De plus, ces réactions d'oxydation s'accompagnent généralement d'une modification de la couleur et de la texture des aliments. L'altération des lipides et la présence de radicaux libres pouvant s'attaquer aux protéines entraîne une perte nutritionnelle. De plus, ces réactions d'oxydation sont des réactions en chaîne qui ont tendance à s'amplifier et s'autoalimenter, et peuvent compromettre la sécurité alimentaire du produit

Il est donc important pour les industriels de contrôler et prévenir les réactions d'oxydation susceptibles d'intervenir au cours de la transformation du produit ou de la conservation de celui-ci. L'ajout d'antioxydant dans la formulation des produits permet de prolonger les durées de conservation en limitant l'apparition de radicaux libres. De plus, les modifications sensorielles, principalement l'apparition d'odeurs et de changement de couleur, peuvent influencer la perception du produit par le consommateur et donc son comportement d'achat provoquant des pertes économiques dans la filière agroalimentaire.

D'un point de vue médical, le stress oxydant est un processus accompagnant le vieillissement cellulaire normal d'un individu. Toutefois, la présence de fortes quantités d'espèces radicalaires et oxydées favorise le développement de diverses maladies telles que les maladies cardio-vasculaires, certaines formes de cancer, diabète, arthrite, les maladies neurodégénératives, la déficience immunitaire, l'inflammation cellulaire, etc. (Vlako *et al.*, 2007). En effet, les différentes molécules issues de l'oxydation peuvent modifier les protéines, perturber les activités enzymatiques, oxyder les lipides membranaires ou encore provoquer des lésions de l'acide désoxyribonucléique (ADN). L'action cumulée de ces différents mécanismes, s'ils ne sont pas enrayés au niveau cellulaire par des mécanismes de défenses, provoquent à terme la mort cellulaire.

La place de l'oxydation dans l'apparition de ces maladies peut être à la fois cause et conséquence. Les pro-oxydants interviennent par exemple dans l'activation des pro-carcinogènes ainsi que dans l'augmentation de la résistance à l'insuline.

La prévention et la lutte contre l'oxydation est à la fois un enjeu industriel mais aussi un enjeu sanitaire. Sa prévention permet de limiter les dommages et les pertes qu'elle peut engendrer. Cette prévention s'effectue grâce à des systèmes antioxydants qui peuvent être de nature endogène ou exogène. Dans le cas des systèmes exogènes, une partie peut servir dans le domaine alimentaire mais aussi dans le domaine de la santé publique.

1.3.4 Systèmes antiradicalaires endogènes et exogènes

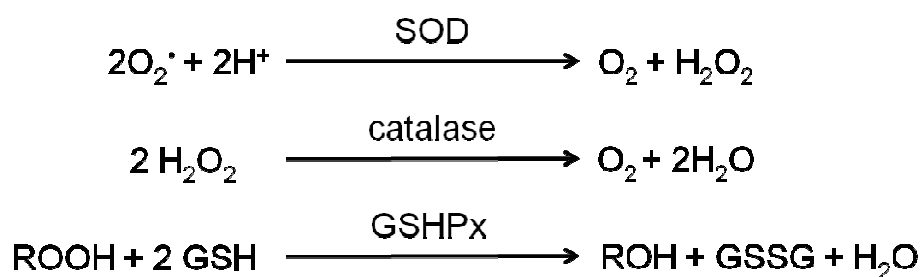
L'organisme utilise de nombreux mécanismes pour réguler la quantité de substances radicalaires. Ces mécanismes permettent de piéger les radicaux libres en captant l'électron célibataire (vitamines, caroténoïdes...) ou en détruisant les superoxydes et peroxydes (voie enzymatique). Les systèmes antiradicalaires de l'organisme se classent en deux catégories : les systèmes endogènes et les systèmes exogènes. Parmi les antioxydants intervenant dans le système exogène se trouvent beaucoup d'antioxydants alimentaires.

En agroalimentaire, un antioxydant est défini par : toute substance, synthétique ou naturelle, qui, ajoutée dans un produit prévient ou retarde sa détérioration due à l'oxygène (Huang *et al.*, 2005).

1.3.4.1 Systèmes antiradicalaires endogènes

Le système antiradicalaire endogène est principalement de nature enzymatique. D'autres composés comme les protéines, les vitamines ou les oligo-éléments peuvent aussi intervenir. Toutefois dans ce dernier cas, les mécanismes et les substances antioxydantes sont souvent les mêmes que dans le système antiradicalaire exogène.

L'organisme peut produire des enzymes antioxydantes afin de réguler le stress oxydant. Ce système enzymatique est principalement constitué de trois enzymes qui se complètent (Albrecht, 1994). Leurs rôles sont expliqués dans la figure 1.24.



SOD: Superoxyde dismutase
GSPhx: glutathion peroxydase
GSH: Glutathion réduit
GSSG: Glutathion oxydé

Figure 1.24 : Mécanismes de défense enzymatique de l'organisme contre les radicaux libres (d'après Pincemail *et al.*, 2002).

Favier (2003) décrit ce système enzymatique comme une cascade de réactions enzymatiques où interviennent en premier lieu les superoxydes dismutases (SOD) suivies de la catalase et enfin du glutathion peroxydase.

Il existe deux types de SOD dans les organismes vivants, elles se distinguent principalement par le métal auquel elles sont associées. Il existe ainsi la SOD à manganèse qui protège la mitochondrie, la SOD cuivre-zinc que l'on peut trouver dans le cytosol, au niveau de la membrane externe des cellules endothéliales ou encore dans le plasma sanguin. Ces enzymes sont capables par une réaction de dismutation d'éliminer l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Favier, 2003).

Le peroxyde d'hydrogène, qui est une espèce plus nocive que l'anion superoxyde, est alors détruit par les catalases ou les glutathions peroxydases.

Les catalases sont des enzymes présentent principalement dans les hématies et les peroxysomes. Elles convertissent le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène.

Les glutathions peroxydases existent sous plusieurs formes, notamment une qui possède le sélénium comme co-facteur, et favorisent aussi la dégradation du peroxyde d'hydrogène mais elles peuvent aussi détruire les peroxydes organiques issus de l'oxydation du cholestérol et des acides gras. On les trouve à différents niveaux de l'organisme comme dans le plasma sanguin, le cytosol ou au niveau de la membrane cellulaire.

Le glutathion, un tripeptide, intervient aussi dans les actions antiradicalaires endogènes. Il réduit le peroxyde d'hydrogène en eau et les peroxydes en alcool. D'autres molécules peuvent intervenir dans l'action antioxydante, telles que les protéines synthétisées par les cellules, l'acide urique, les polyamines et des molécules ayant des groupements thiols. Les mécanismes intervenant dans ce cas seront expliqués dans le paragraphe suivant traitant du système antiradicalaire exogène.

1.3.4.2 Systèmes antiradicalaires exogènes

Le système exogène est principalement constitué de molécules telles que les protéines, les polyphénols, les hydrolysats et les vitamines, entre autres. De nombreux antioxydants peuvent assurer leur rôle de protection au sein d'un organisme vivant ou dans une denrée alimentaire. Toutefois, une molécule reconnue antioxydante *in vitro*, ne l'est pas forcément *in vivo*. En effet pour être active *in vivo*, il faut qu'elle ne soit pas détériorée lors de son passage dans l'organisme ou au sein même de l'organisme.

De nombreux auteurs (Moure *et al.*, 2001) ont montré que notre alimentation apporte différents antioxydants, qu'ils soient issus de fruits, légumes, de plantes ou encore de la viande. Ces molécules peuvent interagir avec les radicaux libres ou avec les métaux de transition (molécules chélatrices) ralentissant ou inhibant les mécanismes de propagation de l'oxydation.

Antioxydants non protéiques

◆ La vitamine C (acide ascorbique) permet la protection de l'oxydation du cholestérol des LDL et réduit le risque de maladies cardiovasculaires. L'acide ascorbique est un puissant piègeur de radicaux libres. Il peut soit rompre la séquence oxydative par réaction avec les radicaux lipidiques soit capter les radicaux libres initiateurs de l'oxydation. Le radical libre qui résulte de cette réaction est relativement stable. L'acide ascorbique permet aussi de régénérer certains antioxydants comme la vitamine E ou le glutathion.

Toutefois comme beaucoup de substances antioxydantes, la vitamine C peut avoir une action pro-oxydante. Notamment la chélation du fer par l'acide ascorbique peut créer un catalyseur actif de la production d'EROs (Rietjens *et al.*, 2002).

◆ La vitamine E (α -tocophérol) permet de protéger les acides gras poly-insaturés en rigidifiant la membrane plasmique empêchant ainsi l'oxydation des lipides membranaires. De plus, la vitamine E piège les radicaux peroxydes par le don d'atome d'hydrogène. A forte concentration, celle-ci peut présenter une activité pro-oxydante: en effet, l'augmentation des concentrations en α -tocophérol, dans le cas d'un stress antioxydant conséquent entraîne une augmentation des concentrations en radicaux α -tocophérol, ceux-ci pouvant à leur tour initier l'oxydation lipidique (Rietjens *et al.*, 2002).

◆ Les caroténoïdes sont une grande famille de molécules dont certaines sont des précurseurs de la vitamine A. Ce sont des pigments, présents dans les végétaux, notamment les fruits et légumes. Les représentants les plus connus de cette famille sont le β -carotène, le lycopène et la lutéine. Bien que ces composés soient majoritairement connus pour leur capacité colorantes, ils peuvent intervenir dans de nombreuses applications alimentaires et médicinales pour leurs activités antioxydantes ou antimutagènes (Dufossé et Pintéa, 2005 ; Dufossé, 2004). Ils réagissent avec les radicaux peroxydes, le complexe résultant est stabilisé par un phénomène de résonance. En effet, ces composés sont caractérisés par une longue chaîne carbonée constituée d'une succession de doubles liaisons conjuguées (Faure *et al.*, 1999). Cette caractéristique structurale peut expliquer l'effet anti-oxydant des caroténoïdes ainsi que la faible réactivité du radical résultant. Parmi les études récentes sur les caroténoïdes, Pintéa *et al.* (2011) ont montré que les xanthophylles pouvaient protéger les cultures de cellules rétiniennes humaines contre l'oxydation.

◆ Les composés polyphénoliques sont la catégorie la plus vaste des antioxydants. On trouve parmi eux les flavonoïdes et les tannins présents dans le thé (Langley-Evans, 2000), le vin ou le café. De nombreux flavonoïdes ont été dénombrés dans diverses espèces végétales (thé, café, fruits,...). Les flavonoïdes sont de bons piègeurs de radicaux libres par transfert d'un atome d'hydrogène. Cette classe de molécules est très variée ; ainsi la taille, la nature, et la position des groupements réactifs permet de déterminer le potentiel antioxydant de la molécule ainsi que la stabilité du radical formé (Villaño *et al.*, 2005). Les radicaux sont stabilisés par résonance au niveau du noyau aromatique. Ils peuvent aussi avoir des activités chélatrices des métaux de transition limitant et retardant les réactions d'oxydation.

Les oligoéléments

D'une manière générale, les ions métalliques, en particulier le fer, le cuivre, le zinc et le chrome agissent lors des réactions d'oxydo-réduction par don d'un électron stabilisant ainsi les produits radicalaires. Les oligoéléments interviennent également via les enzymes antioxydantes telles que les SOD, notamment le cuivre, le zinc et le sélénium.

Le sélénium en plus, d'être associé à une SOD, permet de neutraliser les radicaux libres ralentissant le phénomène de vieillissement cellulaire. Il est aussi capable de réparer certains dommages occasionnés par les radicaux libres au sein des cellules.

Toutefois, certains de ces oligoéléments peuvent devenir pro-oxydant, soit via les réactions d'oxydation, soit en se liant avec des antioxydants les rendant inactifs (Jomova et Valko, 2011).

Antioxydants protéiques

- ◆ Les protéines d'origine végétale.

La farine de Lupin et les isolats protéiques de cette farine ont un effet antioxydant et protégeraient l'acide linoléique de l'oxydation (Tsaliki *et al.*, 1999). Les protéines solubles de fève possèdent une activité contre les radicaux superoxydes (Okada et Okada, 1998).

Moure *et al* (2006) ont montré que les fractions protéiques issues de la production de concentrats de Soja possèdent des activités antioxydantes, notamment les fractions de faible poids moléculaire (inférieures à 5kDa) qui sont les plus actives pour piéger les radicaux libres. Une hydrolyse partielle des fractions de poids moléculaire supérieure à 30kDa améliore les activités antioxydantes. Les isolats de protéine de cacahuète et leurs hydrolysats montrent des activités réductrices et chélatrices du fer, et de piégeage des radicaux DPPH (Jamdar *et al.*, 2010). Les isolats de protéines de cacahuètes montrent de fortes activités réductrices du fer ainsi que de chélation du fer. Toutefois une hydrolyse de ces protéines permet d'améliorer les propriétés de chélation du fer ainsi que de piégeage des radicaux libres.

Zhang *et al* (2011) ont identifié et caractérisé un peptide issu de l'hydrolyse enzymatique de Pois chiche par l'Alcalase. Ce peptide, dont la séquence est Asn-Arg-Tyr-His-Glu, présente une activité chélatrice du fer et du cuivre ainsi qu'une capacité à inhiber l'oxydation de l'acide linoléique.

◆ Les protéines et hydrolysats d'origine animale.

- La lactoferrine est une glycoprotéine chélatrice du fer. *In vivo*, elle présente une activité inhibitrice de l'oxydation de l'acide ascorbique et du tryptophane. L'oxydation du tryptophane est totalement inhibée à 37°C par 2g.L⁻¹ de lactoferrine et celle de l'acide ascorbique est diminuée de 70% (Lindmark-Månsson et Åkesson, 2000 ; Bihel et Birlouez-Aragon, 1998).

- Les caséines (α , β et κ) possèdent une activité inhibitrice de l'auto-oxydation lipidique catalysée par la lipoxigénase ainsi qu'une activité protectrice contre la peroxydation induite par le fer.

Leur activité antioxydante serait due à l'inactivation des radicaux libres par l'oxydation de leurs acides aminés. Toutefois, l'activité antioxydante d'un mélange d'acides aminés libres issus de la caséine est inférieure à celle de la protéine native, ce qui sous-entend que la structure primaire des caséines joue un rôle dans l'activité antioxydante (Pihlanto, 2006). De plus, toutes les sous-unités de la caséine (α , β et κ) possèdent une activité antioxydante bien que la caséine α semble être la plus active. Le test TBARS (Substance Réactive à l'Acide Thiobarbiturique) montre que la caséine α inhibe totalement, à une concentration de 250 μ g/mL, la peroxydation de l'acide arachidonique pendant 120 minutes (Cervanto *et al.*, 1999).

Même si les caséines, en elles-mêmes, sont antioxydantes, leur hydrolysats notamment les caséinophosphopeptides (CPP) sont eux aussi antioxydants : ils agissent lors de la phase de propagation de l'oxydation en diminuant la peroxydation lipidique ainsi que les dommages causés par le radical hydroxyle (OH \cdot) (Pihlanto, 2006). L'activité antiradicalaire des CPP contre le radical peroxyde peut être attribuée à leur aptitude à réduire le radical superoxyde en le rendant plus stable, donc moins réactif (Kitts, 2005 ; Kim *et al.*, 2007b)

- Les protéines et hydrolysats protéiques du lactosérum montrent des activités antioxydantes dans un modèle liposomique (test au TBARS). Les hydrolysats ayant une faible masse molaire (entre 0,35 et 1,5kDa) ainsi qu'une composition en acides aminés spécifiques sont des inhibiteurs de l'oxydation des liposomes. En effet, les hydrolysats possédant un fort taux d'histidine ainsi que de nombreux acides aminés hydrophobes montrent de fortes activités antioxydantes (Peña-Ramoz *et al.*, 2003).

Bien que les protéines laitières soient très étudiées, et possèdent des activités antioxydantes, d'autres protéines ou peptides d'origine animale sont aussi antioxydants.

- La carnosine (β -alanylhistidine), dipeptide, que l'on trouve dans les muscles squelettiques, inhibe l'oxydation lipidique grâce à un mécanisme combinant le piégeage radicalaire et la chélation des métaux. La capacité à piéger les radicaux libres serait due à la liaison entre la β -alanine et l'histidine. De plus, ce dipeptide possède des propriétés réductrices et chélatrices du cuivre (Wu *et al.*, 2003).

- les peptides issus de différentes espèces de poissons et de crustacés présentent des activités antioxydantes (tableau 1.1). Les mécanismes exacts de leur activités antioxydantes sont variables et dépendent de la source protéique (Laroque *et al.*, 2008). Ainsi il a été montré que les peptides d'origine marine peuvent agir en tant que piègeur de radicaux libres, chélateur de métaux, inhibiteurs de la peroxydation lipidique (voie enzymatique ou non). De plus ils peuvent aussi induire l'expression de gènes codant pour la synthèse d'antioxydant endogènes. (Harnedy et FitzGerald, 2011).

Tableau 1.1 : Peptides d'origine marine qui possèdent des activités antioxydante

Auteurs	année	Nom commun	Nom latin	Traitement	activité antioxydante	fraction ou peptide
Byun <i>et al.</i>	2009	Rotifère	<i>Brachionus rotundiformis</i>	Alcalase, α -chymotrypsine, Neutrase, Papaine, Pepsine, Trypsine	- DPPH	- Leu-Leu-Gly-Pro-Gly-Leu-Thr-Asn-His-Ala (1076 Da) - Asp-Leu-Gly-Leu-Gly-Pro-Gly-Ala-His (1033 Da)
Gimenez <i>et al.</i>	2009	Sole et calmar		Alcalase	- Chélation des métaux - FRAP - ABTS	Augmentation avec le DH
Šližytė <i>et al.</i>	2009	Morue de l'Atlantique	<i>Gadus morhua</i>	Protamex™	- DPPH - Activité des liposomes	
Batista <i>et al.</i>	2010	Sabre noir	<i>Aphanopus carbo</i>	Protamex™	- DPPH - Pouvoir réducteur - Piégeage des radicaux hydroxyles	
Ngo <i>et al.</i>	2010	Tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	Alcalase, Pronase E, trypsine, Pepsine	- DPPH - Piégeage des radicaux hydroxyles - Piégeage du radical superoxyde	Asp-Pro-Ala-Leu-Ala-Thr-Glu-Pro-Asp-Pro-Met-Pro-Phe (1382 Da)
Alemán <i>et al.</i>	2011	Calmar	<i>Dosiducus gigas</i>	Protamex™, trypsine, Neutrase, Savinase, Esperase, Alcalase	- ABTS - Chélation des métaux - FRAP	
Halldórsdóttir <i>et al.</i>	2011	Lieu noir	<i>Pollachius virens</i>	mélange de protéase de morue Cryotine F	- ORAC - Chélation des métaux - DPPH	
Nanilanon <i>et al.</i>	2011		<i>Nemipterus hexodon</i>	Pepsine	- DPPH - ABTS - Chélation des métaux	la fraction de poids moléculaire de 1,3 kDa montre la plus forte activité
Qin <i>et al.</i>	2011	Oursin	<i>Strongylocentrotus nudus</i>	Papaine, Pepsine, Trypsine	- DPPH - Pouvoir réducteur	les fractions de poids moléculaire inférieur à 1 kDa
Sampath Kumar <i>et al.</i>	2011		<i>Magalaspis cordyla</i>	Pepsine, Trypsine, α chymotrypsine	- DPPH - Pouvoir réducteur - Piégeage des radicaux hydroxyles	Ala-Cys-Phe-Leu (518 Da)
Nazeer <i>et al.</i>	2012		<i>Otolithes ruber</i>	Pepsine, Trypsine, α chymotrypsine	- DPPH - Piégeage des radicaux hydroxyles - Activité <i>in vivo</i>	Lys-Thr-Phe-Cys-Gly-Arg-His (861 Da)

Les caractéristiques qui semblent être déterminantes dans l'activité antioxydante de ces peptides sont :

- Le poids moléculaire : de nombreux auteurs (Rajapakse *et al.*, 2005 ; Kim *et al.*, 2007a) ont mis en avant que les peptides ayant des activités antioxydantes étaient constitués de courtes séquences comprises entre 3 et 20 acides aminés, soit un poids moléculaire inférieur à 3kDa.

- La composition en acide aminé : en plus du poids moléculaire, la composition en acides aminés des peptides est importante dans l'activité antioxydante. Les acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane et phénylalanine) auraient une activité antioxydante vis-à-vis des radicaux libres en libérant un atome d'hydrogène (Kim *et al.*, 2001). Les acides aminés basiques interviendraient notamment dans la chaîne d'oxydation en acceptant les électrons (Suetsuna *et al.*, 2000).

Certains auteurs ont montré que la séquence peptidique aurait un lien avec l'activité antioxydante (Wu *et al.*, 2003). Une activité potentielle de piégeage de l'anion superoxyde a été trouvée pour le peptide Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu (Pihlanto, 2006). D'autres séquences en acides aminés ont démontré des propriétés antioxydantes.

1.4 Modification des propriétés biologiques et technofonctionnelles de sources protéiques par la réaction de Maillard

1.4.1 Propriétés biologiques

1.4.1.1 Effet de la réaction de Maillard sur la capacité antioxydante

Les produits de la réaction de Maillard présentent souvent des propriétés antioxydantes. Celles-ci peuvent être liées à deux mécanismes : le piégeage par don d'un électron ou d'un proton. Ces caractéristiques mécanistiques sont dépendantes de différents facteurs tels que la source protéique, le glucide utilisé ainsi que les conditions de réaction de Maillard (temps, température, pH, ...). De même, certains produits de la réaction de Maillard présentent une activité chélatrice ou ont un impact sur certains systèmes enzymatiques.

De plus, les produits de la réaction de Maillard peuvent être évalués dans leur ensemble ou selon leur poids moléculaire. En effet, la réaction de Maillard produit une pléthore de molécules

sont certaines sont de faible poids moléculaire et d'autres de plus haut poids moléculaire, notamment les mélanoidines qui sont issues des réactions de polymérisation de composés intermédiaires ou des glucides de la réaction de Maillard.

◆ Piégeage des espèces réactives de l'oxygène

Kim et Lee (2009a) ont montré que le temps de chauffage ainsi que le poids moléculaire de la source protéique avaient un impact sur les propriétés antioxydantes. Ils ont chauffé à 100°C trois mélanges modèles contenant du Glucose avec de la glycine, diglycine ou de la triglycine. Plus le temps de chauffage est important, plus les activités de piégeage des radicaux DPPH et ABTS ainsi que le pouvoir réducteur sont importants. Toutefois, cet effet du temps de chauffage est plus marqué pour le mélange contenant de la diglycine, celui contenant de la glycine développant peu ces activités. Dans tous les cas, les produits de la réaction de Maillard présentent à la fois une capacité à piéger des radicaux libres ainsi que la capacité à réduire les espèces radicalaires. En plus de la taille de la source protéique, la composition en acides aminés joue un rôle dans le développement de la capacité antioxydante.

Maillard *et al.* (2007) ont réalisé une réaction de Maillard entre différents acides aminés et le Glucose. Ils montrent ainsi que la réaction de Maillard avec certains acides aminés tels que la proline et la glycine ne permet pas, dans les conditions choisies, le développement d'une capacité antioxydante alors que pour d'autres acides aminés tels que la lysine et l'arginine, la réaction de Maillard améliore les propriétés antioxydantes. L'activité antioxydante de certains acides aminés tels que la cystéine ne serait pas modifiée par la réaction de Maillard.

Le type de glucides utilisés lors de la réaction de Maillard a aussi un impact sur les propriétés antioxydantes. Sun *et al.* (2006) ont réalisé une réaction de Maillard entre l' α -lactoglobuline et trois glucides simples. Ils montrent que la glycation augmente la capacité à piéger le radical ABTS. Cette augmentation est corrélée avec la réactivité des glucides. Plus le glucide est réactif vis-à-vis de la réaction de Maillard, plus les produits sont susceptibles de présenter une activité antioxydante.

Toutefois, la capacité antioxydante des produits de la réaction de Maillard est différente selon leur poids moléculaire et parfois la capacité totale est inférieure à celles des différentes fractions. Il peut se produire entre les différents composés des réactions d'inhibition et de compétition. Gu *et al.* (2009) ont testé la capacité antioxydante de fractions de différents poids moléculaires, issues de la réaction de Maillard entre le Glucose et la caséine. Ils montrent qu'en fonction du poids moléculaire étudié, le mécanisme principal de l'activité antioxydante est différent. Ainsi, bien que toutes les fractions présentent un pouvoir réducteur similaire, les fractions inférieures à 5kDa présentent l'activité de piégeage du radical DPPH la plus importante. En revanche, ce sont les fractions de poids moléculaire compris entre 5-10 kDa et 30-50 kDa qui montrent la plus grande capacité à inhiber la peroxydation lipidique grâce à leur capacité à chélater le fer, élément potentiellement pro-oxydant. Les capacités de ces fractions sont supérieures à celles mesurées pour les produits de la réaction de Maillard avant le fractionnement. Su *et al.* (2011) ont montré le même phénomène. Ils ont fractionné les PRM issus d'un hydrolysate de cacahuète incubé en présence de Glucose. Ils montrent que quelle que soit la fraction considérée, la réaction de Maillard entraîne une augmentation de la valeur ORAC ce qui correspond à une augmentation de la capacité à piéger des radicaux libres. Toutefois l'augmentation de la valeur ORAC est plus importante pour les fractions de poids moléculaire supérieur à 3kDa que pour les fractions de poids moléculaire plus faible ou l'hydrolysate non fractionné. Les auteurs supposent que les peptides de poids moléculaires entre 3 et 5kDa seraient les plus réactifs lors de la réaction de Maillard formant ainsi des polymères tels que les mélanoidines dotés d'une haute capacité antioxydante.

En plus des activités antioxydantes basées sur le piégeage des radicaux libres ou sur la réduction des radicaux, les produits de la réaction de Maillard peuvent aussi développer une activité de chélation des métaux, principalement les métaux de transition.

◆ Propriétés chélatrices

La capacité des produits de la réaction de Maillard à chélater les métaux de transition comme le fer et le cuivre a également été démontrée.

Ramonaityté *et al.* (2009) ont réalisé une réaction de Maillard. entre le lactose et la lysine en présence de différentes concentrations de métaux (fer, cuivre et zinc). Ils montrent que la quantité de métal incorporé dans les mélanoidines augmente avec le temps de réaction. En

revanche, dans le cas du cuivre, une partie est relarguée dans le milieu avec la production de composés bruns et la polymérisation. Ainsi les mélanoidines sont aptes à chélater les métaux de transition tels que le fer, le cuivre et le zinc. Toutefois cette chélation n'est pas irréversible et les métaux peuvent être relâchés dans le milieu réactionnel.

L'impact de la durée du chauffage a également été étudié par Kim et Lee (2009a) sur des mélanges Glucose/glycine ou diglycine ou triglycine. Les auteurs montrent que la capacité à chélater le cuivre augmente avec le temps de chauffage puis diminue et ce, pour les trois mélanges. Néanmoins cette capacité reste faible et ne dépasse pas les 15%. Dans le cas de la chélation du fer, la capacité augmente avec le temps de chauffage et est supérieure à 40%. Le mélange Glucose-diglycine est le mélange qui présente la capacité la plus importante par rapport aux deux autres mélanges. Ainsi la longueur de la chaîne peptidique et la durée du chauffage ont un effet sur la capacité chélatrice du fer et du cuivre.

En fonction du glucide utilisé, la capacité à chélater le fer n'est pas la même. Morales *et al.* (2005) ont montré que les mélanoidines issues d'acides aminés et de Glucose ont une capacité plus importante à chélater le fer que ceux issus des modèles contenant des acides aminés et le lactose.

Les auteurs supposent que les mélanoidines issues du Glucose ont en plus des chaînes Glucose, des résidus actifs dans leur chaîne carbonnée. Ces résidus qui sont riches en groupements hydroxyles seraient responsables des propriétés importantes de chélation du fer.

Lors de la réaction de Maillard entre la caséine et le Glucose, Gu *et al.* (2009) ont montré que les produits de la réaction de Maillard de poids moléculaire supérieur à 30kDa possèdent une activité chélatrice du fer qui serait liée à la présence de groupements hydroxyles.

La littérature montre donc que la réaction de Maillard produit des composés capables de chélater les métaux de transition tels que le fer, le cuivre et le zinc. Ces capacités sont apparemment portées par des composés de hauts poids moléculaires. Toutefois certaines études montrent l'effet inverse.

Ainsi Maillard *et al.* (2007) ont montré que les composés issus de la réaction de Maillard entre des acides aminés et le Glucose possèdent des activités chélatrices du cuivre inférieures à celles des mélanges natifs à l'exception des mélanges contenant de la lysine. Cet effet a aussi été montré par Chériot *et al.* (2009) dans des mélanges cystéine-Glucose. La cystéine seule, chauffée, ou les mélanges natifs ont des propriétés chélatrices du cuivre supérieures à celles du mélange maillardisé. Ainsi les auteurs supposent que ce sont les groupements sulfydryles qui sont responsables de la chélation du cuivre. Après la réaction de Maillard ces groupements sont bloqués par les glucides.

1.4.1.2 Propriétés antibiotiques

Einarsson *et al.* (1983) ont montré que les mélanoïdines, issues d'un mélange histidine/Glucose ou arginine/Xylose, possèdent une activité antibactérienne plus prononcée sur les bactéries GRAM + que sur les GRAM – . Cette inhibition est constatée sur les bactéries pathogènes et sur les bactéries responsables de la dégradation des aliments (*Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Salmonella*, ...).

Les produits de la réaction de Maillard entre le gluten et le Glucose présentent une activité inhibitrice de la croissance de *Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*. Cet effet est plus marqué en présence de produits de la réaction de Maillard produits à 150°C plutôt qu'à 120°C (Del castillo *et al.*, 2007). Ceci suggère que les produits de la réaction de Maillard issus d'une réaction Maillard plus poussée (150°C) sont plus efficaces pour inhiber la croissance bactérienne ce qui peut être lié à la production de composés toxiques lors de la RM.

Chang *et al.* (2011) montrent que le trempage de viande de porc dans un bain de produits de la réaction de Maillard (PRM) issus du chauffage du chitosan en présence de Glucose, avant un stockage réfrigéré permet de retarder le développement de la microflore par rapport aux viandes non traitées. Le retard mesuré est de 3 jours pour la microflore totale et de 5 jours pour les bactéries psychrotrophes.

Parmi les produits de la réaction de Maillard ayant une activité antibiotique, les mélanoïdines de poids moléculaires >10kDa, issus du café ou de gâteaux, possèdent une activité bactériostatique (inhibition de la croissance bactérienne) à faible concentration (2,5mg.ml⁻¹) et une

activité bactéricide (mort cellulaire des bactéries) à plus forte concentration (5-10 mg.ml⁻¹) vis-à-vis de *Escherichia coli*.

L'activité bactéricide est due à une désorganisation des membranes externe et interne de la bactérie par chélation des ions Mg²⁺. En effet ce cation possède un rôle structural : il stabilise les membranes procaryotes en réalisant des liaisons métalliques entre les groupements phosphates et les phospholipides. Les mélanoïdines interfèrent aussi avec des processus vitaux de la cellule comme le transport des nutriments ou la synthèse de précurseurs macromoléculaires (Rufián-Henares et Morales, 2006 ; 2008).

Les mécanismes principaux de l'activité antimicrobienne des mélanoïdines sont schématisés sur la figure 1.25.

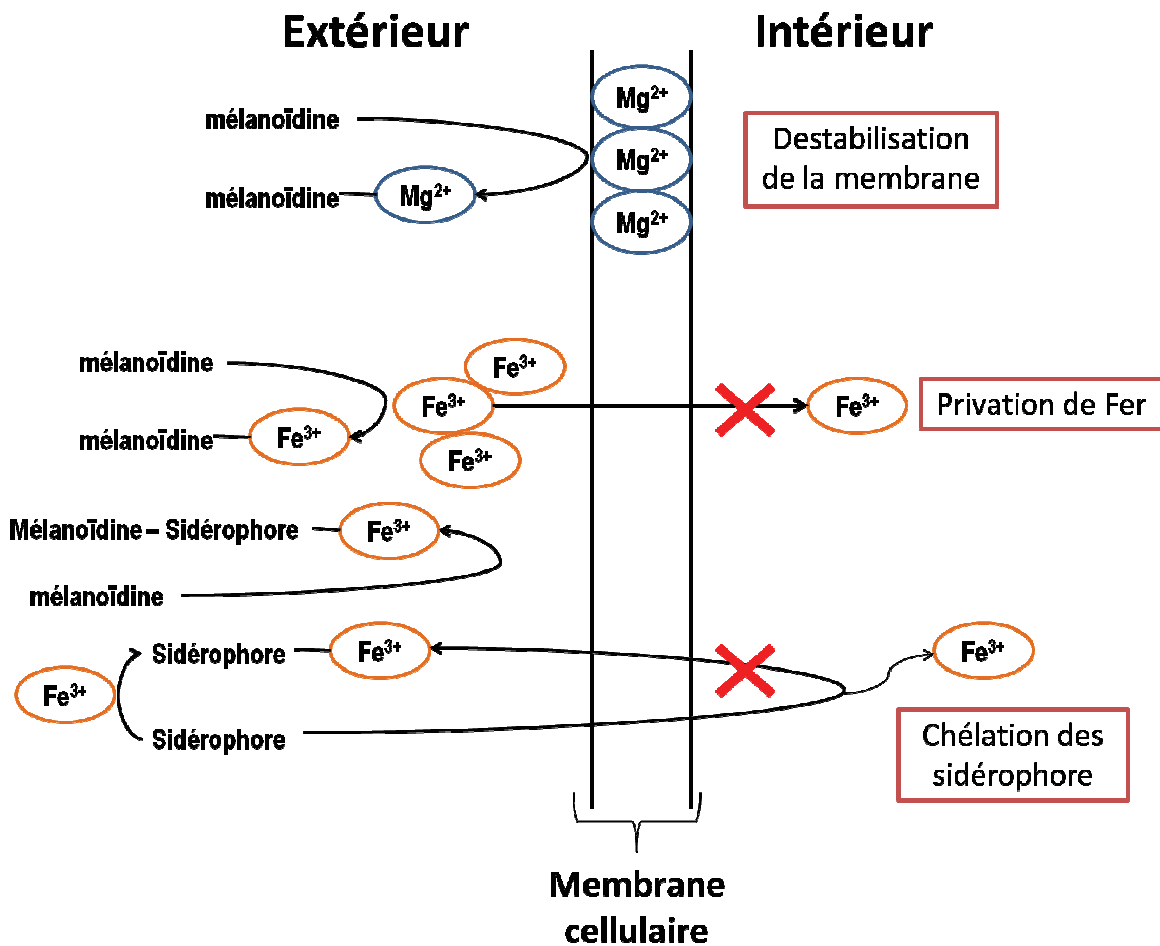


Figure 1.25 : Mécanismes d'action des mélanoïdines dotés d'activité antimicrobienne (d'après Rufián-Henares et De la Cueva, 2009)

L'activité antibactérienne des produits de la réaction de Maillard serait due à différents mécanismes (Einarsson *et al.*, 1987 ; Del Castillo *et al.*, 2007 ; Rufián-Henares et Morales, 2008) tels que :

- la chélation du fer, métal essentiel au développement et à la survie des bactéries, de manière directe ou indirecte (utilisation des sidérophores)
- des interférences avec l'absorption de la sérine, du Glucose et de l'oxygène
- l'inhibition des enzymes bactériennes de la catalyse glycidique entraînant une diminution des sources de carbone accessible
- la désorganisation des membranes bactériennes

1.4.1.3 Formation de composés cytotoxiques

Malgré certains effets bénéfiques ou recherchés de la réaction de Maillard, celle-ci peut conduire à la production de composés cytotoxiques tels que l'acrylamide ou les amines hétérocycliques.

Jing et Kitts (2000) ont observé que les fractions de haut poids moléculaire, issus de mélanges fructose-lysine ou Glucose-lysine, possédaient une plus forte cytotoxicité vis-à-vis des cellules Caco-2 que les fractions de plus faible poids moléculaire ou les mélanges non fractionnés. Cette cytotoxicité n'apparaît qu'après 24h d'incubation en présence des composés à 1mg.mL⁻¹. Par contre Chevalier *et al.* (2001b) ont montré que les produits issus de la glycation de la β -lactoglobuline ne présentent aucune activité cytotoxique sur les cellules COS-7 et HL60. Ils supposent que la glycation étant réalisée dans des conditions douces (72h à 55°C), les composés les plus toxiques sont présents dans des concentrations insuffisantes pour provoquer la mort cellulaire. Jing et Kitts (2002) n'observent pas, en présence de caséine glyquée, de cytotoxicité vis-à-vis des cellules Caco-2 et ce, quelles que soient les conditions de chauffages.

Robert *et al.* (2010) montrent quant à eux que la présence même à faible concentration des produits avancés de la réaction de Maillard (issus d'acides aminés, de dipeptides ou de protéines) augmente la mort cellulaire des fibroblastes de la peau et ce même à faible concentration. Cette cytotoxicité est transmise de la génération exposée à la génération suivante (non exposée). Robert *et al.* (2011a) supposent que l'exposition prolongé aux produits avancés de la réaction de Maillard entraîne une modification permanente des gènes.

De plus certains produits avancés de la réaction de Maillard (AGE) augmentent la prolifération cellulaire qui peut entraîner des maladies telles que le cancer (Robert *et al.*, 2011b). La présence d'AGE issus du lysozyme et de la BSA-glyquée module l'expression de certains gènes tels que les gènes du collagène et de la fibronectine qui jouent un rôle dans la désagrégation des cellules et la mort cellulaire (Robert *et al.*, 2001a).

Lors de la réaction de Maillard la présence d'espèces réactive de l'oxygène (ROS) peut avoir une implication dans la production d'AGE cytotoxiques et dans les phénomènes d'inflammation cellulaire qu'ils induisent (Robert *et al.*, 2011b).

1.4.1.4 Propriétés mutagènes

Différents composés issus de la réaction de Maillard peuvent provoquer des effets mutagènes. Toutefois, selon les auteurs et les tests employés, les opinions divergent sur la fraction du poids moléculaire et le type de composés chimiques qui en sont responsables. Ainsi les composés dicarbonylés, les mélanoïdines, l'acrylamide, les amines hétérocycliques, les thiazoles et les pyrazines font partie des composés suspectés d'avoir des propriétés mutagènes (Kikugawa *et al.*, 2000 ; Jing and Kitts, 2004, Gökmen et Senyuva, 2007). La plupart des ces composés sont produits à des températures supérieures à 100°C.

Les amines hétérocycliques sont produites en présence de glucides, d'acides aminés et de créatine. La présence dans le milieu réactionnel de composés antioxydants tels que les phénols ou les flavonoïdes, limite leur formation. Toutefois une grande quantité de substances antioxydantes est nécessaire pour obtenir une diminution significative de l'activité mutagène (Kikugawa *et al.*, 2000).

L'acrylamide (composé cancérigène pour l'homme d'après le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC)) peut être produit et éliminé lors de la réaction de Maillard entre l'asparagine et le Glucose ou le fructose. Alors que la constante de formation de l'acrylamide ne dépend pas des réactants, la constante d'élimination est, elle, dépendante du type de glucide utilisé ou de la composition en acide aminé. Ainsi la présence de cystéine dans le système réduit le taux d'acrylamide de 99% (De Vleeschouwer *et al.*, 2009a, 2009b). De plus la présence dans le

milieu de cation, notamment de cations divalents comme le calcium (Ca^{2+}), inhibe la formation d'acrylamide (Gökmen et Şenyuva, 2007).

Wijewickreme *et al.* (1999) montrent que la préincubation de l'ADN en présence des produits de la réaction de Maillard et de fer (Fe^{2+}) protège l'ADN contre l'oxydation et donc prévient les mutations. L'activité antimutagène des mélanoidines semble fortement corrélée à leur capacité antioxydante, réductrice et chélatrice (Kato *et al.*, 1985 ; Jing et Kitts, 2004).

1.4.1.5 Perte de la valeur nutritionnelle des aliments

La réaction de Maillard diminue la disponibilité nutritionnelle des acides aminés essentiels à l'instar de la lysine, l'arginine et la méthionine (Gibson *et al.*, 2006). En effet, des liaisons se forment entre ces acides aminés et les glucides réducteurs dès les premiers stades de la réaction de Maillard. Ces glycations entraînent une diminution de la digestibilité des protéines et des glucides car les nouvelles liaisons formées ne peuvent être rompues par les enzymes du tube digestif (Culver et Swaisgood, 1989 ; Rawel *et al.*, 2007).

De plus, d'autres composés présentant des groupements carbonylés (Vitamine C, vitamine B3, vitamine K) ou aminés (vitamines B1) peuvent intervenir comme substrat dans la réaction de Maillard. Ces vitamines ne sont plus disponibles d'un point de vue nutritionnel.

Le devenir de ces molécules (absorption, dégradation, assimilation, ...) est dépendant des organismes. Par exemple, les produits avancés de la réaction de Maillard (AGE) sont faiblement absorbés chez le rat (environ 10%). Toutefois chez les nourrissons, l'absorption de carboxyméthyl (produit de la caséine et du lactose) présent dans les laits industriels s'accompagne ensuite d'une excrétion importante des molécules. (Birlouez – Aragon, 2008).

Toutefois, les composés issus de la réaction de Maillard peuvent aussi avoir des aspects « nutritionnels » positifs. En effet, certains produits volatils de la réaction de Maillard et leurs métabolites sont capables d'avoir des effets pharmacologiques. Kagami *et al.* (2008) ont montré que les produits volatils de la réaction de Maillard tels que les méthylpyrazines sont métabolisés par l'organisme des rats en leurs dérivés carboxyliques. Ces PRM volatiles et leurs métabolites montrent une diminution de la concentration en lipides sanguins. Ces effets sont à priori basés sur la stimulation des récepteurs de l'acide nicotinique.

1.4.1.6 Autres effets de la réaction de Maillard

La réaction de Maillard permet une diminution des effets allergènes des protéines. En effet, les sites allergènes de certaines protéines peuvent être altérés par glycation avec les glucides (Friedman, 1996). Ainsi la diminution du caractère allergène a été constatée par plusieurs auteurs avec des protéines de différentes sources : de lysozyme (Usui *et al.*, 2004) de soja (Van de Lagemaat *et al.*, 2007), de sarrasin (Nakamura *et al.*, 2008) ou de noisette (Iwan *et al.* 2011).

La réaction de Maillard permet de masquer les sites allergènes des protéines et donc d'inhiber l'allergénicité par changement de conformation des protéines ou par liaisons covalentes avec le site allergène. La glycation peut diminuer l'affinité des anticorps pour les protéines et donc limiter le potentiel allergène des protéines.

Par exemple la réaction de Maillard entre l'allergène principal du pollen du cèdre japonais (Cry j 1) et le Dextran ou le galactommanan masque stériquement les épitopes des allergènes ; alors que la glycation en présence de mono ou d'oligosaccharides de petites tailles n'a pas d'effet masquant. Cela suggère que, dans ce cas, il est important de glyquer les protéines avec des polysaccharides de haut poids moléculaires pour entraîner une inhibition stérique de l'allergénicité (Hwang *et al.*, 2012)

Toutefois, la production d'une grande variété de composés après la réaction de Maillard entre les protéines et les glucides peut engendrer de nouveaux allergènes parmi les composés néoformés.

La réaction de maillard *in vivo* ou *in vitro* a des conséquences aussi sur des maladies liées à l'âge : diabètes, athérosclérose ou maladie d'Alzheimer ainsi que sur des maladies liées aux reins, au tabac, à la prolifération cellulaire (Monnier *et al.*, 2002).

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme. Les cellules cancéreuses sont issues d'une cellule ayant acquis la capacité à se diviser indéfiniment. Certains produits de la réaction de Maillard peuvent inhiber la prolifération des cellules cancéreuses. Hwang *et al* (2012) ont isolé et identifié un produit de la réaction de Maillard issu du fructose et de la tyrosine possédant un effet inhibiteur de la prolifération cellulaire. Ce composé le 2,4 – bis (*p*-hydroxyphényl) – 2 – butenal

montre un effet inhibiteur de la prolifération cellulaire sur six lignées différentes de cellules cancéreuses humaines. Toutefois son mécanisme d'action est encore inconnu.

Langner *et al.* (2011) ont quant à eux montré que l'extrait aqueux du chauffage de Potex (fibres de protéines de pomme de terre) entraîne la formation de mélanoidines qui inhibent la prolifération cellulaire des cellules de glioma avec un effet dose des mélanoidines. Ces auteurs montrent que cette inhibition est due à la fraction de haut poids moléculaire (> 10kDa) et que trois types de mécanismes sont impliqués dans l'inhibition de la prolifération par les produits de la réaction de Maillard : le changement de voie métabolique de la protéine kinase activatrice de la mitose ; un arrêt du cycle cellulaire et un changement dans l'organisation des microtubes de la cellule. Par contre, ils ont montré que dans ce cas, l'activité inhibitrice n'est pas due à une régulation de l'ADN.

Néanmoins, la réaction de Maillard, dans certaines conditions de pH (pH faible), température (températures > 100°C) peut aussi produire des composés cancérigènes tels que l'acrylamide ou le 4(5)-methylimidazole (Moon and Shibamoto, 2011).

Depuis quelques années, un autre aspect de la réaction de Maillard a été étudié : la relation entre les produits avancés de la réaction et leur devenir dans les organismes. De ce fait, Baynes (2001) explique que pour une douzaine d'AGE identifiés dans les tissus, seulement la moitié est connue pour s'accumuler avec l'âge. Ces AGE affectent la biochimie et les propriétés physiques des protéines et de la matrice extracellulaire. Toutefois il est probable que la relation entre les AGE et les maladies liées au vieillissement (athérosclérose, diabète, ...) soit plutôt une relation de corrélation qu'une relation de cause à effet. Néanmoins la diminution de la formation d'AGE lors de ces maladies peut limiter les dommages oxydatifs et inflammatoires dans les tissus retardant la progression de la pathologie et améliorant la qualité de vie du patient.

Dans les cas de forte absorption d'AGE, issus de l'alimentation par des patients atteint de diabète de type II, on observe une augmentation du stress oxydant ainsi que du taux de cytokine circulante. Alors que pour des patients ayant une alimentation faible en AGE, une diminution du stress oxydant, du cholestérol et des triglycérides plasmatiques est observée accompagnée d'une augmentation des vitamines C et E plasmatiques et des acides gras de type ω -3 (Birlouez – Aragon, 2008).

Suyama *et al.*, (2007) ont montré que la glycation entre le prion et le Glucose provoque une inactivation de celui-ci entraînant l'absence de développement de la maladie de Creutzfeld-Jacob chez les Hamsters. Ainsi ces auteurs suggèrent que la réaction de Maillard peut être utilisée comme moyen de décontamination des co-produits de viande et d'os.

L'activité antihypertensive des produits de la réaction de Maillard a été démontrée *in vitro* par l'activité inhibitrice de l'ACE (Angiotensin I Converting Enzyme). L'impact du glucide mis en jeu lors de la réaction de Maillard se répercute sur l'activité antihypertensive. Ainsi les composés issus des systèmes fructose-acides aminés sont plus inhibiteurs de l'ACE que ceux issus des systèmes Glucose-acides aminés (Hwang *et al.*, 2011). Rufián- Henares et Morales (2007) ont montré que cette activité inhibitrice est portée par le squelette des mélanoidines. Toutefois, le mécanisme de l'inhibition de l'ACE par les produits de la réaction de Maillard n'est toujours pas élucidé.

1.4.2 Propriétés technofonctionnelles

1.4.2.1 Formation d'arômes

Dans de nombreuses applications, la réaction de Maillard est souhaitée afin d'obtenir des arômes et des colorations brunes. Généralement, c'est principalement le glucide et l'acide aminé utilisés qui influencent le type, le taux et la voie de formation des arômes. Ames *et al.* (2001) montrent que l'intensité des arômes augmente avec le pH pour des échantillons préparés à la même température et en utilisant le même glucide. Ainsi par exemple, par réaction de Maillard notamment lors de la dégradation de Stecker, le glutathion (tripeptide) est un précurseur de composés ayant une note associée à la viande tels que les thiols, les thiazoles ou les polysulfites qui possèdent des atomes de soufre (Lee *et al.*, 2010). Dans une réaction de Maillard, les nombreux composés d'arômes produits possèdent des saveurs différentes. Le chauffage à 160°C pendant 2h d'un mélange liquide de glutathion en présence de Glucose ou de fructose entraîne l'apparition de notes métalliques, caramel, amandes, vertes ou encore médicales. L'intensité de ces arômes dans ces mélanges dépend de la nature du glucide utilisé (Lee *et al.*, 2010).

Parmi les précurseurs ou composés aromatiques issus de la réaction de Maillard on peut citer :

- le furfural qui est un produit de la réaction et le précurseur du 2-furfurylthiol, un arôme clé de la torréfaction du café (Wang *et al.*, 2008).

- le 2-furanméthanthiol qui possède une odeur de note grillée que l'on retrouve notamment dans le café et le popcorn (Wang *et al.*, 2008).

- le 2-méthyl-3-furanthiol qui lui possède une odeur de viande cuite que l'on retrouve dans les odeurs de cuisson du bœuf. (Ames *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2010).

Toutefois, quel que soit le système étudié, la majorité de ces composés est apparentée à la famille des thiols ou des furanes (Wang *et al.*, 2008 ; Lee *et al.*, 2010).

1.4.2.2 Solubilité

La solubilité des protéines dans un solvant dépend de nombreux paramètres. D'un point de vue thermodynamique, la solubilité correspond à une dissociation simultanée des molécules du solvant et des protéines. Suite à cette dissociation, les protéines se dispersent dans le solvant avec une surface de contact interfaciale maximale entre la protéine et le solvant. Pour se solubiliser, les protéines sont amenées à interagir autant que possible avec le solvant. De ce fait, pour une protéine donnée, la solubilité dépend principalement du type du solvant, du pH, de la force ionique et de la température.

Les données sur les caractéristiques de solubilité sont utilisées pour la détermination des conditions optimales d'extraction et de purification des protéines à partir de sources naturelles ainsi que pour la séparation des fractions protéiques. Cependant, la solubilité d'une protéine ou d'un hydrolysat, est aussi un pré-requis pour caractériser leurs propriétés technofonctionnelles telles que les propriétés émulsifiantes, moussantes ou gélifiantes.

L'hydrolyse enzymatique, telle que celle pratiquée sur les protéines d'origine marine, est un moyen technologique largement utilisée afin d'améliorer la solubilité de ces protéines. L'hydrolyse améliore la solubilité du fait de la libération de peptides de faible poids moléculaire et de l'augmentation de composés polaires dans le milieu et donc de l'hydrophilie et de la solvabilité

des peptides. Plusieurs paramètres influent sur la solubilité des hydrolysats tels que l'enzyme utilisé et le degré d'hydrolyse atteint.

Ainsi Klompong *et al.* (2007) ont montré, en réalisant l'hydrolyse de protéine de Selar que, sur une gamme de pH allant de 2 à 12, la solubilité des hydrolysats était comprise entre 85% et 100% pour les hydrolysats obtenus avec l'Alcalase et entre 90 et 100% pour ceux obtenus avec la Flavourzyme. L'augmentation du DH entraîne une augmentation de la solubilité particulièrement entre les pH 4 et 6. Cette zone de pH correspond à la zone où se situe le point isoélectrique de la majorité des protéines. Lors de l'hydrolyse des protéines de brème (*Nemipterus hoxodon*) par l'Alcalase, Nanilanon *et al.* (2011) ont montré que l'augmentation du DH est associée à une augmentation de la solubilité. Cette augmentation est particulièrement marquée à pH 5. En effet à ce pH, la solubilité passe de 71% pour un DH de 10% à 92% pour un DH de 30%. Les auteurs expliquent cette augmentation de la solubilité par une diminution du poids moléculaire des molécules qui possèdent plus de groupements polaires susceptibles de créer des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau.

D'autres systèmes protéiques marins, tels que les protéines de Merlu du Pacifique (Pacheco-Aguilar *et al.*, 2008) ou les protéines d'œuf de Carpe Indienne (Chalamaiah *et al.*, 2010) montrent aussi après hydrolyse une augmentation de la solubilité.

Un autre moyen technologique qui peut potentiellement augmenter la solubilité est la glycation. Dans ce cas, on remarque soit un déplacement du point isoélectrique par rapport à celui de la protéine native, soit une augmentation de la solubilité sur toute la gamme de pH. La glycation permet donc, à priori, une utilisation sur une plus grande gamme de pH que les protéines natives notamment à des pH acides. Shepard *et al.* (2000) ont montré que la glycation entre le caséinate et la maltodextrine (1.4kDa) augmente la solubilité sur toute la gamme de pH alors que le caséinate natif est insoluble autour de son point isoélectrique (pH 4 - 4.5).

L'amélioration de la solubilité des glycaconjugués est attribuée à des changements de la charge nette des protéines ainsi qu'à l'augmentation de l'hydratation du fait du greffage des composés glucidiques. (O'Reagan et Mulvihill, 2010)

1.4.2.3 Propriétés émulsifiantes

La réaction de Maillard entre les protéines et les glucides affecte les propriétés fonctionnelles des protéines en changeant leur charge, leur solubilité et/ou leur conformation.

De nombreuses études portent sur les propriétés émulsifiantes des sources protéiques glyquées. Ainsi Chevalier *et al.* (2001) ont montré que les conjugués de β -lactoglobuline (Blg) et d'arabinose ou de ribose amélioreraient les propriétés émulsifiantes à pH 5. Parallèlement, les conjugués de Blg et de rhamnose, Glucose et galactose semblent augmenter la stabilité des émulsions. Le type de sucre a donc un impact sur les propriétés technofonctionnelles.

Dans le cas des glucides simples, la nature du glucide semble être le facteur déterminant pour la modification des propriétés fonctionnelles des protéines par réaction de Maillard. Kato *et al.* (1990) ont ainsi montré que la glycation avec du Glucose entraîne la formation de glycoconjugués avec des propriétés de surface plus faibles que celle de la protéine native. Saeki *et al.* (1997) ont montré que la modification des protéines lors des premières étapes de la réaction de Maillard entre le Glucose et les protéines de carpe augmente la stabilisation des émulsions formées.

Toutefois, selon la littérature scientifique, les polysaccharides sont plus utilisés pour augmenter les propriétés émulsifiantes par réaction de Maillard comparativement aux monosaccharides (tableau 1.2). Ainsi depuis les années 1990, les polysaccharides ont été utilisés dans ce sens notamment le Dextran, les galactomannanes et le chitosan.

Tableau 1.2 : Conséquences de la réaction de Maillard sur les propriétés fonctionnelles de différentes protéines.

auteurs	année	source protéique	sources glucidique	conditions de RM	conséquences sur les propriétés fonctionnelles
Chevalier <i>et al.</i>	2001	β -lactoglobuline	ribose, arabinose, galactose, Glucose, rhamnose et lactose	milieu liquide 60°C pendant 72h	diminution de la solubilité entre le pH 3,5 et 5; augmentation de la taille des gouttelettes pour les émulsions à pH 7 sauf en présence de glycoconjugué de ribose et d'arabinose
Hassan <i>et al.</i>	2007	protéine de Millet	galactomannane	milieu sec; 60°C; RH 79%; 7jours	augmentation de la solubilité; amélioration des propriétés émulsifiantes (capacité et stabilité)
Wooster et Augustin	2007a	β -lactoglobuline	maltodextrine	milieu sec; 60°C; RH 76%; 36h	augmentation de l'épaisseur de la couche interfaciale; résistance de l'émulsion à la floculation induite par les sels ou la température
Wooster et Augustin	2007b	β -lactoglobuline	Dextran	milieu sec; 60°C; RH 76%; de 5 à 10j	augmentation de l'épaisseur de la couche interfaciale; résistance de l'émulsion à la floculation induite par les ions calcium
Matemu <i>et al.</i>	2008	protéine de Soja	galactomannane; chitosan	milieu sec; 60°C; RH 60%; 7 jours	amélioration des propriétés émulsifiantes (capacité et stabilité)
Decourcelle <i>et al.</i>	2010	hydrolysate de crevette	Xylose	milieu liquide 60°C pendant 4h	amélioration des propriétés émulsifiantes (crémage moins important); augmentation de la viscosité apparente et de l'indice de consistance des émulsions contenant le composé glyqué
Le <i>et al.</i>	2011	poudre de lait	lactose et galactose	stockage jusqu'à 12 semaines de poudre à 3 RH (44; 66 ou 84%) à 4 température (25, 30, 35 et 40°C)	perte de la solubilité des poudres de lait

Certains auteurs, comme Kato *et al.* (2002), ont montré que la glycation avec des polysaccharides ramifiés augmentait efficacement les propriétés émulsifiantes par rapport aux polysaccharides linéaires. La présence de ramification augmente les répulsions stériques entre les gouttelettes. Cette hypothèse a été validée dans le cas de la β -lactoglobuline et du Dextran, où Wooster et Augustin (2006) montrent que l'épaisseur de la couche interfaciale des gouttelettes est due au Dextran. Ces mêmes auteurs (2007) montrent qu'avec la maltodextrine, on observe les mêmes comportements.

En plus de la présence de ramification ou non des polysaccharides, la position de la glycation est importante. Wong *et al.* (2011) ont étudié l'effet de la taille et de la position de greffage de Dextran sur des protéines de blé sur la stabilisation d'émulsion à pH acide. Ils ont montré que bien que le conjugué entre des protéines de blé et le Dextran (41kDa) présente le plus faible taux de glycoconjuguaisons, il offre la meilleure stabilité des émulsions à pH acide (pH 4). Ceci est expliqué par la localisation préférentielle en N-terminal de la glycation entraînant à ces pH une augmentation de l'épaisseur la couche interfaciale.

Miralles *et al.* (2007) supposent que l'augmentation des propriétés émulsifiantes de la β -lactoglobuline et du chitosan est due à la fois à l'augmentation de la flexibilité protéique ainsi qu'à l'exposition de groupement hydrophobes accélérant l'adsorption aux interfaces.

La glycation entre les protéines ou les peptides et les glucides anioniques grâce à la réaction de Maillard semble avoir le même effet qu'une succinylation c'est à dire une conversion des groupements cationiques en groupements anioniques. Cette altération de charges est responsable, entre autres, de l'augmentation des propriétés émulsifiantes. Cette hypothèse est supportée par Matemu *et al.* (2008), qui supposent que l'augmentation des propriétés émulsifiantes entre les protéines de tofu et le chitosan ou le xyloglycan est due aux charges des polysaccharides ainsi qu'à leur taille entraînant ainsi des répulsions électrosteriques entre les gouttelettes.

Toutefois, bien que le type de glucide soit déterminant pour l'amélioration des propriétés fonctionnelles des protéines, la conformation de celles-ci ainsi que la concentration en composés maillardisés utilisés dans les émulsions sont aussi des facteurs importants.

Ainsi Liu *et al.* (2012) ont réalisé une réaction de Maillard entre des isolats protéiques de cacahuète et le Dextran. Ils montrent que la prolongation du temps d'incubation des composés entraîne une amélioration de l'activité émulsifiante. Néanmoins, la stabilité des émulsions diminue lorsque que des composés dont le temps d'incubation est supérieur à un jour sont utilisés. Cette diminution est probablement causée par une conformation plus compacte des protéines glyquées diminuant de ce fait la réorganisation aux interfaces. Les auteurs soulignent que l'amélioration des propriétés émulsifiantes serait plus importante si toutes les fractions protéiques des isolats participaient à la réaction de Maillard. Or la fraction contenant l'arachine qui est la fraction majoritaire des isolats protéiques de cacahuète ne réagit pas ou peu lors de la réaction. Cette faible réactivité est liée aux résidus lysils qui sont bloqués par la conformation compacte de cette protéine. Les auteurs concluent que pour ces isolats l'amélioration des propriétés par la réaction de Maillard dépend entre autre du taux de dénaturation de l'arachine ainsi que du temps d'incubation (Liu *et al.*, 2012).

Alvarez *et al.* (2012) ont aussi montré l'impact du type de protéine lors de la glycation avec le Dextran sur les propriétés émulsifiantes. Quelle que soit la protéine utilisée (globuline, hémoglobine et albumine) la glycation améliore la capacité émulsifiante par rapport aux protéines natives. Toutefois, cette amélioration est plus marquée pour l'hémoglobine que pour les autres protéines. De plus, ils mettent en exergue l'impact de la concentration en protéines glyquées dans les émulsions. Ainsi, si la concentration est insuffisante, l'impact de la glycation est peu net.

1.5 Conclusion

La synthèse de l'état de l'art sur la réaction de Maillard a mis en évidence qu'il existe de nombreux paramètres de réaction sur lesquels on peut agir.

Or la réactivité des glucides vis-à-vis de la réaction de Maillard est différente en fonction de leur conformation mais aussi du degré de polymérisation des glucides complexes. Ainsi, il semblerait que, plus le poids moléculaire du glucide augmente, moins celui-ci est réactif lors de la réaction de Maillard. Un des paramètres pour catalyser la réaction en présence de glucide peu réactif est l'utilisation de températures élevées. Toutefois afin de limiter la production des composés indésirables (cytotoxiques, mutagènes, cancérigènes, ...), il est recommandé de travailler en conditions modérées de température, de temps et de pH, et de réduire la durée de la réaction de Maillard.

La littérature montre qu'en fonction du type de glucide la réaction peut être conduite en milieu liquide ou en milieu sec. Il semblerait que le milieu liquide soit principalement utilisé pour les glucides simples (mono et disaccharides) alors que le milieu sec est privilégié dans le cas des glucides complexes. En effet, le milieu sec permettrait de « palier » la faible réactivité des glucides complexes sans pour autant travailler à haute température et donc de greffer des chaînes glucidiques sur des sources protéiques diverses.

Parmi les conséquences de la réaction de Maillard conduite en milieu sec ou liquide, il y a le développement de colorations brunes, la modification de certaines propriétés fonctionnelles ainsi que l'augmentation des propriétés antioxydantes.

La littérature montre aussi que la glycation de protéine via la réaction de Maillard tend à améliorer les propriétés fonctionnelles, notamment la solubilité ainsi que les capacités émulsifiantes et moussantes. En outre il semblerait que l'utilisation de glucides complexes ait un effet positif sur les propriétés de solubilité et émulsifiantes alors que les glucides simples entraînerait des effets plus contrastés.

La majorité de ces études sont conduites en milieu sec lors de l'utilisation de glucides complexes et en milieu liquide dans le cas des glucides simples. Toutefois dans ces deux cas la source protéique est soit une protéine native, soit un acide aminé ou encore un peptide modèle.

Il existe cependant peu d'études sur l'impact de la glycation sur les propriétés fonctionnelles d'hydrolysats protéiques.

La réaction de Maillard est aussi reconnue pour le développement de molécules potentiellement antioxydantes. Cette activité peut intervenir *in vivo* ou *in vitro* selon différents mécanismes comme le piégeage des radicaux libres et la chélation des métaux de transition. Ces activités antioxydantes ont été montrées lors de la réaction de Maillard entre différentes sources protéiques allant de l'acide aminé à la protéine en passant par l'hydrolysats et des glucides simples.

Il semble que cette activité antioxydante soit liée au développement des composés bruns et donc à l'avancée de la réaction de Maillard et à la réactivité des glucides.

On cherche donc à mettre au point des conditions de réaction de Maillard (nature des glucides, présence de phosphate, milieu liquide ou sec) permettant la production de composés bifonctionnels, dotés à la fois de propriétés émulsifiantes et antioxydante, à partir d'un hydrolysats de co-produits marins

2 Matériel et méthodes

Ce chapitre présente les matériels et méthodes utilisés pour répondre aux objectifs de la thèse. Dans un premier temps, il s'attachera à la fabrication des produits que ce soit dans la description des sources protéiques et glucidiques utilisés pour les réactions de Maillard mais aussi au principe et au choix des conditions d'hydrolyse enzymatique utilisées. Les paramètres de réaction de Maillard seront ensuite décrits pour toutes les conditions choisies.

Dans un deuxième temps, la caractérisation des produits sera décrite par différentes techniques. Tout d'abord par les dosages biochimiques permettant d'évaluer l'avancement de la réaction de Maillard. Puis par l'évaluation des propriétés physico-chimiques des produits de la réaction de Maillard. Enfin l'évaluation de leur capacité antioxidante sera abordée.

Enfin, il décrira les méthodes de chromatographie d'exclusion de taille utilisées pour caractériser les PRM.

2.1. Caractérisation des réactifs utilisés

2.1.1 Sources protéiques

Deux sources protéiques ont été utilisées : le caséinate de sodium et un hydrolysate de crevette.

- le caséinate de sodium a été donné à titre gracieux par Armor Protéines (France). Il est obtenu à partir de caséine acide à laquelle on incorpore une base (ici le sodium), ce qui solubilise le produit en augmentant le pH. Il est utilisé dans l'industrie agro-alimentaire en tant qu'émulsifiant, et dans notre étude il servira de protéine de référence. La composition du caséinate utilisé est : 91.7% de protéines ; 5.5% d'humidité ; 1% de matière grasse. Ce caséinate de sodium sera hydrolysé à trois degrés d'hydrolyse par l'Alcalase® 2,4L dans la suite de l'étude. Ces trois hydrolysats seront eux aussi choisis comme source protéique dans la réaction de Maillard.

- l'hydrolysate de crevette (*Pandalus borealis*) a été fourni par Diana Naturals. Il est issu de l'hydrolyse de têtes de crevette et son degré d'hydrolyse (DH) est de 55.2% (évalué par dosage à l'OPA).

2.1.2 Glucides

Dans cette étude, quatre glucides ont été utilisés dans la réaction de Maillard : le Xylose, le Glucose, les Fructo-oligosaccharides (FOS) et le Dextran. Tous ces glucides possèdent au moins une fonction réductrice. Toutefois, il est nécessaire que le glucide soit sous forme linéaire pour être réactif lors de la réaction de Maillard. La proportion de forme cyclique/acyclique dépend de nombreux paramètres et est différente pour chacun des glucides utilisés.

- Le Xylose (figure 2.1) est un aldopentose. Il possède une saveur sucrée semblable à celle du Glucose et un pouvoir sucrant de 0,7. Il est très réactif vis-à-vis de la réaction de Maillard (Laroque *et al.*, 2008).

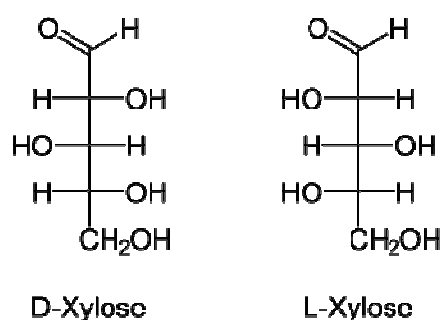


Figure 2.1 : Molécule de Xylose en projection linéaire

- Le Glucose (figure 2.2) est un aldohexose. Il possède un pouvoir sucrant de 0,7. C'est un glucide largement utilisé en agroalimentaire et dans les études de systèmes modèles lors de la réaction de Maillard.

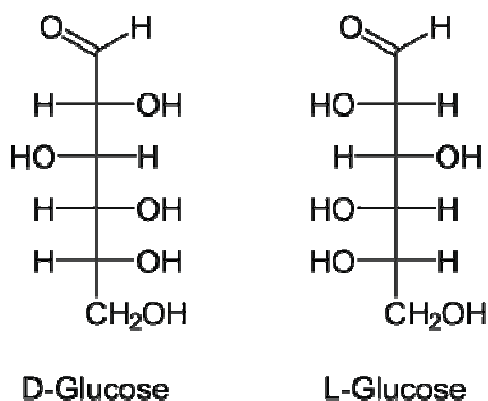


Figure 2.2 – Molécule de Glucose en projection linéaire

- Les Fructo-oligosaccharides (FOS) (figure 2.3) ont été fournis par BENEIO Orafti. Ce sont des oligomères de fructose de 2 à 8 unités. Les unités sont liées entre elles par des liaisons β (2,1). Ils possèdent un pouvoir sucrant de 0,7.

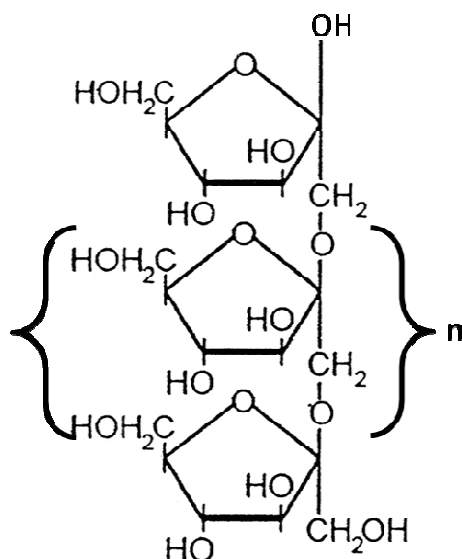


Figure 2.3 – Molécule de fructo-oligosaccharide

- le Dextran (figure 2.4) est un polymère ramifié de Glucose de masse moléculaire élevée (minimum 1500 Da). Les unités Glucoses sont reliées entre elles par des liaisons α (1-6) et les ramifications par des liaisons α (1,2) ou α (1,3). Ce polymère est synthétisé principalement par une bactérie : *Leuconostoc mesenteroides*. La fiche technique du Dextran utilisé est donnée en Annexe 1. Le Dextran utilisé dans la thèse a un poids moléculaire moyen de 270kDa.

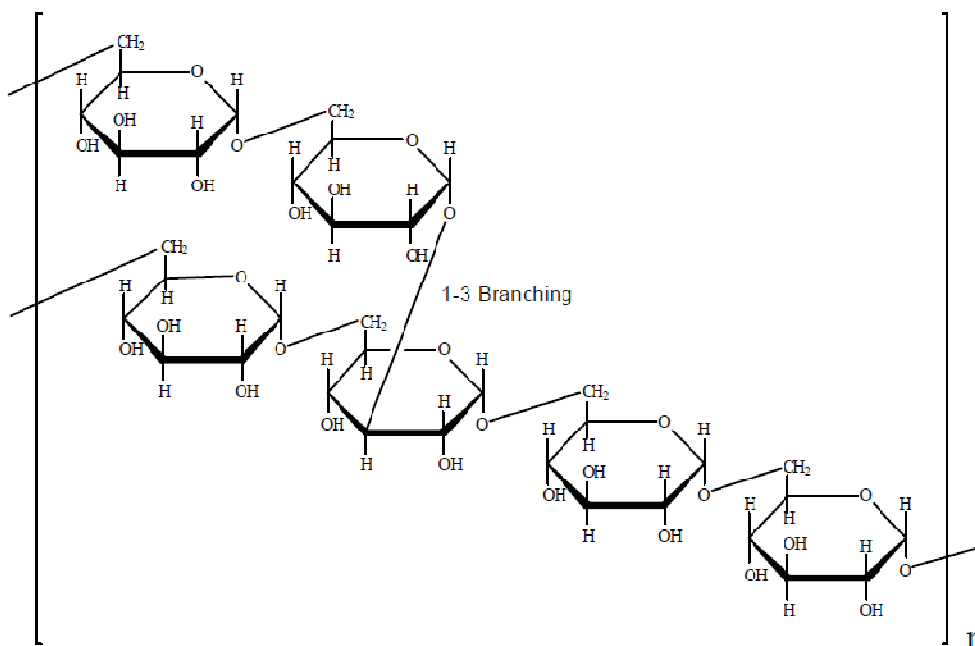


Figure 2.4 – Structure d'un fragment de molécule de Dextran (fiche technique Sigma)

2.2 Réaction de Maillard en milieu sec

Mise en œuvre :

La réaction de Maillard a été réalisée avec trois sources protéiques : le caséinate de sodium (CS) (Armor proteines), un hydrolysate de crevette (SH) (Diana Naturals) et du caséinate de sodium hydrolysé (DH 6,5% ; 10% et 13,5%).

Pour le caséinate de sodium et l'hydrolysate de crevette, quatre glucides ont été utilisés : le Xylose, le Glucose, les Fructo-oligosaccharides et le Dextran. Dans le cas des hydrolysats de caséinate, seul le Xylose et le Dextran ont été utilisés pour la maillardisation.

Pour la réalisation des réactions de Maillard en milieu sec, on dissout, dans un bécher, 30 g de protéine (150 mg.ml^{-1}) et 18 g glucide (90 mg.mL^{-1}) dans 152 g de tampon phosphate de sodium (0,3M, pH 6,5) ou 152 g d'eau distillée. Après dissolution totale des deux réactifs, les mélanges sont placés dans des pots en plastiques et congelés à -80°C pendant 24 h avant lyophilisation (-50°C , 76h; Bioblock Scientific CHRIST® alpha 1-4 LD plus). Le lyophilisat est ensuite aliquoté dans des boîtes de Pétri, après avoir été concassé pour obtenir une poudre homogène (environ 6 g de poudre par boîte). Les boîtes sont disposées dans un dessiccateur hermétiquement fermé et contenant une solution saline de chlorure de sodium saturée. La réaction de Maillard se produit grâce à l'incubation de ce dessiccateur dans une étuve thermostatée à 50°C pendant 48 h (figure 2.5).

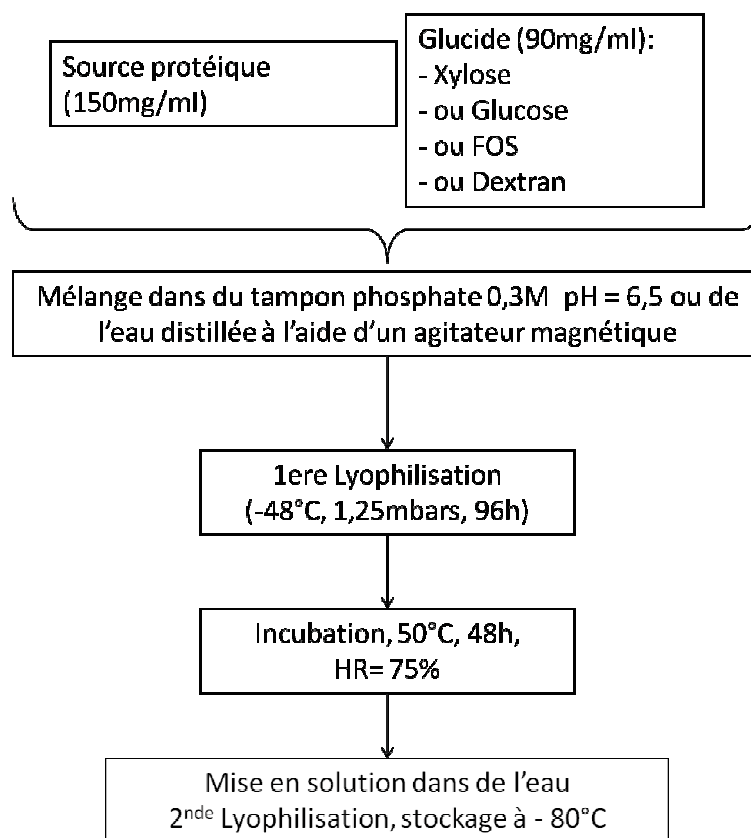


Figure 2.5 : Schéma de fabrication des produits Maillardisés.

Afin de voir si les conditions choisies ne sont pas limitantes, un effet dose en Xylose a été réalisé. La concentration en Xylose a été multipliée par 2 (180 mg.ml^{-1}) et par 4 (360 mg.ml^{-1}). La concentration en protéine n'a pas été changée (150 mg.ml^{-1}). Les réactifs ont été traités et maillardisés dans les mêmes conditions que pour l'étude de l'impact de la nature du glucide.

Pour voir si le poids moléculaire du glucide avait un impact sur les propriétés fonctionnelles des protéines modifiées, une réaction de Maillard a été réalisée avec le caséinate de sodium et l'hydrolysat de crevette et du Dextran de différentes masses moléaires : 6kDa ; 40kDa ; 100kDa et 270kDa.

Mesure de la cinétique d'humidité relative au cours de l'incubation :

Afin de créer l'humidité relative désirée au cours de la RM, le mélange protéine/glucide lyophilisé a été placé dans des dessiccateurs hermétiques (figure 2.6) contenant une solution saline.

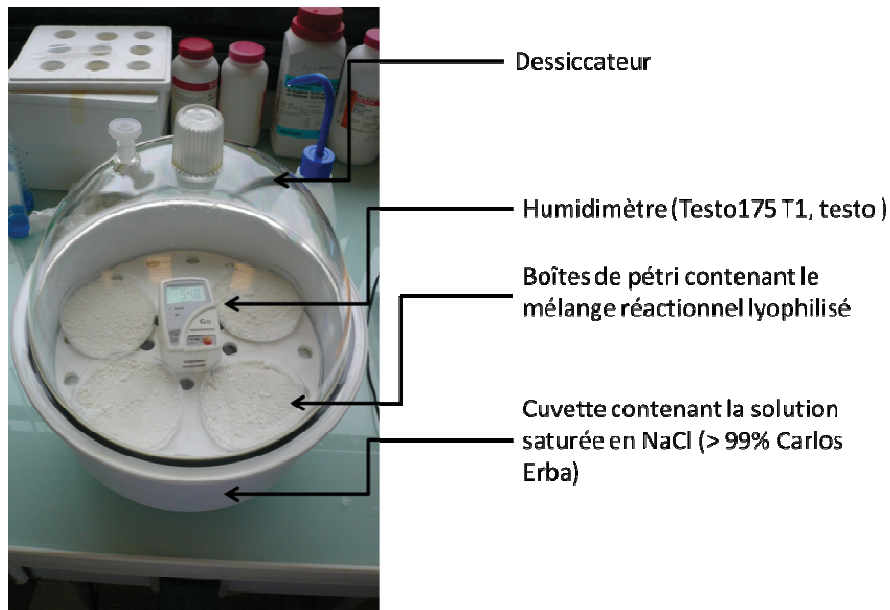


Figure 2.6 – Dessiccateur avant la réaction de Maillard

L'humidité relative produite a été contrôlée grâce à un humidimètre (Testo 175 T1, Testo) situé dans les dessiccateurs. La figure 2.7 montre la courbe d'humidité relative moyenne produite par la solution saline saturée à 50°C dans l'enceinte du dessiccateur pendant la réaction de Maillard.

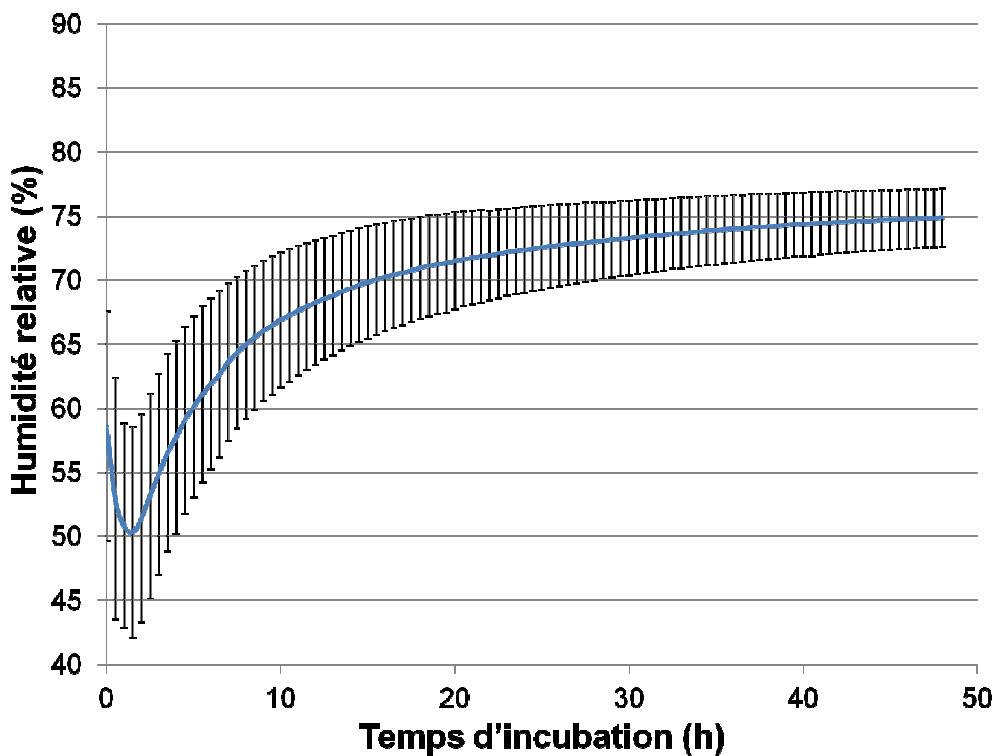


Figure 2.7 – Cinétique de l'humidité relative (%) dans le dessiccateur et au cours de la réaction de Maillard.

On remarque qu'après 20 heures d'incubation, l'humidité relative de l'enceinte avoisine les 72% (CV moyen : 5%). La baisse d'humidité relative au début de l'incubation peut être due à l'absorption d'eau par les poudres.

2.3 Hydrolyse enzymatique des protéines

L'hydrolyse d'une protéine correspond à la rupture des liaisons peptidiques. Cette hydrolyse peut être de nature chimique (à l'aide d'un acide ou d'une base) ou enzymatique. Dans le cas d'une hydrolyse acide, ce sont les protons (H_3O^+) qui rentrent en jeu et dans le cas d'une hydrolyse basique, les ions hydroxydes (OH^-). Les hydrolyses acides, ou basiques ne sont pas spécifiques et il est difficile de contrôler l'avancée de la réaction. Des dosages biochimiques sont ensuite nécessaires pour évaluer le degré d'hydrolyse des protéines.

Dans le cas d'une hydrolyse enzymatique en milieu basique ou neutre, la rupture des liaisons peptidiques entraîne la libération de proton dans le milieu et donc une acidification. Sans contrôle du pH du milieu, l'hydrolyse s'arrête lorsque le pH du milieu réactionnel ne correspond plus à la gamme de pH optimum de l'enzyme utilisée. Comme dans les hydrolyses acides ou basiques, il est nécessaire d'utiliser des dosages biochimiques pour évaluer le degré d'hydrolyse des protéines. Toutefois, il est possible d'utiliser la méthode du pH-stat qui permet de travailler à pH constant par ajout de soude et de déterminer le degré d'hydrolyse au cours de l'hydrolyse durant la phase de protéolyse enzymatique.

Principe :

L'utilisation d'un pH-stat permet de déterminer le nombre de liaisons peptidiques rompues au cours de l'hydrolyse. En milieu basique ou neutre, la rupture de la liaison peptidique, entraîne une libération d'ion H^+ dans le milieu car le pH est supérieur au pKa des groupements COOH. Il y a donc acidification du milieu. La méthode du pH-stat consiste à maintenir le pH du milieu réactionnel à une valeur stable (dans notre cas à un pH de 8) en ajoutant de la soude dans le milieu.

Lorsque l'hydrolyse se fait en milieu basique, le degré d'hydrolyse est obtenu avec la formule d'Adler-Nissen (1976, 1977).

$$DH = \frac{B N}{M_p \alpha h_{tot}} * 100$$

Avec : B : le volume de soude ajouté (mL)

N : la normalité de la soude (mmol.mL⁻¹)

M_p : la masse de protéine (g)

H_{tot} : le nombre total de liaisons peptidiques

α : le degré de dissociation des groupements aminés (qui varie en fonction du pH et de la température)

Réalisation des hydrolyses :

Le caséinate est introduit à la concentration de 8 g.L⁻¹ : 16 g de poudre sont dissout dans 184 g d'eau distillée. Le mélange est agité pendant environ 2 heures afin d'avoir une dissolution totale du caséinate. Le mélange est ensuite introduit dans un réacteur ouvert de 250mL thermostaté à double paroi pour réaliser l'hydrolyse. Tout au long de l'hydrolyse, le mélange est homogénéisé par un agitateur magnétique tournant à une vitesse de 300rpm.

Les hydrolyses sont conduites dans les conditions suivantes : le ratio substrat/eau est de 8% ; la température de 50°C; le pH de 8, la durée d'hydrolyse varie de 26 à 120 minutes et le ratio Enzyme/Substrat (E/S) varie de 0,38% à 3%. L'enzyme utilisée est l'Alcalase® 2,4L (Novozymes).

L'hydrolyse est faite avec un titreur 718 stat trinitro de Methrom piloté par le logiciel Tiamo (Titration and More, Metrohm, France). La première phase consiste à ajuster le pH à la valeur de consigne (pH=8) : c'est la phase de pré-titration puis l'hydrolyse démarre avec l'ajout de l'enzyme. Avant chaque série d'hydrolyse, le pH-mètre est étalonné.

Une fois l'hydrolyse terminée, l'enzyme est inactivée par traitement thermique en plongeant l'hydrolysate pendant 30 minutes dans de l'eau bouillante. Puis le mélange est lyophilisé (Bioblock Scientific CHRIST® alpha 1-4 LD plus) et conservé des tubes en polypropylène à fond conique de 25 mL à -80°C avant utilisation.

Le degré d'hydrolyse est calculé avec la formule d'Adler Nissen ou dans notre cas $N=1\text{mol.L}^{-1}$; $M_p = 14,72\text{ g}$; $h_{tot}=8,2$ (Zhao *et al*, 2007) et $\alpha^{-1} = 1,13$ (Adler Nissen *et al.*, 1983).

2.4 Dosages biochimiques

Les dosages biochimiques utilisés dans cette étude ont principalement visé à caractériser l'avancée de la réaction de Maillard en fonction des différents glucides utilisés et des différentes sources protéiques.

2.4.1 Dosage des fonctions aminés libres

Principe :

Pour comparer les différents produits finaux, un dosage à l'orthophtaldialdéhyde (OPA) est réalisé, d'après la méthode élaborée par Church *et al.* (1983). Cette méthode est basée sur la détection à 340 nm d'un complexe spécifique entre le réactif OPA et les amines primaires. Les résultats s'expriment en concentration équivalente en leucine (mM).

Mode Opératoire :

Le réactif OPA est réalisé extemporanément en mélangeant dans une fiole jaugée de 50 mL : 25 mL de tétraborate de sodium à 0,1M, 5 mL de Sodium Dodécyl Sulfate à 10%, 100 μL de β -mercaptoéthanol, 40 mg d'OPA dilué dans 1 mL d'éthanol et en ajustant le volume à 50 mL avec de l'eau distillée.

Les échantillons préparés à la dilution appropriée (afin d'obtenir une concentration comprise dans la gamme) sont centrifugés à 10 000 g pendant 30 minutes. A 50 μL du surnageant est ajouté 1 mL de réactif OPA. Les microtubes contenant le mélange sont vortexés puis placés à l'obscurité, à température ambiante, pendant 2 minutes. Une lecture d'absorbance (Libra S12, Biochrom, Milian, Suisse) est réalisée à 340nm dans des cuves en quartz.

Un contrôle est réalisé en substituant l'échantillon par 50 μl d'eau distillée. Lorsque les échantillons traités sont colorés, un blanc approprié a été effectué, en remplaçant la solution OPA par 1 mL d'eau distillée.

Le test est réalisé en quadruplat.

Traitement des données :

Les valeurs d'absorbances à 340nm sont converties en équivalent leucine (mM) au moyen d'une gamme étalon de Leucine, systématiquement renouvelée à chaque test.

Exemple

Equation des droites des courbes étalons :

$$A_{340nm} = 0,216*[Leucine (mM)] (R^2 = 0.9892)$$

$$A_{340nm} = 0,134*[Caséinate de Sodium (mg/ml)] (R^2 = 0.998)$$

$$A_{340nm} = 0,651*[Hydrolysats de crevette (mg/ml)] (R^2 = 0.974)$$

$$A_{340nm} = 0,237*[Caséinate de Sodium Hydrolysé DH = 6,5% (mg/ml)] (R^2 = 0.996)$$

$$A_{340nm} = 0,282*[Caséinate de Sodium Hydrolysé DH = 10% (mg/ml)] (R^2 = 0.991)$$

$$A_{340nm} = 0,352*[Caséinate de Sodium Hydrolysé DH = 13,5% (mg/ml)] (R^2 = 0.97)$$

2.4.2 Mesure du brunissement

L'intensité du brunissement non-enzymatique est un indicateur de l'avancée de la réaction de Maillard. Ce brunissement est dû à la formation de composés bruns, les mélanoidines au cours de la réaction. Cette méthode est complémentaire du dosage à l'OPA.

Les échantillons sont dissous dans de l'eau distillée à la concentration de 3 mg.mL⁻¹. Une lecture d'absorbance à 420nm est effectuée (330 μ L par puits) (Spectra max384 Plus, Molecular Devices, USA). Dans le cas où la valeur d'absorbance est supérieure à 1, des dilutions appropriées en eau distillée sont réalisées.

2.5 Evaluation des propriétés physico-chimiques

2.5.1 Solubilité des glycoconjugués

Principe :

L'étude de la solubilité dans différentes conditions, notamment de pH, donne une bonne indication sur les applications potentielles des protéines. Il en est ainsi du fait que la mesure du degré d'insolubilité est une mesure simple de la dénaturation-agrégation protéique et que les protéines montrent alors une faible aptitude à l'émulsification.

La méthode utilisée a été adaptée des travaux de Mu *et al.* (2009).

Mode Opérateur :

Une solution mère de chacun des échantillons est préparée à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans de l'eau distillée. Cette solution est alors aliquotée (4 mL) dans des pots en polypropylène de 40 mL où le pH est ajusté avec de la soude (NaOH 0,5 M) ou de l'acide (HCl 0,5 M) pour une gamme de pH allant de 3 à 9 (Mettler delta 340, AES Laboratoire, France). Après l'ajustement du pH, de l'eau distillée est ajoutée à la solution pour obtenir une concentration finale de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ (volume final 20 mL). Une lecture d'absorbance à 220 nm est effectuée ($330 \mu\text{L}$ par puit). (Polar star Omega, BMG LABTECH, Allemagne).

Les échantillons sont alors centrifugés en microtube (Hermle Z233MK-2, Allemagne) à 3000 g pendant 15 minutes. Une seconde lecture d'absorbance sur le surnageant est réalisée ($330 \mu\text{L}$ par puit).

Chaque lecture est réalisée en quadruplat.

Traitement des données :

On exprime la solubilité (en %) comme le rapport de l'absorbance du surnageant (A_{sur}) et de l'absorbance de la solution (A_{sol}).

$$S(\%) = \frac{A_{surnageant}}{A_{solution}} * 100$$

2.5.2 Mesure de la tension de surface

Principe

La tension superficielle est déterminée en mesurant la traction juste avant que la lame de Wilhelmy ou l'anneau de du Noüy se détache de la surface du liquide. La détermination peut être réalisée en arrachant l'anneau ou la lame du liquide ou en effectuant des oscillations verticales qui n'entraînent pas l'arrachage.

Mode Opérateur :

Une solution mère de chacun des échantillons de caséinate de sodium est préparée à 1 g.L⁻¹ dans de l'eau distillée. Dans le cas des échantillons d'hydrolysate de crevette, cette solution mère est préparée à 10 g.L⁻¹ dans de l'eau distillée.

Dix ml de solution sont versés dans un cristalliseur placé dans l'enceinte du tensiomètre (K100, Krüss). La lame de Wilhelmy est plongée de 3 mm dans la solution. La mesure de tension de surface est calculée par tension générée lors de l'oscillation verticale (2mm) de la lame dans le liquide.

Pour chaque solution, la mesure est répétée 10 fois et entre chaque échantillon une mesure de la tension de surface de l'eau distillée est réalisée comme contrôle.

Toutes les mesures ont été réalisées à 21°C.

2.5.3 Cinétique de déphasage des émulsions

Préparation des émulsions :

Les solutions aqueuses contenant les sources protéiques natives ou leur glycoconjugué sont préparées par dissolution de 250 mg d'échantillon dans 250 mL (soit 0,1 % pour obtenir 0,05 % au final dans l'émulsion huile/eau 50/50) d'eau distillée et agitées pendant 30 minutes. Le pH des solutions est mesuré en utilisant un pH mètre (Mettler delta 340, AES Laboratoire, France) équipé d'une électrode de verre.

Dans le cas de l'ajustement de pH, les solutions aqueuses ont été préparées à pH 4,5 ou pH 7. Elles sont alors préparées par dissolution de 250 mg d'échantillon dans 200 mL d'eau distillée. Le pH est ajustée à pH 4,5 ou pH 7 avec de la soude (NaOH 0,5 M) ou de l'acide (HCl 0,5 M) (Mettler delta 340, AES Laboratoire, France). Après l'ajustement du pH, de l'eau distillée est ajoutée à la solution pour obtenir une concentration finale de 0,1% (p/p) soit un poids final de 250g de solution.

Les émulsions sont fabriquées à un ratio huile/eau de 50/50. La concentration finale de produit dans l'émulsion est de 0,05 % (p/p). La solution aqueuse (100 g) est d'abord versée dans un bécher et le même poids d'huile de Tournesol commerciale (Coeur de Tournesol®, Lesieur™, France, Densité mesurée= 0,93) est lentement ajouté. Le processus d'émulsification est réalisé à

température ambiante par mélange avec un Ultra-Turrax® (IKA™, France) à 18 000 rpm pendant 90 secondes (figure 2.8). Le mélangeur est placé à 1 cm du fond du bécher.

Deux séries d'émulsions ont été réalisées, une sans ajustement de pH et la seconde avec ajustement du pH (4,5 ou 7) de la solution aqueuse avant émulsification.

Suivi de l'évolution de la fraction volumique de phase dispersée :

Afin de suivre l'évolution de la fraction volumique de phase dispersée, la cinétique de la libération de la phase aqueuse par l'émulsion au cours du temps a été mesurée. Plus celle-ci est importante ou apparaît tôt, moins l'émulsion est considérée comme stable.

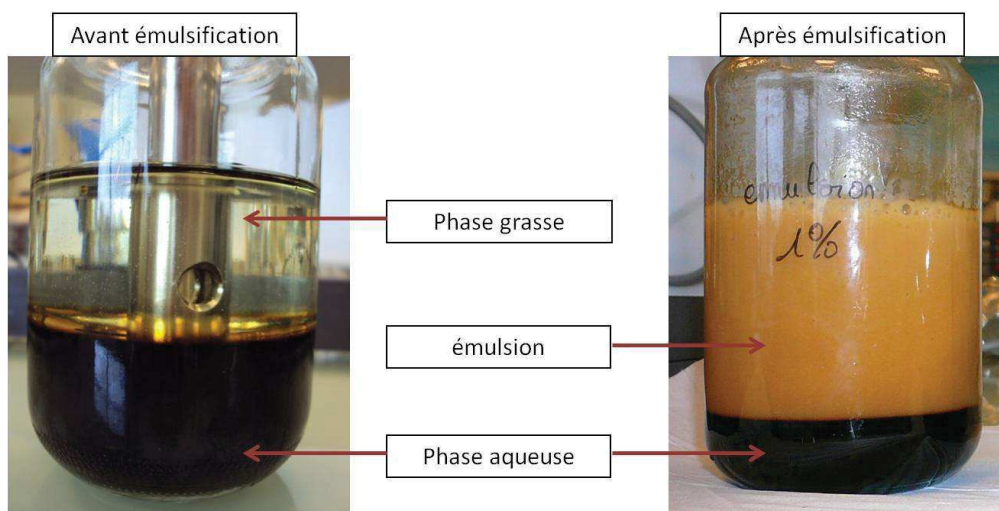


Figure 2.8 : Emulsion huile/solution aqueuse 50/50 (p/p) avant et après homogénéisation par Ultra-Turrax

Dès l'arrêt de l'émulsification, l'émulsion est versée dans un tube en verre gradué (de 20 mL). La cinétique de l'évolution de la fraction volumique de la phase dispersée (Φ en %) est évaluée grâce au front de séparation (Rodriguez Rojas,2007).

$$\Phi (\%) = \frac{V_D}{V_D + V_C} * 100$$

Avec : Φ la fraction volumique de la phase dispersée (%)

V_D le volume de la phase dispersée (ml)

V_C le volume de la phase continue (ml)

L'évolution du front de déphasage a été suivie pendant une période de 4 heures, selon les protocoles définis par Moates *et al.* (2001) et Chanamai et McClements (2000), à une température de 20°C. Un colorant bleu (E 131 à 0,001% (p/p)) a été ajouté aux émulsions afin de faciliter l'observation du front de séparation des phases. Il a été vérifié que ce colorant n'avait aucun effet sur les propriétés émulsifiantes. La figure 2.9 montre un exemple de suivi du front de séparation des phases d'une émulsion.

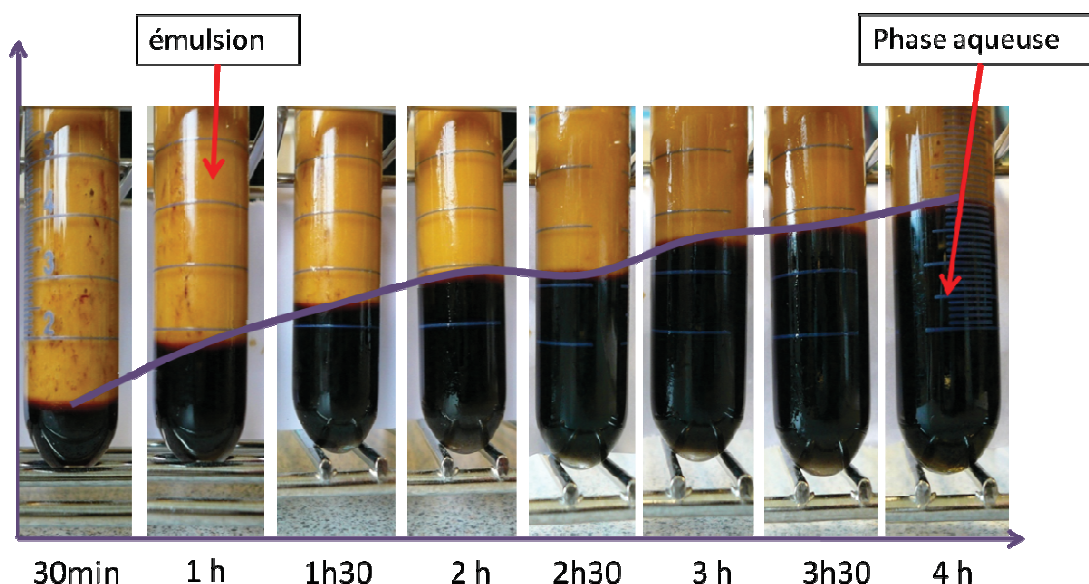


Figure 2.9 : Exemple de cinétique de l'évolution du front de séparation des phases d'une émulsion.

Chaque émulsion a été préparée en double et trois suivis de la cinétique de crémage sont réalisés par émulsion.

2.5.4 Mesures rhéologiques

2.5.4.1 Mesures de la viscosité

Principe :

La rhéologie est l'étude de la déformation et de l'écoulement de la matière sous l'effet d'une contrainte appliquée.

La viscosité d'un fluide est due à des frottements qui s'opposent au glissement des couches fluides les unes sur les autres. Les phénomènes dus à la viscosité des fluides ne se produisent que lorsque ces fluides sont en mouvement. La mesure de la viscosité revient à mesurer la force nécessaire (force de cisaillement) à la mise en mouvement du fluide.

Les courbes d'écoulement ont été réalisées avec un viscosimètre Haake VT 550 (Figure 2.10) et du Module NV. Le module utilisé sert aux émulsions de faibles viscosités.



Figure 2.10 : Viscosimètre Haake VT 550 utilisé dans l'étude

Mode opératoire :

Après émulsification, 9 mL d'émulsion sont versés dans le godet du module du viscosimètre. L'émulsion est alors soumise à un gradient de cisaillement allant de 0 à 500 s⁻¹ en 120 s. La viscosité apparente à 13 s⁻¹ et 103 s⁻¹ est mesurée. Les courbes d'écoulements obtenues ont été modélisées avec le modèle d'Ostwald :

$$\tau = KD^n$$

Avec τ la contrainte appliquée (Pa)
D le taux de cisaillement (s⁻¹)
K : le coefficient de consistance (Pa.s)
n : indice de comportement

2.5.4.2 Mesures oscillatoires

Ces mesures rhéologiques ont été réalisées sur des émulsions présentant des cinétiques d'évolution de fronts de séparation proches (CS natif, CS Dex maillardisé en tampon phosphate et SH Xyl maillardisé en tampon phosphate).

La fabrication des émulsions est la même que celle utilisée pour le suivi du front de séparation. La concentration en échantillons dans l'émulsion est de 0,05% pour le CS et CS Dex maillardisé en tampon phosphate. Toutefois dans le cas de l'hydrolysate de crevette maillardisé avec le Xylose en présence de tampon phosphate, la concentration en échantillon dans l'émulsion a été augmentée d'un facteur 10, soit une concentration finale de 0,5%. Cette augmentation a été réalisée afin de prévenir l'apparition d'une couche huileuse au dessus de l'émulsion qui perturbait le prélèvement des échantillons et la reproductibilité des mesures.

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un rhéomètre (ARES, TA instrument, USA) en géométrie plan-plan (entrefer 1mm) avec du papier de verre 80 μ m à 20°C. L'échantillon est prélevé à la spatule deux heures après la fabrication de l'émulsion. Deux types de mesures rhéologiques ont été réalisées : _ balayage en déformation (1Hz de 0,1 à 1000%)
_ balayage en fréquence (0,1Hz à 15Hz à 0,5%).

2.6 Evaluation de l'activité antiradicalaire

Une des conséquences de la réaction de Maillard est la production de composés possédant des activités biologiques telles que antioxydantes antimicrobiennes ou encore antimutagènes.

Dans notre étude, nous nous sommes focalisé sur les propriétés antioxydantes des produits.

2.6.1 Dosage du fer réducteur

Principe :

La détermination du pouvoir réducteur est basée sur la transformation des ions ferriques (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}), en présence d'une substance potentiellement réductrice. L'apparition des ions (Fe^{2+}) est révélée par l'ajout dans le milieu d'ions chlorure, qui formeront avec les ions (Fe^{2+}) du $FeCl_2$ de couleur bleu vert, absorbant à 700nm. Le test a été adapté à partir de la méthode de référence (Oyaizu, 1986).

Mode opératoire :

A 250 μ L d'échantillon sont ajoutés 250 μ L de tampon phosphate de sodium (0,2 M pH 6,6) et 250 μ L de solution de ferricyanure de potassium à 1 % (w/v). Les microtubes contenant le

mélange sont homogénéisés et placés au bain-marie (20 min ; 50°C). On introduit ensuite 250 μL de solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 10 % (w/v) avant que le mélange ne soit centrifugé (15 min ; 5000 g). Les échantillons sont ensuite dilués au demi, en prélevant 500 μL du surnageant que l'on ajoute à 500 μL d'eau distillée et 200 μL d'une solution de FeCl_3 à 0,1 % (w/v). Le mélange est vortexé et placé pendant 10 minutes à température ambiante, avant d'être à nouveau homogénéisé. Une lecture d'absorbance à 700 nm est alors effectuée (330 μL de mélange réactionnel dans chaque puits de microplaque) (Polar star Omega, BMG LABTECH, Allemagne). Une dilution, en eau distillée, peut être réalisée si l'absorbance est supérieure à 1.

Chaque échantillon est testé à différentes concentrations ; de 1 à 80 mg.mL^{-1} pour le caséinate de sodium et de 0.1 à 20 mg.mL^{-1} pour les hydrolysats de crevette et de caséinate.

Deux témoins positifs sont systématiquement inclus dans ce dosage, par substitution de l'échantillon avec 250 μL d'acide ascorbique à 1 mg.mL^{-1} ou 250 μL de BHA à 2,5 mg.mL^{-1} . Le contrôle correspond au système dont les 250 μL d'échantillon ont été remplacés par 250 μL d'eau distillée.

Les systèmes réactionnels sont préparés en duplicat, de même pour les mesures d'absorbance.

Traitement des données :

Le pouvoir réducteur d'une substance est évalué par comparaison entre la courbe représentative de l'absorbance à 700 nm en fonction de la concentration en échantillon et la courbe homologue obtenue en présence de la molécule de référence (acide ascorbique). Plus la DO à 700 nm est élevée, plus le pouvoir réducteur d'une substance est important.

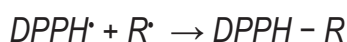
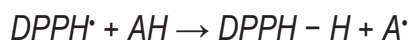
La concentration nécessaire pour atteindre une DO égale à 0,5 est déduite des courbes et traduit l'efficacité de l'échantillon : plus cette valeur est faible, plus l'échantillon est actif.

2.6.2 Dosage au DPPH

Principe :

Ce test traduit la capacité d'une substance à piéger le DPPH \cdot (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl), un radical libre stable. Lorsque ce composé se trouve en solution dans l'éthanol, il

présente une coloration violette foncée détectée à 520nm. Si une substance susceptible de piéger les radicaux libres est ajoutée au milieu réactionnel, l'électron célibataire du DPPH• s'apparie. Il s'ensuit une décoloration, pouvant aller jusqu'au jaune, en rapport avec le nombre d'électrons neutralisés. Le mode de piégeage du radical DPPH s'effectue selon deux types de réactions (Brand-Williams *et al.*, 1995) :



Il est généralement admis que ce dosage met en jeu un mécanisme d'échange d'électrons (Huang *et al.*, 2005), mais le mécanisme d'échange de protons ne peut être exclu dans certains cas (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006 ; Prior *et al.*, 2005).

Mode opératoire :

Le protocole suivi repose sur la méthode décrite par Morales et Jiménez-Pérez (2001), également appliquée au dosage des produits de la réaction de Maillard. A 200 μ L d'échantillon préparé à la dilution appropriée est ajouté 1 mL de solution éthanolique de DPPH• à 74 mg.L⁻¹. Les microtubes contenant le mélange sont vortexés et incubés à 25°C pendant 1 heure (soit jusqu'à ce que la réaction soit parvenue à son terme). Afin de s'affranchir du pH, les échantillons sont préparés dans du tampon phosphate (pH 6,6). Une fois l'incubation terminée, les microtubes sont centrifugés (Hermle Z233MK-2, Allemagne) (10 000 g ; 10 min) et une lecture d'absorbance à 520 nm est réalisée sur le surnageant (test en microplaque ; 330 μ L par puits) (Polar star Omega, BMG LABTECH, Allemagne).

Un contrôle est réalisé par substitution de l'échantillon par 200 μ L d'eau distillée. Les témoins positifs correspondent aux tubes contenant 200 μ L de Trolox® (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique) à 400 μ M ou d'hydroxyanisole butylé (BHA) à 2,5 mg.ml⁻¹. Lorsque les échantillons sont colorés, un blanc approprié a été effectué, en remplaçant la solution de DPPH• par 1 mL d'éthanol.

Le test est réalisé en quadruplat.

Traitement des données :

Les valeurs d'absorbance à 520nm sont converties en pourcentage de DPPH[•] résiduel au moyen d'une gamme étalon de DPPH[•]; systématiquement renouvelée lors de chaque test.

Exemple :

Equation de la droite de la courbe étalon :

$$A_{520nm} = 0,0159 * (\%DPPH_{\text{résiduel}}) + 0,0278 \quad (R^2 = 0,9999)$$

L'activité antiradicalaire (AAR) peut alors être calculée selon la formule suivante, après correction pour le facteur de dilution de la solution testée :

Avec $\%DPPH_{\text{résiduel}}^{\text{échantillon}} =$ pourcentage de $\%DPPH_{\text{résiduel}}$ obtenu en présence d'échantillon (%)

$\%DPPH_{\text{résiduel}}^{\text{eau}} =$ pourcentage de $\%DPPH_{\text{résiduel}}$ obtenu en présence d'eau distillée (%)

Au final, les résultats peuvent être exprimés en μM équivalent Trolox[®] grâce à la droite de calibration présentée dans la figure 2.11.

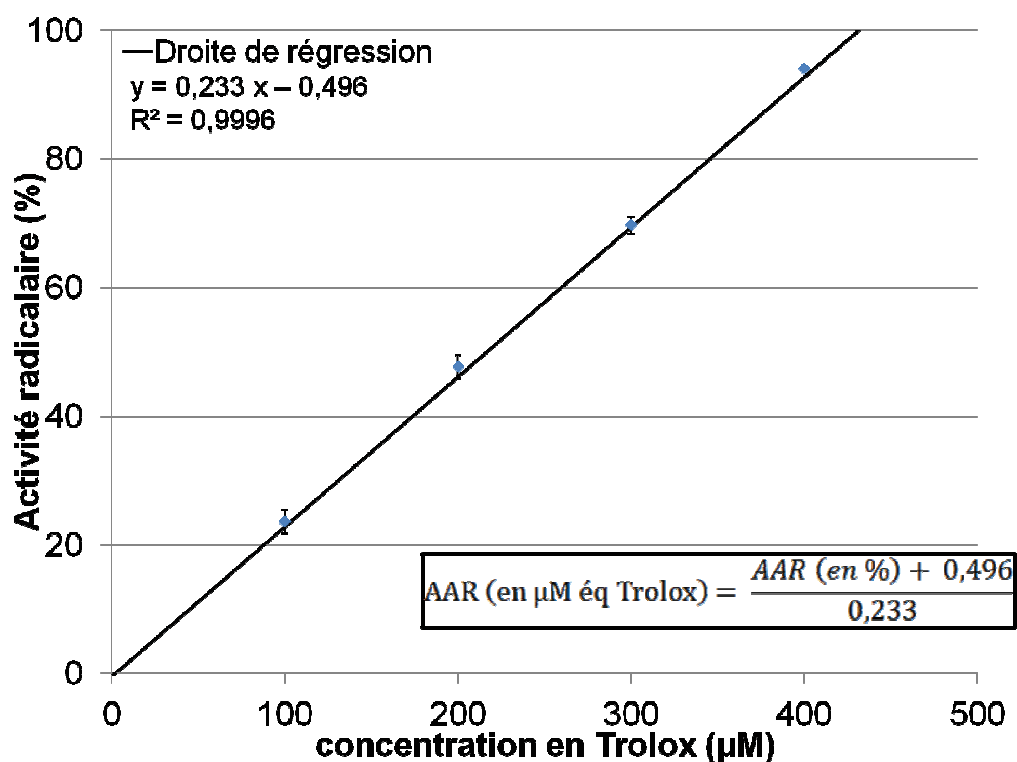


Figure 2.11 : Gamme étalon utilisée pour l'expression de l'activité antiradicalaire (test DPPH[•]) en μM éq trolox.

Chaque échantillon a été dosé sur une gamme de concentrations croissantes. La courbe représentative de l'activité en fonction de la concentration en échantillon permet de calculer l'AC₅₀, concentration pour laquelle l'activité est égale à 50 %. Cette grandeur est d'autant plus faible que l'échantillon testé est actif. Le principe de la détermination de l'AC₅₀ est illustré dans la figure 2.12.

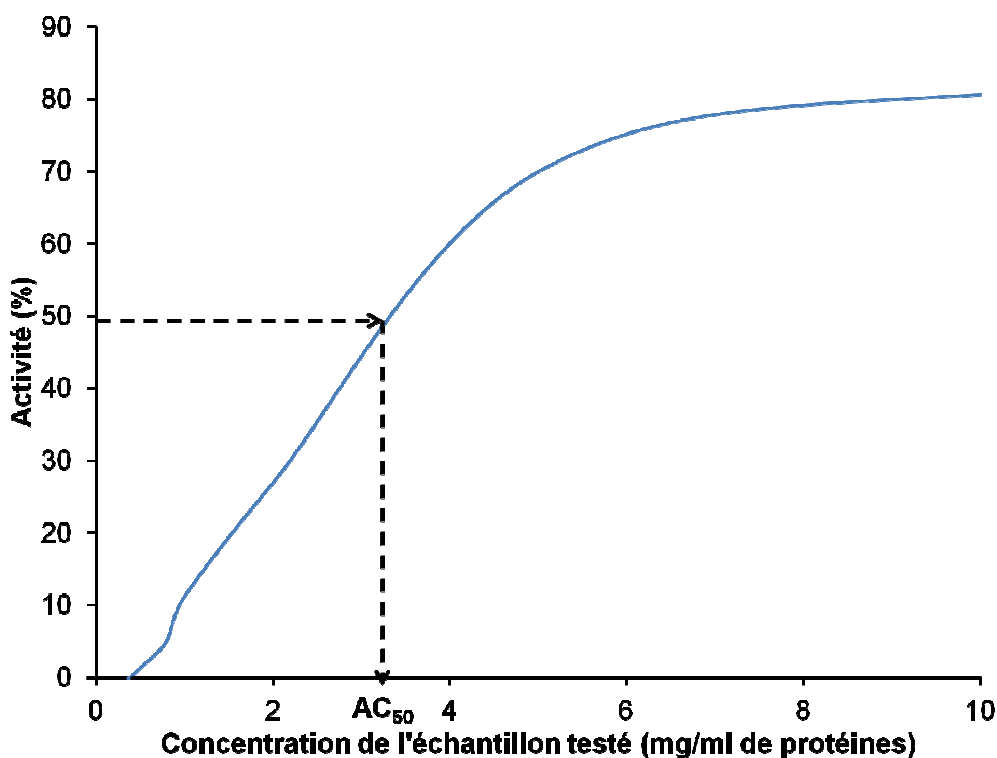


Figure 2.12 : Principe du calcul de l'AC₅₀

2.6.3 Pouvoir chélateur

Principe :

L'utilisation de la méthode ferrozine permet d'évaluer *in vitro*, le pouvoir chélateur. En effet, le fer libre dans le milieu sera stabilisé par la ferrozine formant un complexe ferrozine - Fe²⁺ de couleur violette prononcée. La quantification de ce complexe par spectrophotométrie renseigne sur la quantité de fer non chélaté et donc sur la capacité des substances à piéger le fer.

Mode Opérateur :

Le protocole suivi a été adapté de la méthode de Zhao *et al.* (2006).

Dans un puit de microplaque, 10 μL d'échantillon sont déposés auxquels sont ajoutés 5 μL d'une solution de FeCl_2 à 2 mM. Le mélange est laissé pendant 5 minutes à température ambiante. On ajoute alors 10 μL de Ferrozine à 5 mM et 275 μL d'eau distillée. Une lecture d'absorbance à 562 nm est réalisée après 10 minutes de repos à température ambiante.

Un contrôle est réalisé par substitution de l'échantillon par 10 μL d'eau distillée. Une gamme étalon de 100 à 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ avec de l'EDTA est réalisée (Ethylene Diamine Triacétique acid).

Traitement des données :

Le pourcentage d'inhibition de la chélation du fer (PI) est calculée selon la formule suivante, après correction par le facteur de dilution de la solution testée :

$$PI = \frac{(DO_{\text{témoin}} - DO_{\text{échantillon}})}{DO_{\text{témoin}}} * 100$$

Chaque échantillon a été dosé sur une gamme de concentrations croissantes. La courbe représentative de l'activité en fonction de la concentration en échantillon permet de calculer l'IC₅₀, concentration pour laquelle l'inhibition est égale à 50 %. Cette grandeur est d'autant plus faible que l'échantillon testé est actif. Le principe de la détermination de l'IC₅₀ est le même que celui de l'AC₅₀ dans le test DPPH (voir figure 3.11).

2.7 Analyse des PRM par chromatographie d'exclusion de taille

Lors d'une chromatographie d'exclusion stérique, les composés sont séparés en fonction de leur poids moléculaire (PM) grâce à la phase stationnaire qui retient les composés de petite taille plus longtemps dans la colonne. La solution contenant les molécules à séparer est entraînée par la phase mobile dans la colonne et passe à travers le gel constitué de billes poreuses (phase stationnaire). Les petites et moyennes molécules peuvent entrer dans les pores mais les plus grosses en sont exclues, ces molécules incluses dans les pores ont donc une vitesse de migration plus faible que les grosses molécules.

Les chromatographies sont réalisées à moyenne pression (SEC-FPLC) avec un injecteur automatique (module Water 717 plus), une pompe (module Waters 600) et un détecteur à barrettes de diodes (module Waters 996) qui permet une détection sur une large plage de longueur d'ondes. La détection est réalisée entre 200 et 500 nm et les chromatogrammes sont extraits à 220 nm, 280 nm et 420 nm. Le système est piloté par le logiciel Empower® (Waters).

Deux colonnes de chromatographie ont été utilisées.

La première est une Superdex™ Peptides HR 10/300GL (GE Healthcare). Son domaine de fractionnement est compris entre 7000 et 100 Da. La matrice est composée d'un gel poreux réticulé d'agarose et de Dextran (diamètre des pores de 13-15 μ m; VT = 24mL). Les solutés sont élués par un mélange acétonitrile :eau + 0,1% TFA (30% :70%) (Guérard *et al.*, 2001).

La courbe d'étalonnage (figure 2.13) est obtenue par injection de 7 standards : cytochrome C (12327 Da) , apoprotine (6512 Da), chaîne B de l'insuline (3495,9 Da), neurotensine (1672,9 Da), substance P (1347,6 Da), substance P fragment 1-7 (900 Da), leupeptine (463 Da).

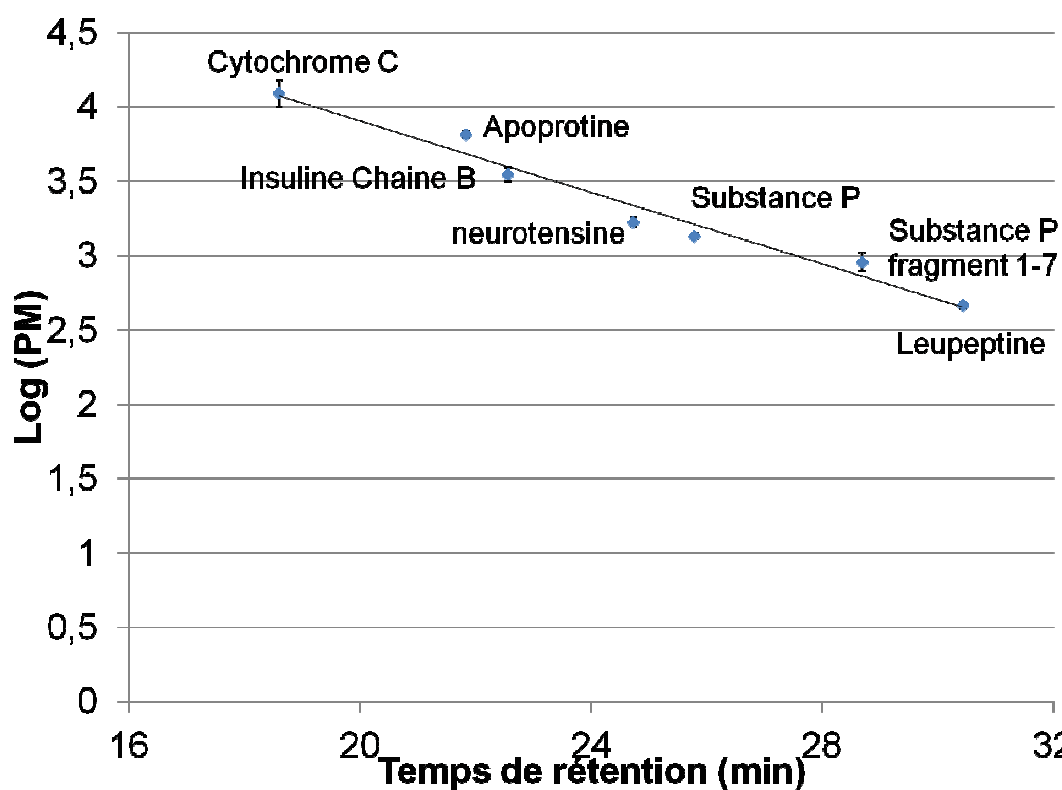


Figure 2.13 : Courbe d'étalonnage obtenue pour la colonne Superdex Peptides HR 10/300GL

L'équation de la courbe est:

Avec: - PM : poids moléculaire de la substance (Da)

- R_T : temps de rétention (min)

La seconde est une colonne Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare). Son domaine de fractionnement est compris entre 600 et 10kDa. La matrice est composé d'un gel poreux réticulé d'agarose et de Dextran (diamètre des pores de 13-15 μ m; VT = 24mL). Les solutés sont élués par du tampon phosphate 50mM (pH 7) + 0.15M de NaCl.

La courbe d'étalonnage (figure 2.14) est obtenue par injection de 5 standards : apoferritine (443 000 Da), alcool déshydrogénase (150 000 Da), albumine (66 000 Da), anhydrase carbonique (29 000 Da), et cytochrome C (12 327 Da).

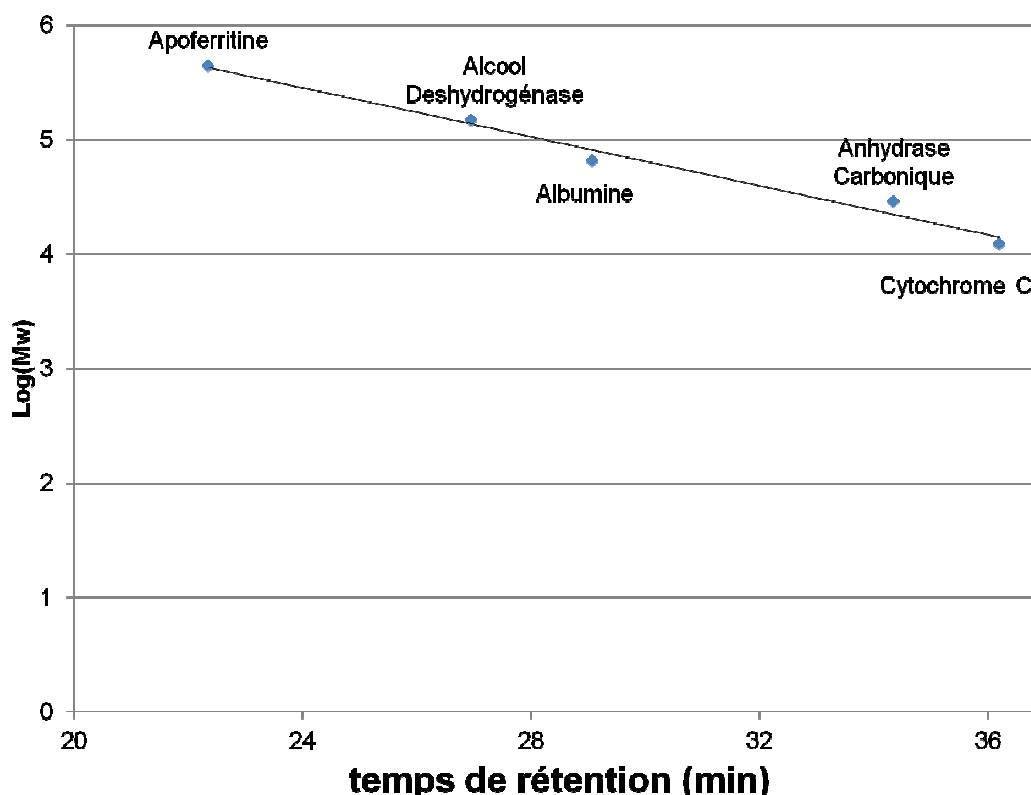


Figure 2.14 – Courbe d'étalonnage obtenue pour la colonne Superdex 200 10/300GL

L'équation de la courbe est :

$$\text{Log}(PM) = -0,107 R_T + 9,02$$

$$R^2 = 0.98$$

Avec: - PM : poids moléculaire de la substance (Da)

- R_T : temps de rétention (min)

Les échantillons sont dissous à la concentration de 5 mg.mL⁻¹ ou 3,125 mg.mL⁻¹ en protéines. Les échantillons sont filtrés sur des filtres Millex®-GV de 4mm qui ne laissent passer que des fractions de diamètre inférieur à 0,22µm, ils sont alors placés dans des vials de 40 mm de long sur 8,2 mm (Chromoptic SAS, France). On injecte 50 µL d'échantillon.

2.8 Traitements statistiques

Deux grands types de tests sont effectués. Les tests que l'on peut qualifier de préliminaires puis les tests pour l'interprétation des résultats.

Parmi les tests préliminaires, on trouve le test de Shapiro et Wilk qui donnent la normalité de la distribution et le test de Bartlett qui est un test d'homogénéité des variances.

Une fois que l'on a montré que la distribution était normale et que les variances étaient homogènes, on réalise une analyse de la variance (ANOVA). L'ANOVA permet de déterminer les facteurs et les interactions significatives. Grâce aux résultats de l'ANOVA, on peut aussi calculer les coefficients du modèle et vérifier sa validité théorique. Un des derniers points est la validité pratique du modèle.

Le test de la plus petite différence significative a été réalisé sur les différents dosages réalisés ($p < 0.05$).

Ces différents tests ont été réalisés avec le logiciel StatGraphics version 4. Des tests d'analyses de variances et de significativité ($p < 0,05$ ou $p < 0,01$) sont effectués.

3 Résultats et discussion

3.1 Mises en œuvre et validation des conditions de réaction de Maillard et de l'émulsion modèle

3.1.1 Maîtrise du procédé de la réaction de Maillard en milieu sec

3.1.1.1 Milieux réactionnels et conditions de réaction

Des travaux antérieurs du laboratoire ont porté sur la réaction de Maillard en milieu liquide. Les conditions de réaction alors utilisées, impliquaient des hydrolysats protéiques et des oses, dans le but de produire des composés présentant une capacité antioxydante. Les aspects mécanistiques de ces réactions ont permis de mettre en évidence les effets de la concentration en oses, l'impact du tampon phosphate ou de la nature de l'ose utilisé (Guérard *et al.*, 2007 ; Laroque *et al.*, 2008). Ainsi, une base de connaissance sur la réaction de Maillard en milieu liquide avec des oses simples a été constituée. Parallèlement, les propriétés émulsifiantes de ces mêmes hydrolysats glyqués ont été étudiées (Decourcelle *et al.*, 2010). Il a ainsi été observé que le glucide le plus réactif lors de la réaction de Maillard permettait de modifier significativement les propriétés émulsifiantes de l'hydrolysat natif.

Les perspectives d'études de la réaction de Maillard impliquant des hydrolysats de protéines sont intéressantes. En effet, des études sur le greffage entre oses et protéines par glycation pour obtenir de nouvelles propriétés fonctionnelles sont encore à explorer. Ainsi, au regard des précédents travaux menés au laboratoire, l'obtention de conditions permettant de combiner au sein d'un glycoconjugué des propriétés antioxydantes et émulsifiantes a été envisagée.

Pour ceci, une synthèse de la littérature scientifique nous a montré l'intérêt grandissant concernant l'utilisation de glucides complexes comme le Dextran lors de la glycation (Zhang *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2012 ; Álvarez *et al.*, 2012 ; Corzo-Martinez *et al.*, 2010 ; Mu *et al.*, 2006). Cependant, l'utilisation de tels glucides nécessite des conditions de réaction de Maillard différentes de celles que nous utilisons, soit une réaction en milieu sec (a_w faible) avec une humidité relative contrôlée (Gu *et al.*, 2010 ; O'Regan et Mulvihill, 2010 ; Erçelebi et Ibanoglu, 2009). Nos conditions d'étude initialement en milieu liquide, ont donc dû être adaptées.

Cependant, certaines conditions devaient tout de même être transposées dans ce nouveau protocole. La réaction de Maillard conduite dans cette étude a ainsi été réalisée, à une température peu élevée et dans des conditions modérées. Ceci permet de limiter l'apparition de composés indésirables de type cytotoxiques ou mutagènes.

Comparaison milieu sec/milieu liquide

Avant de débiter les travaux de thèse, les conditions de milieu liquide utilisées antérieurement au laboratoire ont été comparées aux conditions en milieu sec choisies pour l'étude (Laroque *et al.* 2008). Pour cette étude préliminaire, nous nous sommes limités au glucide le plus réactif (Xylose) et à celui le moins réactif (Dextran), parmi les quatre étudiés. Pour les milieux liquides, la concentration des solutions en hydrolysate de crevette était de 150mg.ml⁻¹ et celle en glucides (Xylose et Dextran) de 90mg.ml⁻¹. Ces composés ont été dissouts dans une solution aqueuse contenant du tampon phosphate (0,3M ; pH 6.5). Les solutions obtenues ont été ensuite chauffées à 50°C pendant 48h (tubes à essai placé dans un bain thermostaté). Parallèlement, un mélange des mêmes réactants a subi une réaction de Maillard en milieu sec selon les conditions décrites dans la partie 2.2. De plus, pour ces deux conditions de RM, une série de tubes a été agitée alors qu'une autre est restée statique.

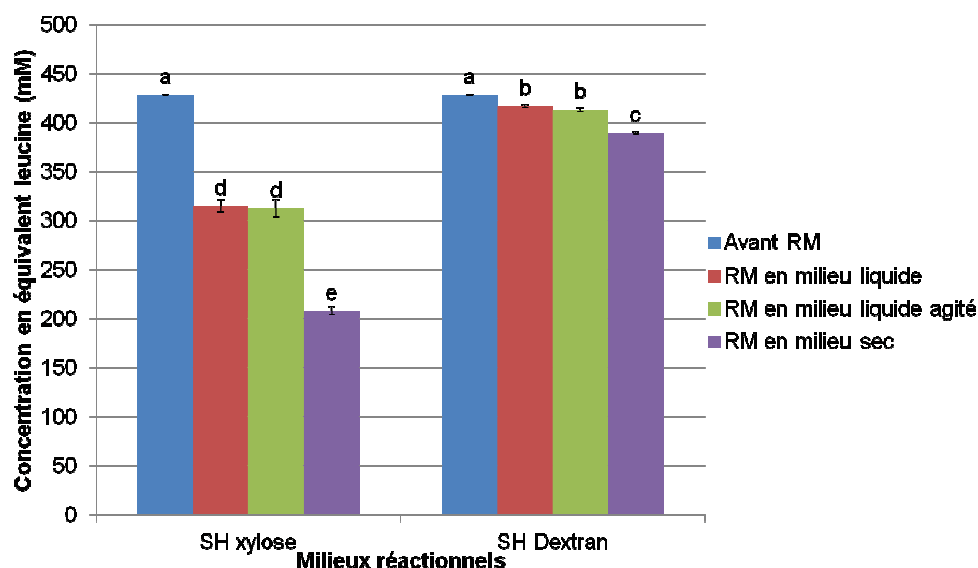


Figure 3.1 : Quantification du nombre de groupements aminés libres avant et après réaction de Maillard entre l'hydrolysate de crevette et le Xylose ou le Dextran dans différents milieux réactionnels.

La figure 3.1 montre la quantification du nombre de fonctions aminées libres des produits issus de cette étude préliminaire. Celles-ci ont été dosées par la méthode de l'OPA, avant et après glycation. Plus le glucide a réagi avec la protéine, et moins la quantité de fonctions aminées résiduelles est importante après la glycation.

Quel que soit le glucide observé, la figure 3.1 montre une diminution statistiquement significative des groupements aminés libres après glycation comparativement aux témoins, mais ne montre pas de différences significatives entre le milieu agité et non agité. Elle montre également que la glycation en milieu sec permet d'obtenir la diminution des groupements aminés libres statistiquement significative la plus importante, comparativement aux milieux liquides. Ceci s'observe aussi bien avec le Xylose qu'avec le Dextran. La réactivité entre les groupements α -aminés et les groupements carbonyles pourrait être accrue par la faible activité de l'eau dans le cas d'un milieu sec (Kato, 2002).

La figure 3.1 montre de plus que la diminution du nombre de fonctions aminées libres est plus importante lorsque la glycation est réalisée avec du Xylose comparativement au Dextran. En effet, Drusch *et al.* (2009) montrent que les glucides simples sont plus réactifs que les glucides complexes. Ceci est, entre autres, lié au nombre de glucides présents dans le mélange sous forme acyclique, qui est la forme réactive. La proportion de formes acyclique/cyclique dans les mélanges réactionnels dépend notamment de la stabilité thermique du glucide. Plus celui-ci est stable thermiquement, moins il existe sous la forme acyclique (Oliver *et al.*, 2006 ; Corzo-Martinez *et al.*, 2010)

Ainsi, conduire la réaction de Maillard en milieu sec semble plus approprié pour augmenter le taux de glycation et permettre l'utilisation de glucides complexes moins réactifs que les glucides simples. La réaction de Maillard a donc été conduite en milieu sec pour la suite de la thèse.

Impact du taux d'humidité relative sur la glycation en milieu sec.

Dans cette partie sont présentés les résultats de la mise au point du protocole de la RM en atmosphère contrôlée (cf. page 85).

Premièrement, il a fallu déterminer une méthode de contrôle de l'humidité relative dans l'enceinte. Dans la littérature, ce sont des solutions salines qui sont utilisées, comme l'iodure de potassium (KI), le chlorure de sodium (NaCl) ou le bromure de potassium (KBr) (Hassan *et al.*, 2007 ; Wooster et Augustin, 2007 ; Ter Haar *et al.*, 2011), pour contrôler des humidités relatives.

La solution saline doit être choisie en fonction de la température et de l'humidité relative recherchée. D'après la littérature, pour les réactions de Maillard en milieu sec, les humidités relatives sont comprises entre 60 et 85% (Kato, 2002 ; Acevedo *et al.*, 2006 ; Le *et al.*, 2011), et la température de la RM pour la thèse a été fixée à 50°C.

Nous avons retenu deux humidités relatives citées dans la littérature pour des RM, soit 65% (Jiménez-Castaño *et al.*, 2005 ; Ter Haar *et al.*, 2011) et 75% (Drusch *et al.*, 2009 ; Xu *et al.*, 2010). Ces humidités relatives sont obtenues à 50°C avec une solution saturée de chlorure de sodium pour la première, et d'iodure de potassium pour la seconde. Ces deux humidités relatives ont été testées selon le protocole présenté dans le matériel et méthode, partie 2.2, lors d'une glycation entre l'hydrolysate de crevette et le Xylose, le Glucose ou les FOS (figure 3.2).

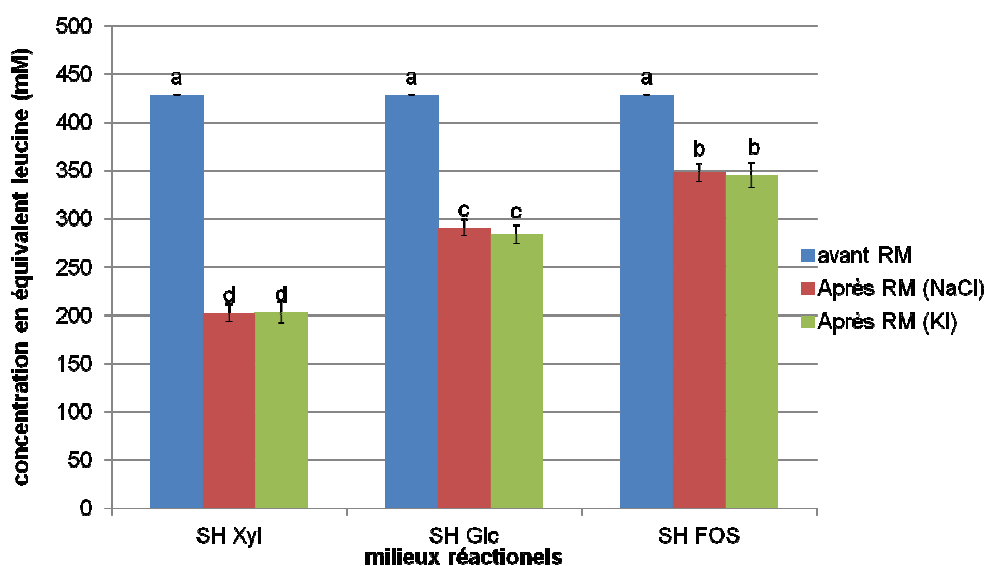


Figure 3.2 : Quantification du nombre de groupements aminés libres avant et après réaction de Maillard en milieu sec. La RM s'est déroulée entre l'hydrolysate de crevette (SH) et le Xylose (Xyl), le Glucose (Glc) ou les FOS, et en présence de deux humidités relatives différentes (NaCl : 65 % ; KI : 75 %).

La figure 3.2 présente la quantité de fonctions aminées libres avant et après réaction de Maillard en milieu sec à deux humidités relatives pour les mélanges SH-Xyl, SH-Glc et SH-FOS. Celle-ci est exprimée en équivalent leucine (mM). Tout d'abord, les résultats montrent que la réaction de Maillard s'est bien déroulée (diminution statistiquement significative des fonctions aminées libres comparativement au témoin), que ce soit à 65 % ou 75 % d'humidité relative. Cependant, on remarque que pour chaque milieu réactionnel, il n'y a pas de différences

significatives entre les deux taux d'humidités relatives sur la diminution du nombre de fonctions aminés libres après la réaction de Maillard.

Compte tenu de ces résultats, le type de solution saturée permettant le contrôle de l'humidité relative dans l'enceinte de réaction a été sélectionné pour la suite de la thèse, le prix des sels ayant été déterminant. Ainsi, on considère, à 25°C que les solutions sont saturées à partir d'une concentration de 1g.mL⁻¹ pour l'iodure de potassium et de 0,35g.mL⁻¹ pour le chlorure de sodium. L'iodure de potassium étant 3,5 fois plus onéreux que le chlorure de sodium, le chlorure de sodium a été retenu. Nous avons donc choisi de réaliser les réactions de Maillard avec le chlorure de sodium, permettant d'obtenir une humidité relative de 65% à 50°C.

3.1.1.2 Reproductibilité du protocole de fabrication des PRM

Plusieurs mesures ont été mises en place pour contrôler le protocole de réaction de Maillard et vérifier que les productions étaient reproductibles.

En premier lieu, les cinétiques de température et d'humidité relative dans l'enceinte hermétique ont été mesurées pendant les réactions grâce à un thermohygromètre (Testo 175T1, testo, Allemagne). De plus, l'évaluation de la reproductibilité entre chaque fabrication s'est faite par l'intermédiaire de l' a_w des produits en fin de production, du dosage OPA, de la mesure du brunissement et des propriétés émulsifiantes. Pour l'évaluation de la reproductibilité, plusieurs fabrications ont été réalisées avec un même mélange protéines/glucides.

Evolution de l'humidité relative (%) et de la température (°C) au cours de la RM

Comme vu précédemment, afin de créer l'humidité relative désirée au cours de la RM, une solution de chlorure de sodium saturée a été introduite dans les dessiccateurs en présence des mélanges protéine/glucide. Dans le même temps, un thermohygromètre a été introduit dans les dessiccateurs afin de contrôler l'humidité relative produite. Le dessiccateur a été ensuite hermétiquement fermé. La figure 3.3 montre les cinétiques d'humidité relative et de température produites dans l'enceinte du dessiccateur au cours de la réaction de Maillard.

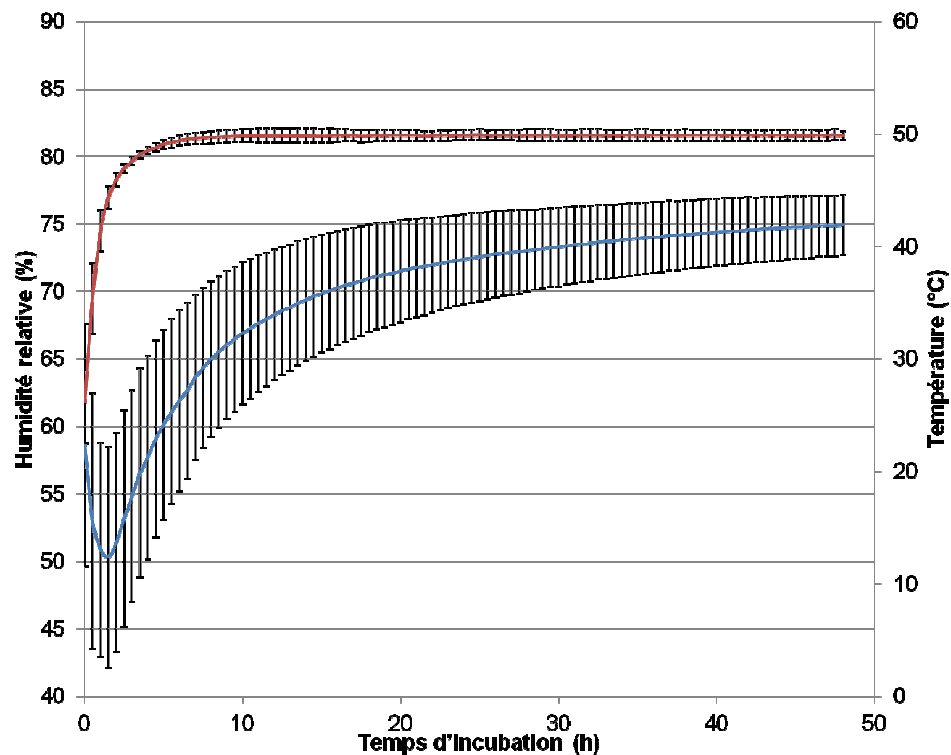


Figure 3.3 : Cinétiques de l'humidité relative (% —) et de la température (°C —) dans le dessiccateur au cours de la réaction de Maillard (*Moyenne sur 8 courbes*).

On remarque qu'à partir de 20 heures d'incubation, l'humidité relative de l'enceinte atteint les 72% (CV moyen : 5%). La baisse d'humidité relative au début de l'incubation peut être due à l'absorption de l'eau par les poudres. On remarque aussi quelle que soit la production considérée, la température à l'intérieur de l'enceinte du dessiccateur atteint rapidement la valeur de consigne (50°C) et reste stable au cours de la RM. En revanche, cela n'est pas vérifié pour l'humidité relative. Dans ce cas, la valeur de consigne est atteinte à partir de 20h et il existe une plus grande variation entre les productions (écarts-types importants). Toutefois comme nous le verrons par la suite, ces variations d'humidité relative entre les productions, n'ont pas entraîné de différence dans la reproductibilité évaluée sur les produits finaux.

Activité de l'eau (a_w) des produits après fabrication

Avant la RM, une première lyophilisation permet d'obtenir un produit pulvérulent à partir du mélange aqueux protéine/glucide. Cette poudre subit ensuite la réaction de Maillard (cf protocole partie 2.2). Une seconde lyophilisation permet d'éliminer l'eau résiduelle reçue par le produit au cours de la réaction de Maillard et d'avoir des produits finaux homogènes. Les produits subissent

donc deux lyophilisations, et c'est à la suite de cette seconde lyophilisation que l' a_w a été mesurée (tableau 3.1).

Tableau 3.1 : a_w des produits de la réaction de Maillard

	CS natif	CS Xyl	CS Glc	CS FOS	CS Dex
Sans Tp	0.237 ± 0.02	0.232±0.02	0.242±0.01	0.265±0.03	0.221±0.02
Avec Tp	0.23±0.001	0.239±0.01	0.248±0.01	0.266±0.02	0.253±0.03

	SH natif	SH Xyl	SH Glc	SH FOS	SH Dex
Sans Tp	0.247±0.02	0.242±0.02	0.242±0.01	0.255±0.03	0.241±0.02
Avec Tp	0.245±0.01	0.249±0.01	0.240±0.01	0.256±0.02	0.233±0.03

D'après le tableau 3.1, les produits de la réaction de Maillard issus du caséinate de sodium ont une a_w comprise entre 0,23 et 0,266 et ceux issus de l'hydrolysate de crevette ont une a_w comprise entre 0,24 et 0,256 (Tampon phosphate 0,3M, pH 6,5).

Evaluation de la reproductibilité de la RM.

Au cours de la thèse, deux productions ont été réalisées pour le Xylose et le Dextran. Ces productions ont été faites dans l'objectif d'évaluer la reproductibilité de la fabrication des produits utilisés pour la thèse. La reproductibilité a été évaluée grâce aux dosages des fonctions aminées libres et par la mesure du brunissement. Les figures 3.4, 3.5 et 3.6 montrent la reproductibilité de fabrication pour les dosages des fonctions aminées libres, et les figures 3.7, 3.8 et 3.9 pour celle évaluée par la mesure du brunissement.

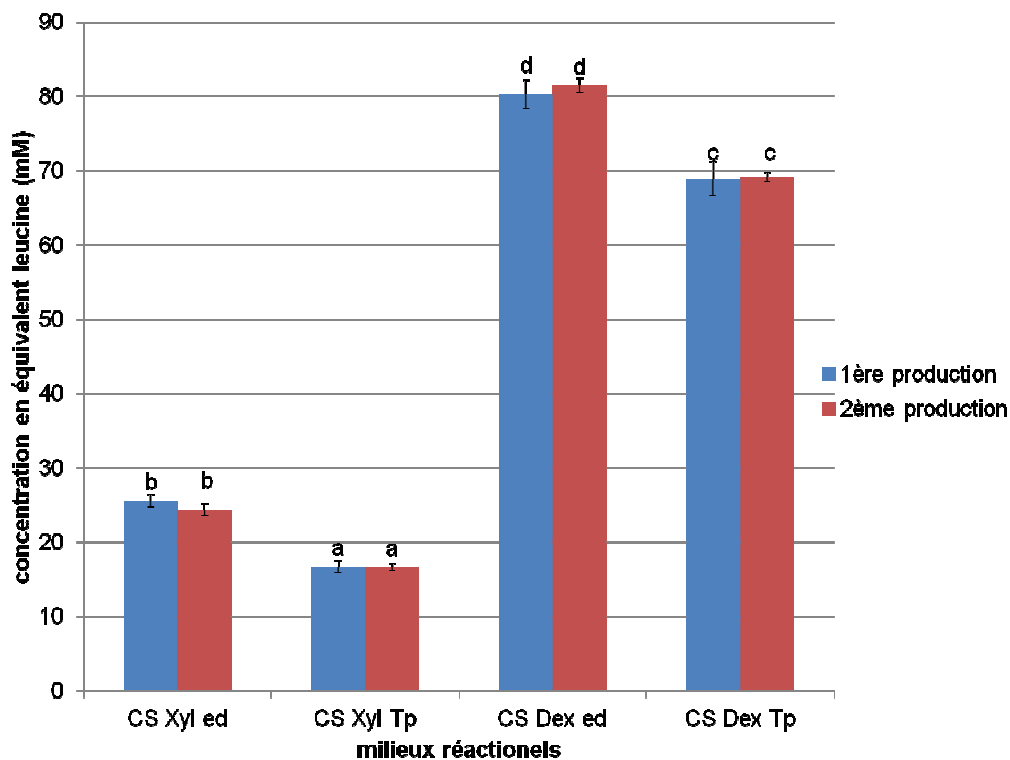


Figure 3.4 : Evolution du nombre de groupements aminés libres lors de la réaction de Maillard entre le caséinate de sodium et le Xylose ou le Dextran pour les deux productions.

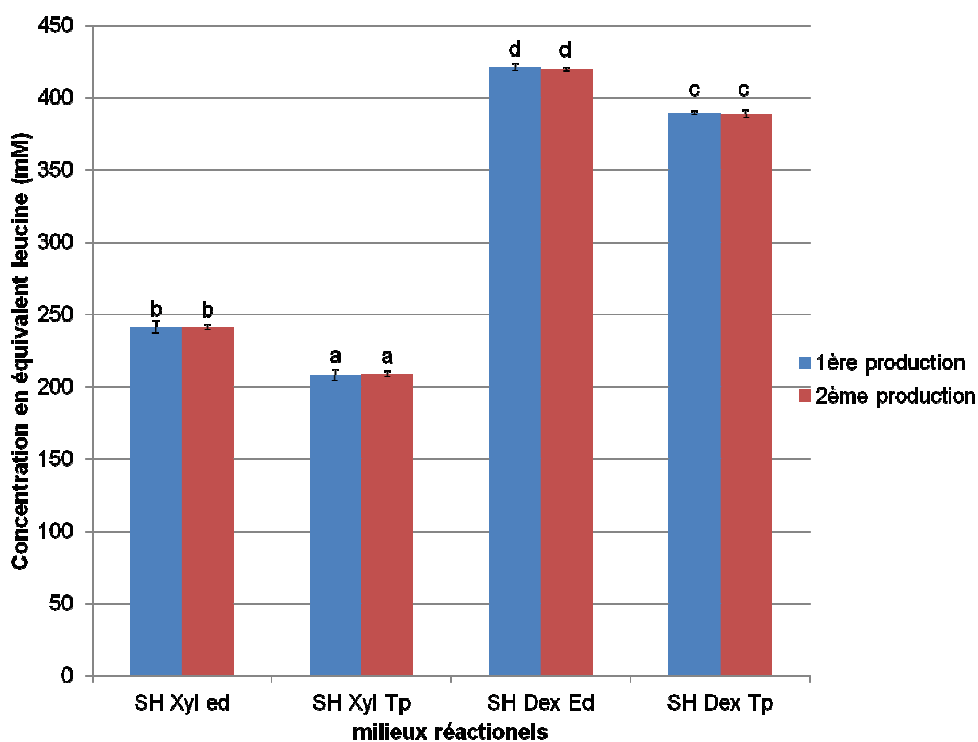


Figure 3.5 : Evolution du nombre de groupements aminés libres lors de la réaction de Maillard entre l'hydrolysate de crevette et le Xylose ou le Dextran pour les deux productions.

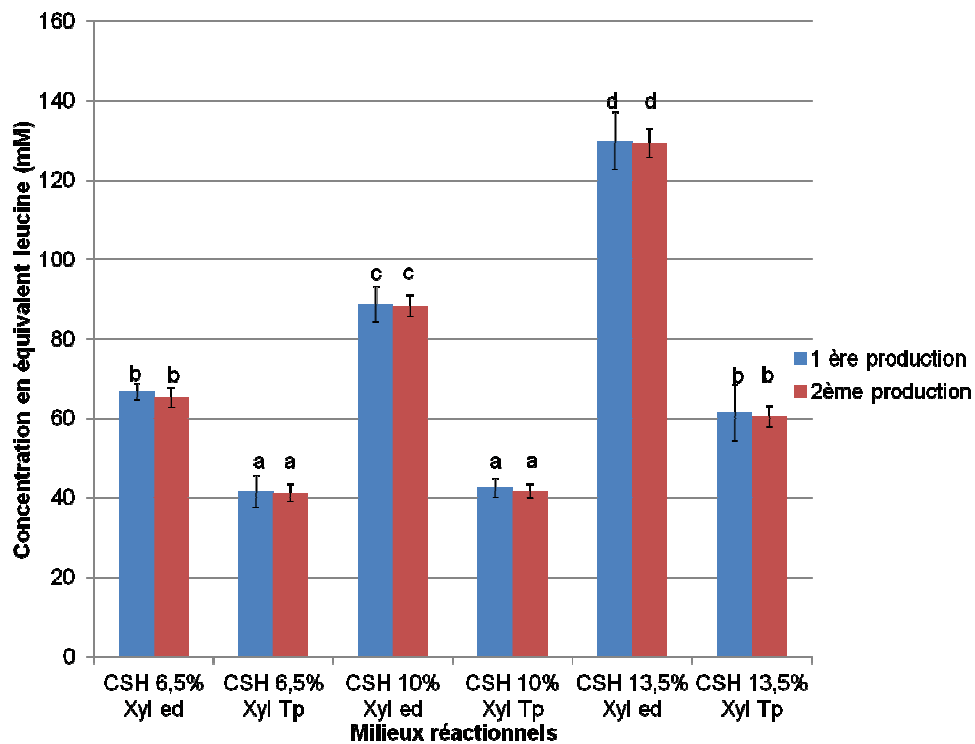


Figure 3.6 : Evolution du nombre de groupements aminés libres lors de la réaction de Maillard en présence du caséinate hydrolysé à trois degré d'hydrolyse et le Xylose pour les deux productions.

Les figures 3.4, 3.5 et 3.6 montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux productions, en termes de mobilisation des fonctions aminées libres. Sur cette base, la reproductibilité des RM mises en œuvre a été confirmée.

Les figures 3.7, 3.8 et 3.9 suivantes montrent le brunissement des composés issus des différentes productions.

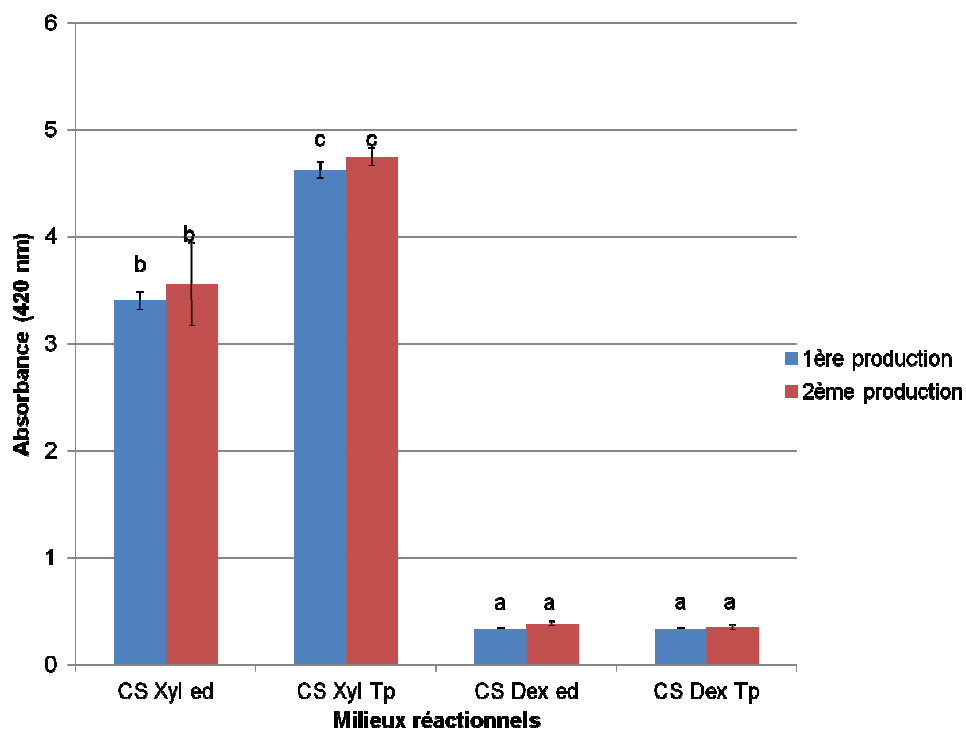


Figure 3.7 : Evolution du brunissement pour les produits de la réaction de Maillard issus du caséinate de sodium et du Xylose ou du Dextran obtenus lors des deux productions.

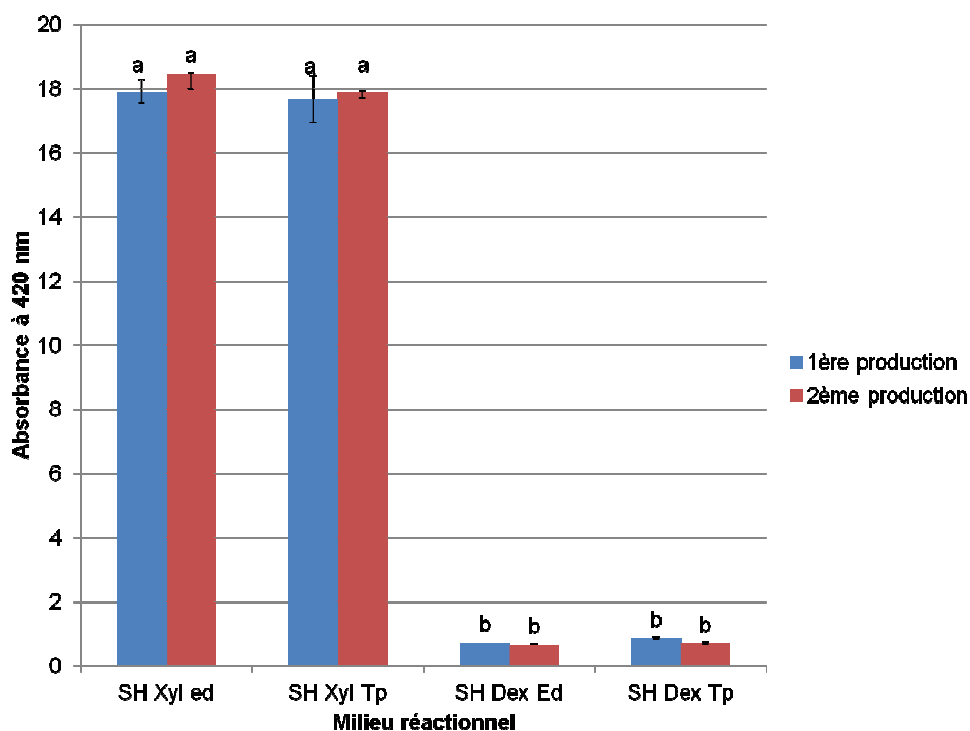


Figure 3.8 : Evolution du brunissement pour les produits de la réaction de Maillard issus de l'hydrolysate de crevette et du Xylose ou du Dextran obtenus lors des deux productions.

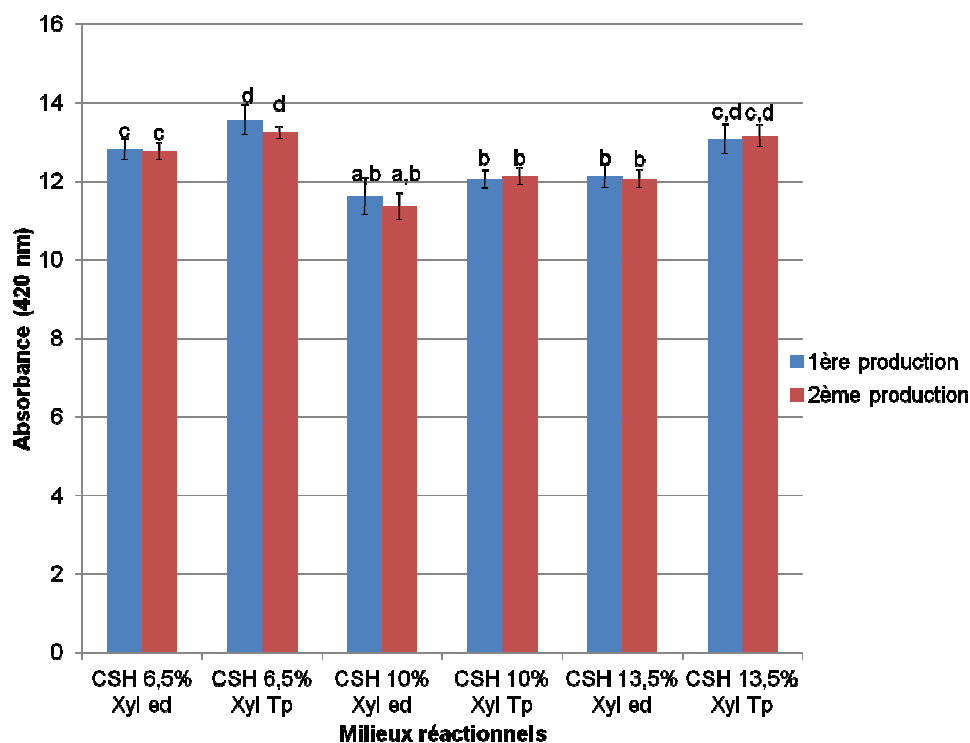


Figure 3.9 : Evolution du brunissement pour les produits de la réaction de Maillard issus du caséinate de sodium hydrolysé à trois degrés d'hydrolyse et du Xylose obtenus lors des deux productions.

Dans le cas du caséinate de sodium, de l'hydrolysate de crevette et de l'hydrolysate de caséinate, on n'observe pas de différences significatives entre les deux productions (figure 3.7, 3.8 et 3.9).

3.1.2 Mise en œuvre des émulsions modèles

3.1.2.1 Choix du ratio H/E

Au cours de la thèse, nous voulions rester dans un système simple, c'est-à-dire une émulsion simple type E/H ou H/E. Si l'on se réfère à la carte de composition-formulation théorique (figure 1.13), cela correspond aux zones A+ et A-. Pour ceci, nous avons décidé de travailler avec un ratio huile/eau de 50/50 (Lawal, 2004 ; Gbogouri *et al.*, 2004 ; Šližytė *et al.*, 2009).

3.1.2.2 Effet d'un colorant ajouté à l'émulsion.

Afin de mieux différencier les phases lors du suivi des cinétiques de crémage par le front de séparation des phases aqueuses et huileuses (cf protocole partie 2.5.2), nous avons utilisé un colorant (bleu patenté V, E131). Il a été validé qu'il n'y avait pas d'effet lors de l'émulsification. Il a ainsi été déterminé que la concentration en colorant devait être de 0,001%. A cette concentration, aucun effet n'a été observé sur l'émulsification, alors que pour des concentrations supérieures, le colorant avait tendance à stabiliser les émulsions (résultats non montrés).

3.1.2.3 Détermination de la concentration de protéines dans l'émulsion pour l'étude

La concentration des produits de la RM utilisée pour fabriquer les émulsions a été choisie en rapport avec la stabilité émulsifiante donnée par le caséinate de sodium (protéine de référence). En effet, le caséinate de sodium ayant un haut pouvoir de stabilisation des émulsions, il produit des émulsions stables (peu de déphasage) dès les faibles concentrations. Or, les hydrolysats de crevette glyqués ne se comportent pas ainsi. Pour évaluer les cinétiques de fraction volumique de phase dispersée au cours du temps des émulsions contenant les hydrolysats de crevette glyqués comparativement à celles du caséinate de sodium natif, une concentration idéale a donc dû être déterminée. Pour ceci, un effet de la concentration en caséinate de sodium natif a été mesuré dans les émulsions. (Fig. 3.11) Il a permis de sélectionner une concentration en caséinate permettant de donner des cinétiques de déphasage proches de celles observées sur les hydrolysats glyqués.

La figure 3.10 présente les cinétiques de la fraction volumique de phase dispersée (%) (voir partie 2.5.2) pour des émulsions contenant des concentrations en caséinate de sodium comprises entre 0,01% et 1,5%.

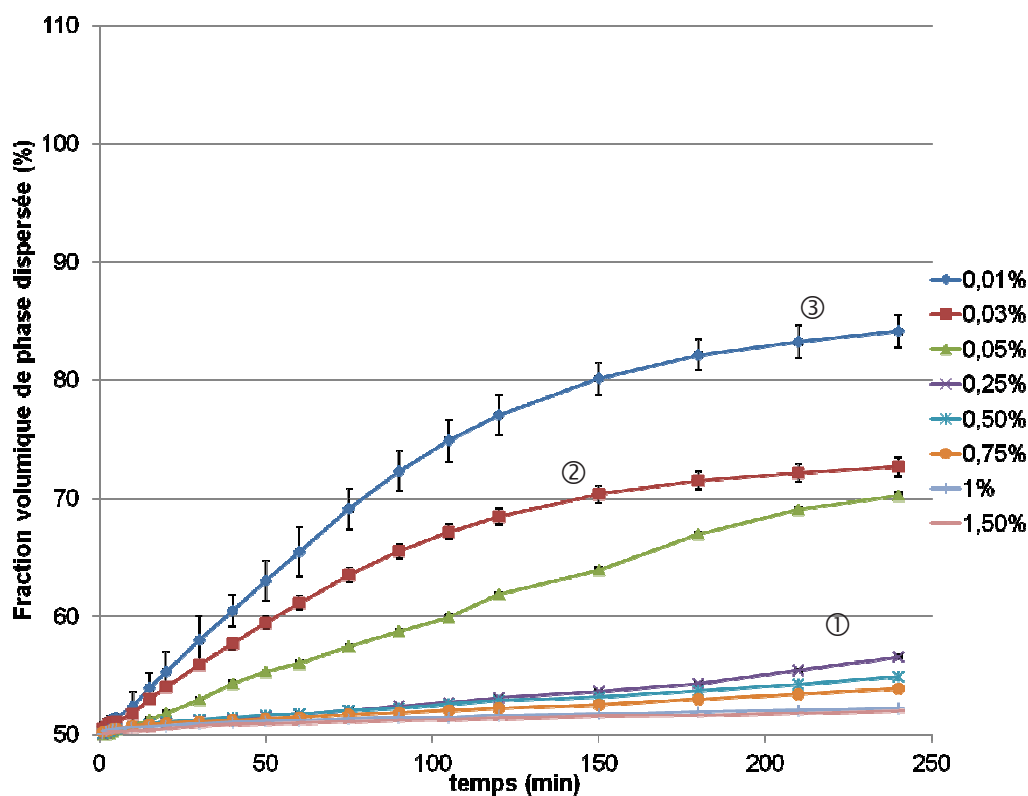


Figure 3.10 : Cinétique de la fraction volumique de phase dispersée dans des émulsions contenant des concentrations croissantes de caséinate natif (T = 20°C ; pH 7).

La figure 3.10 montre des cinétiques de fraction volumique de phase dispersée : plus celle-ci augmente au cours du temps, moins l'émulsion est considérée comme stable. D'après cette figure, on remarque trois typologies de courbes.

Le premier groupe ① correspond à une augmentation lente de la fraction volumique de phase dispersée. Ce groupe est constitué des émulsions contenant du caséinate de sodium à des concentrations supérieures ou égales à 0,25% (m/m). Ces courbes représentent des émulsions stables dans le temps.

Le second groupe ② correspond à une cinétique plus rapide de la fraction volumique de phase dispersée. Ce groupe contient les émulsions à 0,03% et 0,05% de caséinate de sodium. Les concentrations en caséinate de sodium utilisées dans ces émulsions permettent donc d'observer une évolution de fraction volumique visuellement au cours du temps.

Enfin le troisième groupe ③ présente une augmentation très importante de la fraction volumique de phase dispersée. Cette émulsion correspond à une concentration de 0.01%(m/m) en caséinate de sodium. Ces émulsions sont considérées comme instables car la séparation des phases est rapide au cours du temps.

Compte tenu de ces résultats, la concentration de 0.05% a été choisie pour la suite de l'étude. Les propriétés émulsifiantes des PRM ont donc tous été testés à cette concentration. Les émulsions fabriquées avec les PRM à 0,05% permettront donc à la fois un suivi visuel du front de séparation des phases et un positionnement par rapport aux propriétés du caséinate de sodium.

NB : Une seule étude au cours de la thèse a utilisé des concentrations à 0,5 %. Il s'agit de celle concernant l'effet du poids moléculaire du Dextran. Il s'agissait d'assurer une stabilité plus grande des émulsions pour permettre d'évaluer de faibles différences entre les composés glyqués.

3.1.2.4 pH des solutions aqueuses

Le tableau 3.2 présente les pH des solutions aqueuses contenant 0,1% (p/p) de doit un mélange protéine-glucide sans réaction de Maillard, soit un PRM. On remarque que le pH des solutions aqueuses varie de 6,88 à 7,92 selon les réactants mis en œuvre. Ces différences entre les pH sont notamment dues à la réaction de Maillard qui tend à acidifier les milieux.

Tableau 3.2 : pH des solutions aqueuses contenant les mélanges natifs ou les PRM du caséinate de sodium ou de l'hydrolysat de crevette.

	CS	CS Xyl	CS Glc	CS FOS	CS Dex
Mélange natif	6.82	6.42	7.04	6.43	6.37
RM en eau distillée		6.68 ± 0.11	7.03 ± 0.07	7.1 ± 0.06	7.25 ± 0.03
RM en tampon phosphate		6.88 ± 0.08	6.8 ± 0.01	6.94 ± 0.02	7.63 ± 0.05

	SH	SH Xyl	SH Glc	SH FOS	SH Dex
Mélange natif	7.56	7.97	7.56	7.41	7.52
RM en eau distillée		5.47 ± 0.05	6.49 ± 0.04	7.74 ± 0.03	7.92 ± 0.04
Rm en tampon phosphate		6.1 ± 0.04	6.95 ± 0.02	7.61 ± 0.07	7.54 ± 0.05

Les propriétés émulsifiantes des protéines sont dépendantes du pH de travail. Afin de pouvoir comparer l'impact des PRM sur la stabilité des émulsions, le pH de celles-ci sera ajusté au cours de la thèse. Deux pH ont été testés : 4,5 et 7.

3.1.2.5 Validation de l'effet du tampon phosphate résiduel

La réaction de Maillard mise en œuvre dans la thèse utilise du phosphate dans l'un des milieux. Des molécules résiduelles de phosphate sont donc susceptibles d'être présentes en fin de RM dans les PRM. Or, il a été montré que le tampon phosphate pouvait montrer un pouvoir émulsifiant (codex alimentarius). En effet les ions phosphates sont amphiphiles et peuvent se comporter comme des émulsifiants s'adsorbant aux interfaces et stabilisant les gouttelettes d'huile. Il a donc été testé préalablement si ce dernier avait une influence sur l'émulsification. Pour valider ce point, une émulsion eau tamponnée (0,3 M) avec du phosphate a été préparé. De même, une émulsion, contenant la quantité de tampon phosphate présente dans 0,05% (m/m) d'un composé issu de la glycation soit 13 mg de tampon pour 200g d'émulsion, a été réalisée.

La figure 3.11 montre les cinétiques de la fraction de phase dispersée dans l'émulsion en fonction du temps. Sur cette figure, on observe que, la courbe de l'émulsion témoin (eau distillée) et la courbe de l'émulsion contenant le tampon phosphate dans 0,05 % de PRM ne stabilise pas l'émulsion. La quantité de phosphate présent dans 0,05 % de PRM n'a donc pas d'effet sur l'émulsion. En effet, on observe une augmentation immédiate du volume de fraction volumique dispersée qui correspond à un déphasage instantané de l'émulsion. En revanche, l'émulsion fabriquée avec du tampon phosphate 0.3 M à la place de l'eau distillée présente un comportement différent de l'émulsion témoin. Bien que le phosphate puisse avoir un effet sur l'émulsification à 0,3 M, dans nos conditions d'étude, la quantité résiduelle dans 0,05% de PRM n'est pas suffisante pour permettre une stabilisation de l'émulsion. On peut donc en déduire que le tampon phosphate résiduel n'a pas d'influence sur les propriétés émulsifiantes des composés.

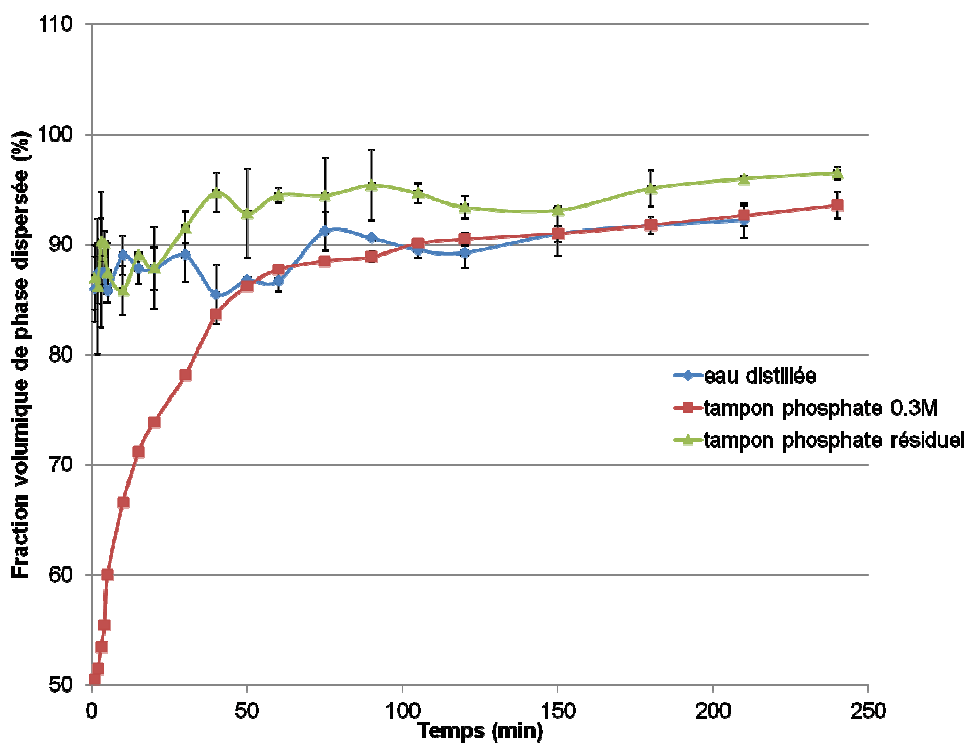


Figure 3.11 : Cinétique de la fraction volumique de phase dispersée (%) pour des émulsions contenant de l'eau distillée, du tampon phosphate 0.3M pH 6.5 ou la quantité résiduelle de tampon phosphate.

3.1.2.6 Reproductibilité des émulsions

La reproductibilité de fabrication des émulsions s'est basée sur les cinétiques d'évolution de la fraction volumique de la phase dispersée d'émulsions contenant des PRM. Ces cinétiques montrent que plus la fraction volumique de phase dispersée est importante au cours du temps, moins l'émulsion est stable. Leur interprétation sera présentée dans la partie 3.3.

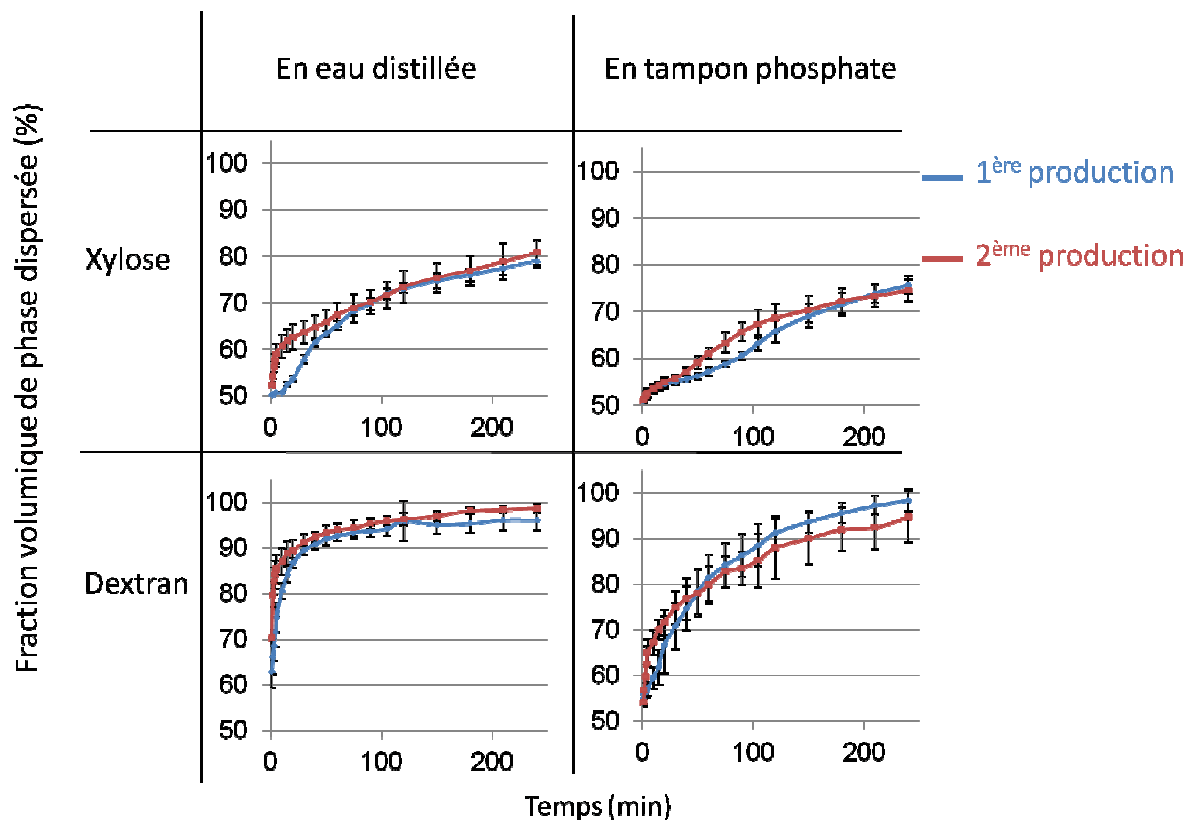


Figure 3.12 : Cinétiques de la fraction volumique de phase dispersée des émulsions entre les différentes productions pour l'hydrolysate de crevette glyqué avec le Xylose ou le Dextran.

Ces mesures ont été réalisées pour valider la reproductibilité de fabrication des émulsions. On remarque, sur la figure 3.12, que dans le cas de l'hydrolysate de crevette on n'observe pas de différence entre les cinétiques de la fraction volumique de phase dispersée des différentes productions, et ce, quel que soit le mélange réactionnel et les conditions de réaction de Maillard.

3.1.2.7 Mise en place des mesures rhéologiques

- Viscosimétrie à cylindre coaxial

Des essais de mesures de la viscosité des émulsions fabriquées ont été réalisés pour définir le module rhéologique qui sera retenu pour les mesures de viscosités. Les deux modules testés sont adaptés aux produits de faibles viscosités. Le premier module essayé était un module MV (cylindre introduit dans un godet), et le second, était de type NV (à double entrefer). Avec ces modules, une gamme de vitesse de cisaillement de 0 à 500 s⁻¹ a été testée : 30, 60 et 120 secondes. L'objectif était d'obtenir le couple durée d'analyse/mobile permettant d'avoir la meilleure sensibilité de mesure compte tenu de la faible viscosité des émulsions. L'observation des courbes a conduit au choix du module NV à double entrefer et 120 secondes pour la durée des mesures.

- Mesures oscillatoires

Dans un premier temps, nous avons réalisés les mesures rhéologiques sur des émulsions contenant soit SH Dex RM soit CS Xyl RM. Ces systèmes avaient été choisis car leur fraction volumique de phase dispersée n'évolue plus après 2h de repos.

Pour effectuer les prélèvements et réaliser le dépôt ou chargement sur le module plan-plan, nous avons testé deux méthodes : _ avec une spatule.

_ avec une seringue.

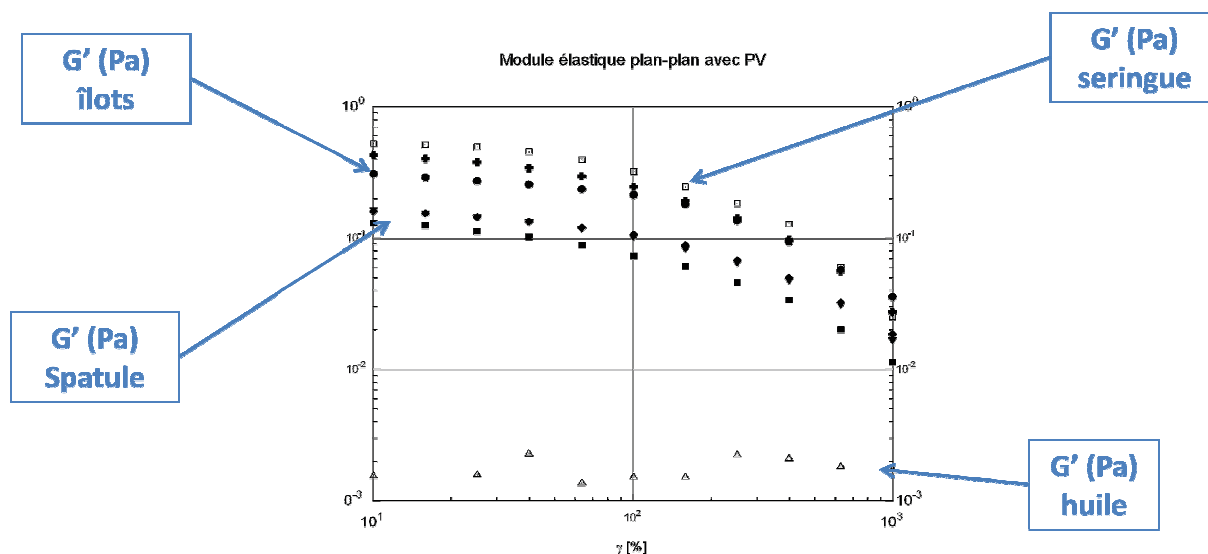


Figure 3.13 : Module élastique d'une émulsion contenant du CS Xyl RM en Tp en fonction de la déformation.

On remarque sur la figure 3.13 que pour une même émulsion, il y a une dispersion des points pour un même échantillon. De plus, lors du prélèvement à la spatule, des différences étaient visibles : présence d'îlots d'émulsion dans de l'huile, évolution du système au cours du temps due à l'élimination de la couche d'huile supérieure.

L'obtention d'un module élastique plus important avec un prélèvement à la seringue peut s'expliquer par un cisaillement du système lors de l'aspiration dans la seringue. En effet lors du prélèvement à la seringue l'échantillon subi une homogénéisation due à l'aspiration lors du prélèvement et à l'expiration lors du chargement.

Ces grandes disparités sont dues à l'évolution continue du système étudié, émulsions instables, ainsi qu'aux traitements mécaniques lors des prélèvements. Un autre système a donc été étudié afin de voir s'il était possible d'avoir des mesures rhéologiques reproductibles.

Nous nous sommes intéressés aux émulsions contenant du caséinate de sodium natif car le caséinate est la protéine qui, dans notre étude, nous sert de référence pour les propriétés émulsifiantes. De manière à comparer nos systèmes, le prélèvement se faisait juste après l'homogénéisation à l'ultra Turrax.

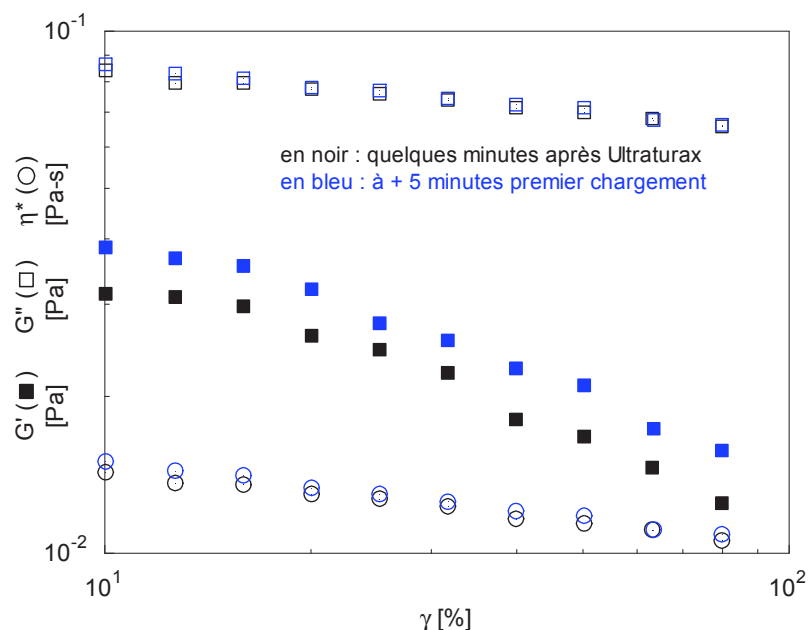


Figure 3.14 : Module élastique et viscoélastique d'une émulsion de caséinate de sodium à 0,05%.

On remarque sur la figure 3.14 qu'entre le premier prélèvement (chargement) et le second, cinq minutes se sont écoulées et le module élastique a augmenté. Cette augmentation du module élastique des émulsions pendant les 5 premières minutes après homogénéisation a été observée pour chacune des émulsions contenant du caséinate de sodium. L'émulsion évolue donc dans le temps.

Des mesures de balayage en déformation ont alors été réalisées à différents temps de repos afin de voir si l'émulsion évoluait sur toute la période de repos ou si celle-ci se stabilisait à un moment donné. Après un temps de repos de 2h, les mesures de balayage en déformations étaient reproductibles, il n'y avait donc plus d'évolution au sein de l'émulsion. De plus ces mesures sont répétibles et reproductibles.

Un temps de repos de deux heures après la fabrication a donc été choisi avant de réaliser les mesures pour les émulsions, présentant une cinétique de évolution de la fraction volumique de

phase dispersée similaire à celle du caséinate de sodium, soit des émulsions contenant les produits SH Xyl RM en tampon ou CS Dex RM en Tp.

3.1.3 Conclusion

Grâce à ces résultats préliminaires, nous avons pu valider nos conditions de réaction de Maillard en milieu sec, à savoir une incubation à 50°C pendant 48h sous une humidité relative de 62%. En effet, le choix du milieu sec permet pour le même couple temps-température que nous appliquons en milieu liquide, une glycation plus importante entre les sources protéiques et le Dextran. Ainsi, la glycation, en conditions sèches, en présence de Dextran a été augmentée d'un facteur 5 par rapport au milieu liquide.

De plus, dans les conditions choisies, la réaction de Maillard est reproductible pour tous les systèmes étudiés. Les différentes productions ne présentent pas de différence significative dans l'avancée de la réaction de Maillard (dosage des fonctions aminées libres) ni dans le brunissement.

Dans le cas des propriétés émulsifiantes, ces résultats ont permis de choisir la concentration en produits de la réaction de Maillard dans les émulsions. Cette concentration de 0,05% (m/m) permet la comparaison du comportement des produits de la réaction de Maillard avec celui de la protéine de référence : le caséinate de sodium. De plus, ni la concentration en tampon phosphate résiduel, ni la concentration en colorant n'a d'influence sur le comportement des produits de la réaction de Maillard dans les émulsions.

Ces expériences ont aussi permis le choix du module rhéologique pour la mesure de la viscosité ainsi que la détermination des systèmes pouvant être décrits par spectrométrie mécanique.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons aborder la réaction de Maillard en nous intéressant à l'influence du type de glucides, de la source protéique notamment vis-à-vis du poids moléculaire ainsi qu'à la concentration en glucides. Puis nous aborderons les propriétés fonctionnelles des produits obtenus et enfin les propriétés antioxydantes potentielles des produits seront déterminées.

3.2 La réaction de Maillard

Dans cette partie, la réaction de Maillard est étudiée en fonction de différents paramètres réactionnels tels que : l'origine de la source protéique, le type de glucide, la concentration en hydrate de carbone et la présence de tampon.

3.2.1 Effet du type de glucide et de la source protéique

Deux sources protéiques ont été utilisées dans l'optique de modifier leurs propriétés technofonctionnelles. Le caséinate de sodium (CS), qui est dans notre cas la protéine de référence utilisée dans l'industrie pour ses propriétés émulsifiantes et un hydrolysate de crevette (SH), qui est le co-produit marin choisi.

Ces deux sources protéiques nous permettent de mettre en œuvre la réaction de Maillard en présence d'une protéine native (le caséinate de sodium) ainsi que de protéines ayant subi une hydrolyse poussée (l'hydrolysate de crevette).

D'après la littérature, la glycation peut se dérouler en milieu sec ou en milieu liquide. Néanmoins, la glycation en milieu sec sous humidité relative semble plus favorable à la glycation des polysaccharides tout en utilisant des températures modérées (50°C) permettant de prévenir l'apparition de composés cytotoxiques (Kato, 2002). Ceci est dû à une augmentation de la réactivité des glucides en milieu sec. Cette augmentation de la réactivité est liée à différents paramètres notamment la température et l'activité de l'eau.

Ces changements de réactivité peuvent être liés au phénomène de la transition vitreuse. En effet, en dessous la température de transition vitreuse (T_g), le système est dans un état vitreux caractérisé par une haute viscosité intrinsèque et une faible mobilité moléculaire. Au dessus de la T_g , le système passe à l'état caoutchouteux, plus souple, caractérisé par une plus faible viscosité intrinsèque et donc des mobilités moléculaires plus fortes et plus propices aux différentes réactions chimiques (Bell *et al.* 1998a). La présence de molécules d'eau, en milieu sec diminue la T_g , entraînant un changement des propriétés thermodynamiques du système et donc un comportement différents des glucides vis-à-vis de la réaction de Maillard. Dans les milieux secs, la mobilité associée à la plasticité due aux molécules d'eau, affecte le taux de brunissement de façon plus significative que l'activité de l'eau (Bell *et al.*, 1998b).

Dans l'objectif de modifier les propriétés technofonctionnelles des protéines, quatre glucides ont été choisis : deux monosaccharides, un oligosaccharide et un polysaccharide.

Les deux monosaccharides, le Xylose et le Glucose ont été étudiés dans des travaux précédents au laboratoire et leur réactivité vis-à-vis de la réaction de Maillard en milieu liquide est déjà connue.

Le Xylose est un aldopentose très réactif vis-à-vis de la réaction de Maillard en raison de la stabilité de sa forme non cyclique, et donc réactive, en milieu liquide (Laroque *et al.*, 2008).

Le Glucose, quand à lui est un aldohexose, moins réactif que le Xylose car sa forme cyclique est plus stable que celle du Xylose. Ce glucide est souvent utilisé dans les milieux modèles de la réaction de Maillard contenant soit des acides aminés (Yalayan et Kaminsky, 1997 ; Ajandoux et Puigserver, 1999; Arribas-lorenzo et Morales, 2009 ; De Vleeschouwer *et al.*, 2009a et b), soit des protéines natives (Jing et Kitts, 2002 ; Benjakul *et al.*, 2005 ; Ajandoux *et al.*, 2008). Il est connu et largement utilisé dans les industries agroalimentaires.

Les oligosaccharides utilisés sont les Fructo-oligosaccharides (FOS), des polymères composés de 2 à 8 unités Fructose liées par des liaisons β 2-1. Ils sont utilisés dans l'industrie agro-alimentaire en tant qu'agents sucrants.

Le polysaccharide utilisé est le Dextran. C'est un polymère de Glucose de haut poids moléculaire. Bien que peu réactif vis-à-vis de la réaction de Maillard, possédant une seule fonction réductrice par molécule, il est souvent utilisé dans la littérature pour modifier les propriétés technofonctionnelles des protéines.

Le caséinate de sodium et l'hydrolysate de crevette ont donc été mis en présence de ces quatre glucides et chauffés après lyophilisation pendant 48h à 50°C sous une humidité relative de 65%.

3.2.1.1 Brunissement

On observe un changement de l'aspect de la poudre, lors de la réaction de Maillard (figure 3.15). Ainsi dans certains cas, la poudre perd son aspect poudreux et ressemble plus à un fluide visqueux (SH+Xylose ; SH+Glucose) alors que dans d'autres cas on observe la présence d'agréats plus ou moins gros. Le développement d'une couleur brune, notamment en présence de Xylose et de Glucose est important. On constate aussi qu'il y a une augmentation de la teneur

en eau dans les boîtes de Pétri. Elle se traduit par un changement de l'aspect des poudres ainsi qu'une augmentation du poids dans les boîtes de Pétri. Cette augmentation est due à la fois à l'adsorption d'eau du milieu par les poudres et au fait que l'eau est l'un des produits de la réaction de Maillard.

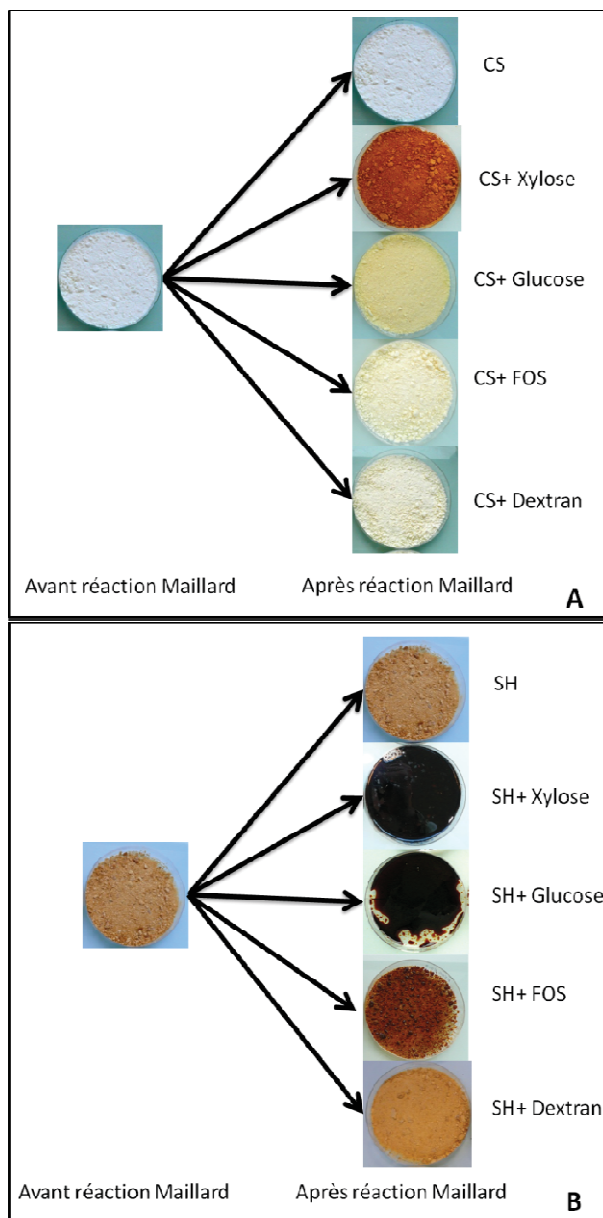


Figure 3.15 : Evolution de la couleur consécutive à une réaction de Maillard entre différents hydrates de carbones et le caséinate (A) ou l'hydrolysate de crevette (B).

La présence de composés bruns est caractéristique de la réaction de Maillard. L'intensité de ce brunissement est évaluée par mesure de l'absorbance à 420nm (figure 3.16 A et B).

Dans certains cas, le chauffage des glucides seuls entraîne une augmentation de l'absorbance à 420nm et l'apparition de composés bruns : c'est le phénomène de caramélisation. Ainsi, la caramélisation du ribose a été observée en milieu liquide dès 75°C (Sumaya Martinez et

al., 2007) Dans notre cas, le chauffage des glucides seuls n'entraîne ni brunissement visible ni changement de l'absorbance à 420nm. La réaction de caramélisation n'a donc pas lieu dans les conditions utilisées (tableau en Annexe 2).

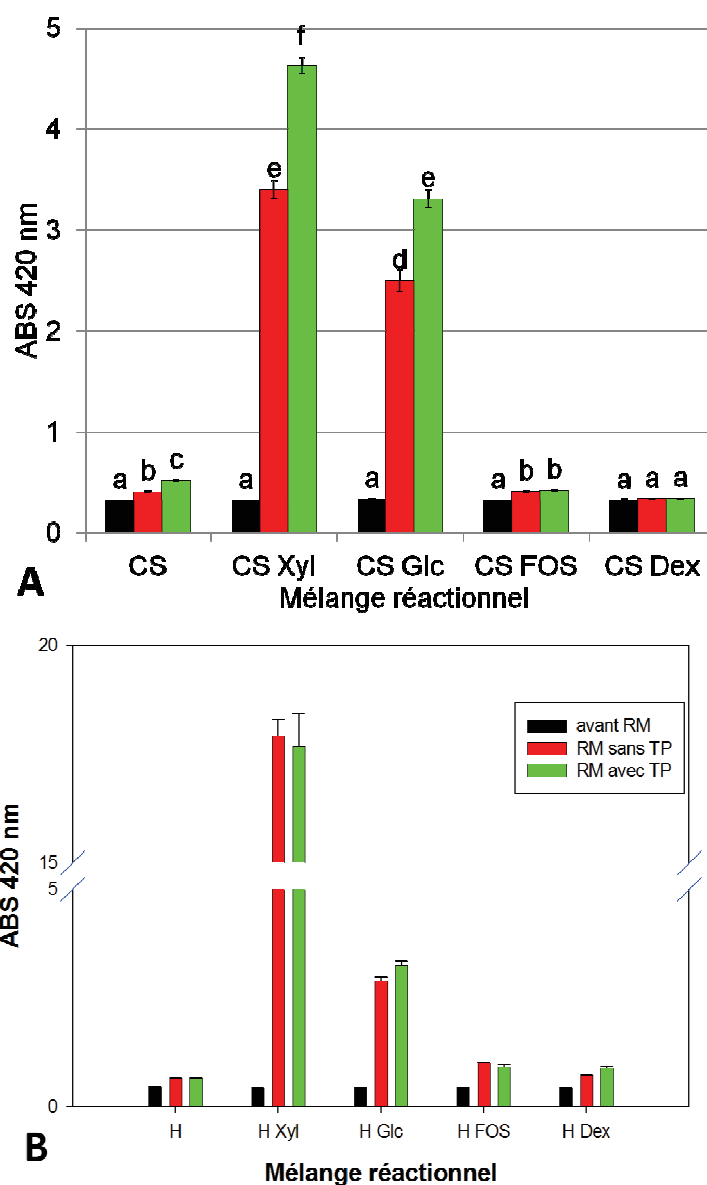


Figure 3.16 : Evolution du brunissement des différents mélanges avant et après la réaction de Maillard (A – caséinate de sodium (CS) ; B - hydrolysats de crevette(SH))

L'apparition de composés absorbant à 420 nm est caractéristique de l'apparition des mélanoïdines lors de la phase tardive de la réaction de Maillard.

En l'absence de tampon phosphate lors de la réaction de Maillard, l'absorbance est multipliée respectivement par un facteur 11 ou 7,5 pour les mélanges réactionnels CS + Xylose et CS + Glucose en comparaison des mesures faites avant réaction de Maillard (figure 3.19 A).

En revanche, en présence du mélange SH + Xylose, l'absorbance augmente d'un facteur 40 par rapport au mélange avant réaction de Maillard et d'un facteur 6,7 dans le cas du mélange SH + Glucose.

Ces différentes augmentations s'expliqueraient par le nombre plus élevé de groupements aminés libres mis en jeu avec l'hydrolysate de crevette comparé au caséinate de sodium ainsi que par la nature des acides aminés qui constituent les deux sources protéiques. L'utilisation du Xylose, glucide très réactif dans la réaction de Maillard, accentuerait ces différences entre sources protéiques.

En présence de FOS et de Dextran, les produits montrent une plus faible absorbance et la différence des absorbances avant et après réaction de Maillard est faible voire nulle.

En présence de tampon phosphate, on remarque une augmentation significative de l'absorbance qui est respectivement multipliée par 15, 10 et 7,5 pour les mélanges CS + Xylose, CS + Glucose et SH+ Glucose par rapport aux mêmes mélanges sans tampon phosphate. Cette différence pourrait être liée au rôle catalyseur joué par les ions phosphate. Comme cela a été précédemment démontré en milieu liquide (Sumaya Martinez *et al.*, 2007 ; Laroque *et al.*, 2008).

Néanmoins, pour le mélange SH + Xylose, aucune différence d'absorbance n'est remarquée entre les mélanges maillardisés en eau distillée et ceux en tampon phosphate.

La réactivité des glucides joue un rôle sur le brunissement. En effet, le brunissement est dû à la formation des produits avancés de la réaction de Maillard. Toutefois, le temps d'initiation de la formation des composés bruns dépend du type de glucides, du temps d'incubation et de la température (Van Boekel, 2001). Dans notre cas, le temps d'incubation et la température sont les mêmes pour tous les mélanges réactionnels. Pour la même source protéique, on peut donc supposer que le facteur majoritairement impliqué dans l'apparition des composés bruns est la nature du glucide.

Toutefois, le changement de source protéique entraîne un changement de comportement vis-à-vis de la réaction de Maillard. En effet, entre deux sources protéiques, il existe de nombreux paramètres susceptibles d'intervenir dans la réaction de Maillard :

Le premier paramètre est la composition en acides aminés. Les acides aminés ne réagissent pas de la même façon lors de la réaction de Maillard. Certains acides aminés, notamment les acides aminés basiques sont très réactifs vis-à-vis de la réaction de Maillard car leur forme majoritaire est $R-NH_3^+$, forme qui intervient dans la première étape de la réaction de Maillard. Ajandouz et Puigserver (1999) ont étudié en milieu liquide l'impact du chauffage, à $100^\circ C$, pH 7,5, sur les mélanges contenant un acide aminé – parmi sept acides aminés essentiels – et du Glucose. Ils en déduisent que la lysine est la plus réactive du fait de la présence de deux fonctions aminées libres suivie par la thréonine et la phénylalanine. La méthionine montre, quand à elle, une faible réactivité dans la réaction de Maillard.

Le second paramètre est la conformation de la source protéique. Ainsi les protéines linéaires, telles que le caséinate facilitent la réaction de Maillard quelles que soient la taille et la structure spatiale du glucide. Inversement les protéines globulaires telles que les protéines du lactosérum limitent la réaction de Maillard notamment en présence de glucides possédant une structure complexe (Hiller et Lorezon, 2010).

Le troisième paramètre est le nombre de fonctions aminées libres. La composition en acides aminés d'une protéine, notamment au niveau des extrémités N-terminales joue un rôle important. De plus dans le cas d'une protéine, l'impact de la composition en acide aminé est encore plus important après une hydrolyse enzymatique. En effet l'hydrolyse augmente le nombre de fonctions aminées libres en libérant des acides aminés qui étaient masqués auparavant. Cet aspect sera plus développé dans la partie 3.2.2.2.

D'après ces résultats de brunissement on peut supposer un ordre de réactivité des glucides :

(Moins réactif) **Dextran \approx FOS < Glucose < Xylose** (plus réactif)

La réactivité des glucides mis en œuvre dans la réaction de Maillard sera discutée dans la section suivante.

3.2.1.2 Dosage des fonctions aminées libres

Alors que le brunissement et l'apparence des produits de la réaction de Maillard sont des indicateurs visibles de l'avancée de la réaction, le dosage des fonctions aminées libres permet de

mesurer le nombre de fonctions aminées libres engagées dans la réaction. (Wooster et Augustin, 2007 ; Drusch *et al.*, 2009).

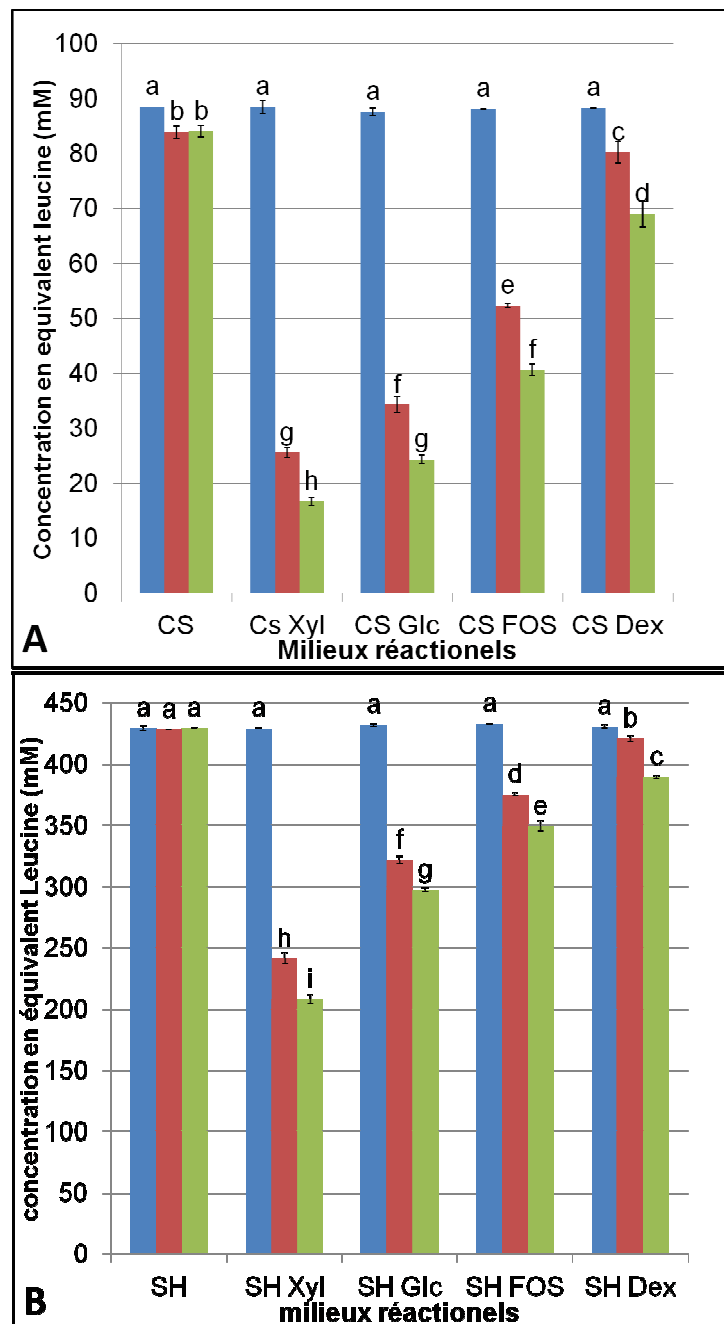


Figure 3.17 : Quantification des groupements aminés libres, A : réaction de Maillard en présence de caséinate de sodium et B : réaction de Maillard en présence de l'hydrolysate de crevette (■ Avant la RM ; ■ Après la RM en eau distillée ; ■ Après la RM en tampon phosphate).

La figure 3.17 montre la quantité de groupements aminés libres avant réaction de Maillard et après réaction de Maillard en présence ou non de tampon phosphate.

En l'absence de glucides, dans le cas du caséinate de sodium seul, il y a une diminution du nombre de groupements aminés libres après le chauffage. Cette diminution ne se retrouve pas

avec l'hydrolysate de crevette seul. On peut supposer que cette diminution est due à une agglomération des protéines de caséinate au cours de la lyophilisation et du chauffage. Gu *et al.* (2009) supposent que lors du chauffage des ponts disulfures sont créés entre les molécules de caséinate.

En présence de glucides avant réaction de Maillard, on observe qu'il n'y a pas de différence significative ($p < 0.05$) entre les différents mélanges et la protéine (CS ou H) seule. On remarque, tout de même, que l'une des principales différences entre les deux sources protéiques est le nombre de fonctions aminées libres. En effet l'hydrolysate de crevette natif possède environ quatre fois plus de fonctions aminées libres que le caséinate.

En présence de glucides après RM, on observe un ordre de réactivité des glucides qui est corrélé à la taille des glucides utilisés, et ce, quelle que soit la source protéique. Plus le glucide à une faible masse moléculaire, plus il est réactif. Cet ordre de réactivité est principalement lié à la stabilité des formes pyranoses des glucides. En effet, pour la réaction de Maillard, c'est la forme linéaire qui est réactive. Plus la forme pyranose (cyclique) est stable moins le glucide est réactif.

De plus, en présence de tampon phosphate, on remarque une diminution plus importante, estimée à 10mM pour le caséinate et à 40mM pour l'hydrolysate, du nombre de groupements aminés libres par rapport à la réaction de Maillard en eau distillée. Cette diminution semble corroborer l'hypothèse du caractère catalyseur du phosphate vis-à-vis de la réaction de Maillard (Bell, 1997 ; Sandwick *et al.*, 2005 ; Sumaya-Martinez *et al.*, 2005).

Plus la différence – avant et après réaction de Maillard – de concentration en équivalent leucine est importante et plus la réaction est poussée. Ceci traduit une plus grande mobilisation des fonctions aminées libres dans la réaction. Ainsi la réaction en présence d'hydrolysate de crevette est plus poussée car la différence de concentration en équivalent leucine est plus importante qu'en présence de caséinate pour un même glucide. On peut même supposer que dans le cas du Xylose et de l'hydrolyse de crevette, le glucide est un facteur limitant de la réaction.

Si l'on compare la réactivité des glucides en fonction du milieu réactionnel, on remarque que le milieu sec semble plus réactif que le milieu liquide étant donné que pour le mélange SH + Xylose, une diminution de 30% des groupements aminés libres a lieu en milieu liquide (Laroque *et al.*, 2008) contre 50% en milieux secs.

La confrontation des taux de glycation avec la littérature est délicate car la plupart des taux de glycation sont exprimés en pourcentage de groupements aminés libres par rapport à la source protéique native ce qui implique un biais lorsque l'on change de source protéique. La vitesse de la réaction de Maillard et sa réactivité (mesuré par la perte en fonctions aminées libres et/ou la perte en glucides) sont dépendantes de nombreux paramètres tels que :

- le ratio protéine/glucides (Medrano *et al.*, 2009, Drusch *et al.*, 2009). Medrano *et al.* (2009) montrent que lors de la glycation entre la β -lactoglobuline et le Glucose, le nombre de résidus glucidique greffés à la protéine augmente avec le ratio molaire. Il passe de 8 à 19 résidus glucidiques par protéine, lorsque le ratio molaire β -lactoglobuline : Glucose passe de 1 :10 à 1 : 100 dans les mêmes conditions chauffage (temps, température, pH).

- le temps d'incubation (Sun *et al.*, 2006, Miralles *et al.*, 2007, Wooster et Augustin 2007). Wooster et Augustin (2007) se sont penchés sur l'impact du temps d'incubation de la réaction de Maillard entre des protéines du lactosérum et du Dextran de poids moléculaires différents (29,4 et 42,2kDa). Ces auteurs montrent que le passage de 5 à 10 jours d'incubation augmente le nombre de molécules de Dextran attachés par mole de protéines de lactosérum et ce, indépendamment du poids moléculaire du Dextran. Ainsi, le nombre de molécules passe de 0,75-1 à 5,6-5,7 pour le Dextran de 29,4 ou 42,2kDa lorsque l'on double le temps d'incubation.

- la température d'incubation et l'humidité. Jimenez-castaño *et al.* (2007) ont comparé la glycation entre la β -lactoglobuline et le Dextran en réalisant la réaction de Maillard à 60°C ; 0,44 a_w ou à 55°C ; 0,65 a_w . La réaction réalisée à 60°C ; 0,44 a_w montre des vitesses plus importantes que celle réalisée à 55°C ; 0,65 a_w . Néanmoins, le taux de glycation est similaire dans les deux cas.

- le type de chauffage. Guan *et al.* (2006) ont comparé l'influence de deux modes de chauffage : le bain-marie à 90°C pendant 2-3 minutes et le micro-onde à 90°C pendant 1,5 minutes sur la glycation de protéines de Soja (SPI) par trois glucides (lactose, maltose et Dextran). Ils montrent que les constantes de disparitions des groupements aminés libres sont multipliées par des facteurs 5,9 ; 6,6 et 57 par chauffage au micro-onde pour les mélanges SPI-lactose ; SPI-maltose et SPI-Dextran, respectivement. Les auteurs supposent que l'utilisation du micro-onde augmente la vibration des molécules entraînant une mobilité plus accrue et donc une augmentation de la réaction de Maillard.

Toutefois les résultats obtenus sont en accord avec la littérature scientifique. En effet les ordres de réactivité sont similaires à ceux de la littérature :

(Moins réactif) **Dextran < FOS < Glucose < Xylose** (plus réactif)

Cet ordre de réactivité est supporté par de nombreuses études (*Laroque et al.*, 2008 ; *Drusch et al.*, 2009 ; *Hiller et Lorenzen*, 2010). Toutefois la réactivité des glucides dépend de nombreux facteurs.

D'une manière générale, les glucides peuvent être classés par poids moléculaire, du plus faible vers le plus élevée : monosaccharides > disaccharides > oligosaccharides > polysaccharides. Certains auteurs supposent qu'il existe une corrélation linéaire entre le degré de glycation et la taille des glucides (*Nackta et al.*, 1998 ; *Li et al.*, 2009b).

Cette classification reflète plusieurs mécanismes réactionnels. Le premier critère de réactivité des glucides est la présence de fonction réductrice (fonction carbonyle). Cette fonction est présente lorsque le monosaccharide ou le dernier élément de la chaîne est sous forme acyclique. La stabilité thermique du glucide utilisé influe sur la proportion des formes cycliques/acycliques. Plus le glucide est stable thermiquement, moins il existera sous forme acyclique dans le milieu réactionnel (*Oliver et al.*, 2006). Cette stabilité est aussi assurée par la longueur de la chaîne carbonée, plus celle-ci est longue, plus la molécule est stable (*Aoki et al.*, 2001 ; *Corzo-Martinez et al.*, 2010).

Pour les monosaccharides, la forme acyclique est présente dans les mélanges. Toutefois, si la forme pyranose (cyclique) du glucide est stable, alors le glucide sera moins réactif vis-à-vis de la réaction de Maillard. La stabilité des formes pyranoses est liée à la conformation de la molécule ; ainsi si les groupements hydroxyles sont tous du même côté du cycle, il y a encombrement et tension (cas du Xylose) ce qui favorise la forme acyclique et donc réactive du glucide (*Laroque et al.*, 2008). Le Glucose, glucide très utilisé dans la littérature, notamment dans les systèmes modèles, est moins réactif que le Xylose. Cette différence est due à la stabilité thermique et stérique de la forme cyclique du Glucose comparé au Xylose. L'utilisation de glucides plus réactifs permet, entre autre, de pouvoir diminuer la température d'incubation et donc de limiter l'apparition potentielle de composés cytotoxiques.

Dans le cas des oligosaccharides, la vitesse initiale de réaction diminue avec l'augmentation de la taille de l'oligosaccharide. En utilisant un dipeptide de synthèse, ayant un groupement aminé bloqué et une bonne accessibilité de la lysine, Ter Haar *et al.* (2011) se sont penchés sur la réactivité d'oligosaccharides de Glucose. Ils montrent que plus le degré de polymérisation (DP) des oligosaccharides augmente, moins la réaction de Maillard est poussée. Néanmoins, l'effet de l'augmentation du degré de polymérisation sur la réaction de Maillard n'est pas linéaire mais montre plutôt une tendance logarithmique. Ainsi la différence entre le Glucose et le rhamnose est plus importante que la différence entre le maltoheptaose et le maltooctaose. Cet impact du degré de polymérisation de l'oligosaccharide sur la réaction de Maillard a aussi été démontré avec des protéines natives (ovalbumine et α -lactalbumine) (Aoki *et al.*, 2001 ; Ter Haar *et al.*, 2011).

Dans ces deux cas, les variations de vitesse de réaction entre les différents mélanges sont dues non pas au nombre de fonctions réductrices mais à la longueur de la chaîne glucidique. En effet, les mélanges ont été réalisés en ratio molaire lysine : fonction réductrice constant quel que soit le glucide utilisé. Ainsi, Ter Haar *et al.* (2011) montrent que la vitesse de glycation entre l' α -lactalbumine et le maltoheptaose est 8 fois plus faible qu'en présence de maltotriose et 40 fois plus faible qu'en présence de Glucose.

Dans certains cas, les liaisons glucosidiques sont plus ou moins labiles et une hydrolyse partielle ou totale de la molécule peut survenir lors de la réaction, libérant des fonctions réductrices. C'est par exemple le cas, de l'inuline, un oligosaccharide composé d'unités fructoses (liaisons β 2-1) et d'une unité Glucose terminale (liaisons β 2-1) (Oliver *et al.*, 2006).

Les polysaccharides sont des molécules stables du fait de leur taille et de la présence de chaînes latérales. De plus, souvent une seule fonction réductrice est présente par molécule ce qui réduit leur réactivité vis-à-vis de la réaction de Maillard. En outre, de la faible proportion de fonctions réductrices sous forme linéaire, les polysaccharides de par leur structure ramifiée provoquent un encombrement stérique autour des fonctions aminées libres ce qui prévient la réaction de plusieurs glucides avec la même molécule (Kato, 2002 ; Oliver *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2009b ; Corzo-Martinez *et al.*, 2010 ; Xu *et al.*, 2010). Ainsi Ter Haar *et al.* (2011) ont montré qu'il y a une diminution de la disponibilité et de l'accessibilité des fonctions aminées libres en présence de Dextran.

En milieu sec, tout comme en milieu liquide, la réaction de Maillard peut être contrôlée par la diffusion de molécules. Ainsi les petites molécules sont plus mobiles dans le milieu réactionnel et donc plus réactives (Acevedo *et al.*, 2005). Toutefois, en milieu sec, la mobilité des molécules devient un facteur limitant, et celles ci se déplacent par diffusion. En plus de la mobilité, la température devient, en milieu sec, un facteur clé de la réaction. Non seulement elle oriente la réaction vers une voie prédominante mais, si celle ci est inférieure à la température de transition vitreuse (T_g) du système, alors la réactivité des molécules diminuera. Ce paramètre est plus important dans le cas des oligo et polysaccharides. En effet, pour des températures supérieures à leur T_g ils deviennent plus flexibles et donc plus réactifs (Acevedo *et al.*, 2005 ; Kawai *et al.*, 2005). Dans notre étude, nous avons choisi de travailler à 50°C, afin de rester en conditions douces pour la réaction de Maillard et limiter la production de composés cytotoxiques. Les températures de transition vitreuse pour les pentoses sont de l'ordre de 5°C, pour les hexoses de 31°C et dans le cas du Dextran elle est supérieure à 120°C. Nous avons donc bien travaillé à une température supérieure à la T_g pour le Xylose et le Glucose mais pas dans le cas du Dextran. Ceci pourrait expliquer la faible réactivité du Dextran au cours de la réaction de Maillard.

3.2.1.3 Etude des profils chromatographiques

Les profils chromatographiques donnent des informations précieuses sur la taille des composés néoformés ainsi que sur la réactivité des glucides et l'impact de la taille et de la source protéique. Pour cela, les chromatogrammes ont été extraits à deux longueurs d'onde : 220 nm pour mettre en évidence les liaisons peptidiques et 294 nm pour mettre en évidence les composés aromatiques, intermédiaires de la réaction (Sumaya Martinez *et al.* 2007).

Les échantillons ont été préparés à la même concentration en équivalent protéines (5mg.ml⁻¹) et le même volume a été injecté (50µL) en chromatographie afin d'évaluer l'impact de la glycation. Si l'aire totale des mélanges glyqués à 220nm augmente par rapport aux mélanges natifs, alors cela démontre la présence de composés néoformés lors de la réaction.

Caséinate de sodium

Tous les échantillons de caséinate de sodium ont été analysés avec la colonne Superdex 200 10/300GL qui fractionne entre 10 et 600 kDa. Les chromatogrammes des échantillons issus des RM en présence de tampon phosphate sont présentés en annexe 3 et 4

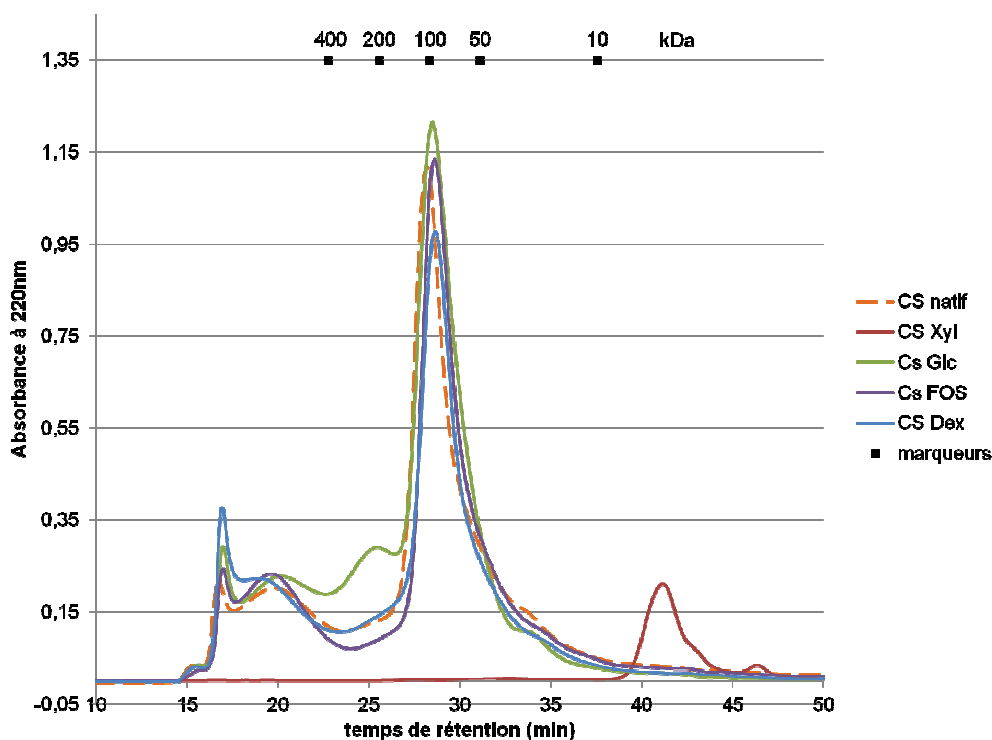


Figure 3.18 : Profils chromatographiques, extraits à 220nm, du caséinate de sodium seul et du caséinate de sodium incubé respectivement en présence de Xylose, Glucose, FOS et de Dextran en eau distillée. Colonne Superdex 200 10/300GL, élution par le tampon phosphate 50mM (pH 7) + NaCl 0.15M, débit de 0,5ml.min⁻¹.

Le caséinate est issu des caséines α_{S1} , α_{S2} , β et κ dont les poids moléculaires sont 23, 25, 24 et 19kDa, respectivement. Sur la figure 3.18, on remarque que le caséinate natif (courbe orange) sort, majoritairement, à un temps de rétention correspondant à un poids moléculaire estimé à 100kDa. De plus, on observe la présence de pics de caséinate à des temps de rétention inférieurs à 15 min, c'est-à-dire dans le volume mort de la colonne, ce qui correspond à des molécules de poids moléculaire supérieurs à 600kDa. Ces résultats, correspondant à des poids moléculaires supérieurs au poids des caséines seules suggèrent qu'il y a des agrégations, ou des micelles dans le caséinate utilisé.

La répartition des poids moléculaires du caséinate de sodium (tableau 3.3) est de 25,4% de molécules de poids supérieur à 200kDa ; 48,2% de molécules de poids compris entre 50 et 200kDa et 16,4% de molécules de poids inférieur à 50kDa. Cette répartition est proche de celle reportée par Hiller et Lorenzen (2010) dont la répartition des poids des molécules de caséinate est de 19% pour les molécules de poids supérieur à 200kDa ; 56,8% pour les molécules de poids compris entre 20 et 200kDa et 24,2% pour les molécules de poids inférieur à 20kDa.

Les différences de répartition moléculaire peuvent être dues à la méthode de mesure, en effet alors que nous avons opté pour la chromatographie d'exclusion sérique, ces auteurs ont opté pour la SDS page. La source du caséinate peut aussi légèrement influencer sur la répartition par sa préparation, son conditionnement et son stockage.

Le mélange CS + Xylose possède un profil chromatographique très différent des autres échantillons. Cela s'explique par la faible solubilité des échantillons, ainsi seule la fraction soluble d'un mélange préparé à 20mg.mL⁻¹ (soit une concentration 4 fois supérieure à celle des autres échantillons) a pu être injectée. De ce fait, la répartition des poids moléculaire n'a pas pu être déterminée.

Dans le cas des autres mélanges, on remarque que les profils chromatographiques sont proches de celui du caséinate natif. Toutefois, dans le cas du mélange CS + Glucose, on remarque une différence de profil entre 20 et 27 minutes par rapport au caséinate natif : il n'y a pas de diminution de l'absorbance. Cela peut s'expliquer par la présence de composés néoformés. En effet, lorsque l'on regarde le pourcentage des composés par classe de taille dans cette zone on remarque une augmentation par rapport au caséinate natif pour la classe de peptide 200-400kDa (multiplication par 3) et pour la classe de peptide 100-200 kDa (multiplication par 2.5).

Tableau 3.3 : Répartition des composés par classes de taille : caséinate de sodium seul et du caséinate de sodium incubé respectivement en présence de Glucose, FOS et de Dextran.

Glycoconjugué	Répartition des peptides (%) en fonction de leur poids moléculaire (Da)				
	> 400 000	400 000 à 200 000	200 000 à 100 000	100 000 à 50 000	< 50 000
CS natif	21,51	3,87	9,06	39,14	26,42
CS Glc Rm ed	21,41	10,59	22,47	32,96	12,55
CS Glc Rm tp	31,77	12,77	22,28	22,23	10,95
CS FOS Rm ed	23,27	4,13	16,38	37,16	19,06
CS FOS Rm tp	24,7	5,22	21,18	28,64	20,26
CS Dex Rm ed	26,07	6,51	17,6	31,93	17,89
CS Dex Rm Tp	25,14	6,83	23,69	26,78	17,56

Lorsque l'on observe la figure 3.22, on remarque que l'allure des chromatogrammes à 294nm suit celle des chromatogrammes à 220nm. On remarque aussi que l'absorbance avec le Glucose est supérieure ce qui confirmerait l'apparition de composés néoformés.

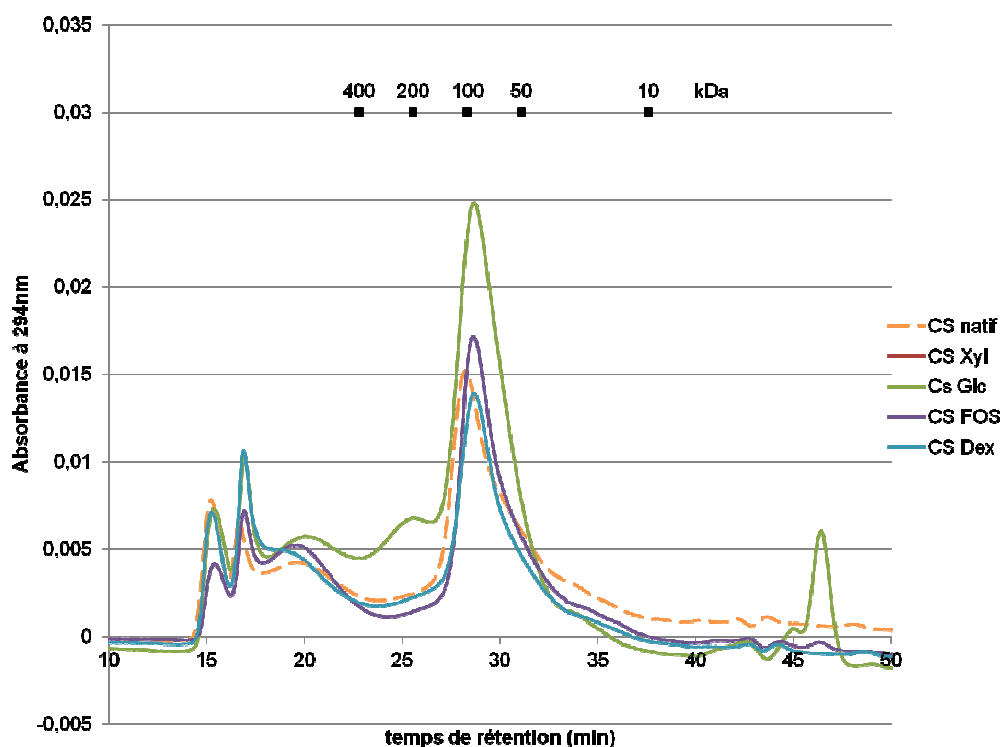


Figure 3.19 : Profils chromatographiques, extraits à 294nm, du caséinate de sodium seul et du caséinate de sodium incubé respectivement en présence de Xylose, Glucose, FOS et de Dextran en eau distillée. Colonne Superdex 200 10/300GL, élution par le tampon phosphate 50mM (pH 7) + NaCl 0.15M, débit de 0,5ml.min⁻¹.

A 294nm, on observe comme à 220nm une légère augmentation de l'aire sous la courbe en présence de caséinate maillardisé avec le Glucose (figure 3.19). Cette augmentation indique la production de composés aromatiques lors de la glycation. Pour les autres glucides, aucune différence significative est observée comparativement au caséinate natif.

Hydrolysats de crevette

Les échantillons d'hydrolysats de crevette glyqués avec le Xylose, le Glucose et les FOS ont été analysés avec la colonne superdex peptide HR 10/300GL dont le domaine de fractionnement est compris entre 100 et 7000 Da. Les chromatogrammes des échantillons issus des RM avec le Xylose, le Glucose et les FOS en présence de tampon phosphate sont présentés en annexe 5 et 6. L'hydrolysats de crevette glyqués avec le Dextran a été analysé avec la colonne Superdex 200 10/300GL qui fractionne entre 10 et 600 kDa. Les chromatogrammes issus de la RM en tampon phosphate avec le Dextran sont présentés en annexe 7 et 8. L'hydrolysats de crevette natif a été analysé avec les deux colonnes.

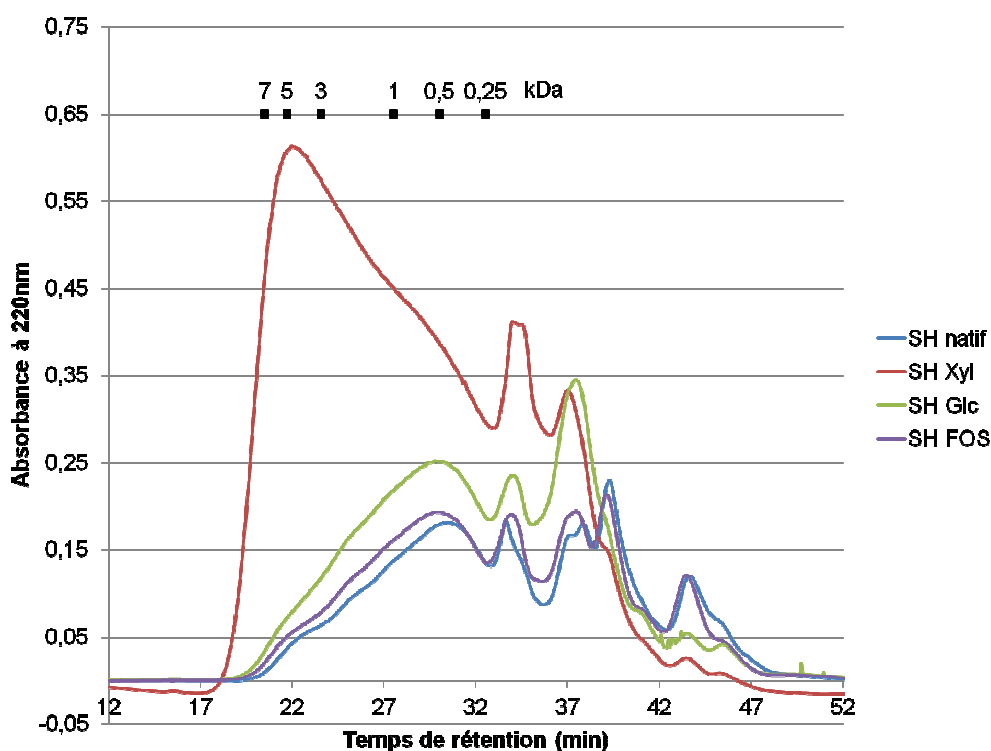


Figure 3.20 : Profils chromatographiques, extraits à 220nm, d'un hydrolysate de crevette natif et d'un hydrolysate de crevette incubé respectivement en présence de Xylose, Glucose et de FOS en eau distillée. Colonne Superdex peptide HR 10/300GL, élution par un mélange 30 :70 d'acétonitrile et d'eau + TFA (0,01%), débit de 0,5ml.min⁻¹

Sur la figure 3.20, on remarque que les profils chromatographiques sont différents en fonction du glucide utilisé. Le tableau 3.3 résume la répartition des poids moléculaires de l'hydrolysate de crevette natif et maillardisée. Le profil chromatographique du mélange SH+FOS (courbe mauve) après réaction de Maillard est proche de celui de l'hydrolysate natif (courbe bleu). Ces résultats soulignent le caractère peu réactif des fructooligosaccharides dans de la réaction de Maillard.

Au contraire le mélange SH+Xylose (courbe rouge) après réaction de Maillard diffère de l'hydrolysate natif. On remarque la formation de composé de plus hauts poids moléculaires (entre 3 et 7kDa) ainsi qu'une augmentation importante de l'aire sous la courbe.

Le mélange SH+Glucose présente une forme intermédiaire. Bien que son profil chromatographique soit proche de celui de l'hydrolysate natif, l'aire sous la courbe augmente légèrement et on observe une augmentation de la proportion des peptides aux alentours de

500Da ainsi qu'un pic aux alentours de 37minutes de temps de rétention soit un poids moléculaire inférieur à 100Da.

Tableau 3.4 : Répartition de l'hydrolysate de crevette natif et l'hydrolysate de crevette natif incubé respectivement en présence de Xylose, Glucose, FOS et de Dextran en fonction de leur poids moléculaire.

	Répartition des peptides (%) en fonction de leur poids moléculaire (Da)				
Glycoconjugué	> 7000	7000-3000	3000-1000	1000-500	< 500
SH natif	0,22	4,37	13,45	13,52	68,45
SH Xyl Rm ed	6	20,99	23,53	12,33	37,15
SH Xyl Rm Tp	11,13	24,25	21,6	10,67	32,35
SH Glc Rm ed	0,56	5,82	16,55	14,48	62,58
SH Glc Rm tp	0,56	6,34	17,6	14,9	60,61
SH FOS Rm ed	0,41	5,17	15,32	14,29	64,82
SH FOS Rm tp	0,35	5,2	14,98	13,81	65,66

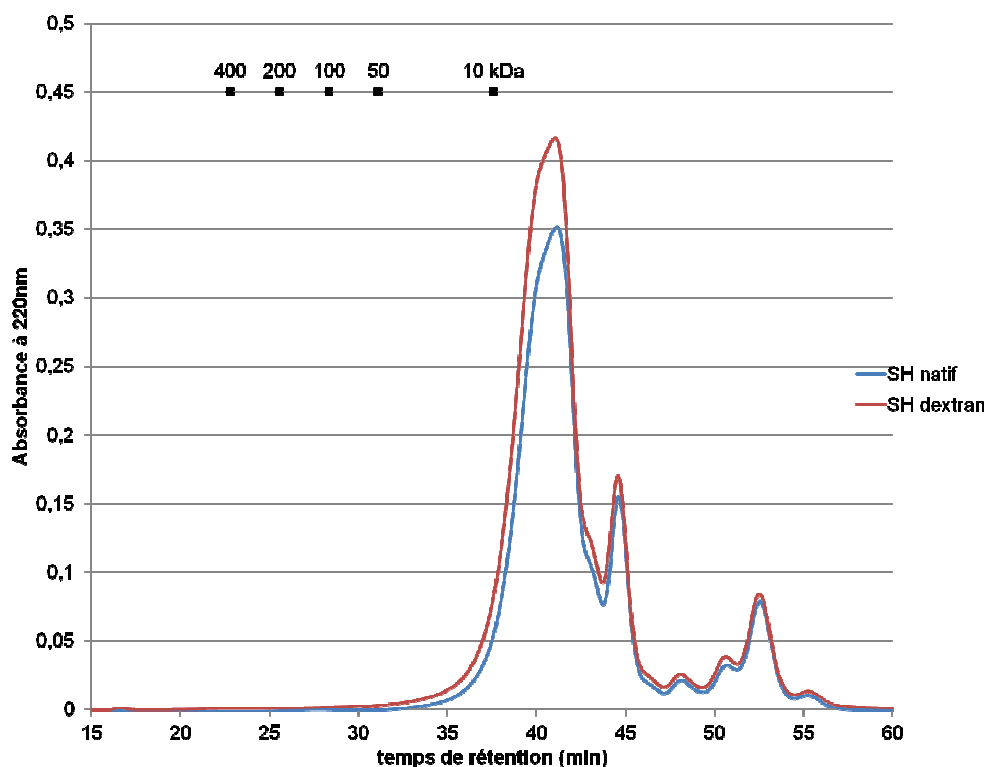


Figure 3.21 : Profils chromatographiques, extraits à 220nm, d'un hydrolysate de crevette et d'un hydrolysate de crevette incubé avec du Dextran. Colonne Superdex 200 10/300GL, élution par le tampon phosphate 50mM (pH 7) + NaCl 0.15M, débit de 0,5ml.min⁻¹.

Sur la figure 3.21, on observe que les profils chromatographiques de SH et SH – Dextran sont proches. De plus, dans le cas du SH+ Dextran, on ne détecte pas de composés supérieurs à 10kDa, or le Dextran utilisé dans l'étude possède un poids moléculaire moyen de 170kDa. On peut donc supposer que la glycation avec le Dextran a été faible car on observe une légère augmentation de l'aire sous la courbe. Toutefois, comme la distribution des poids moléculaires n'est pas affectée, on peut émettre l'hypothèse que la faible glycation est due à la présence de glucides libérés des molécules de Dextran au cours du processus de fabrication des PRM.

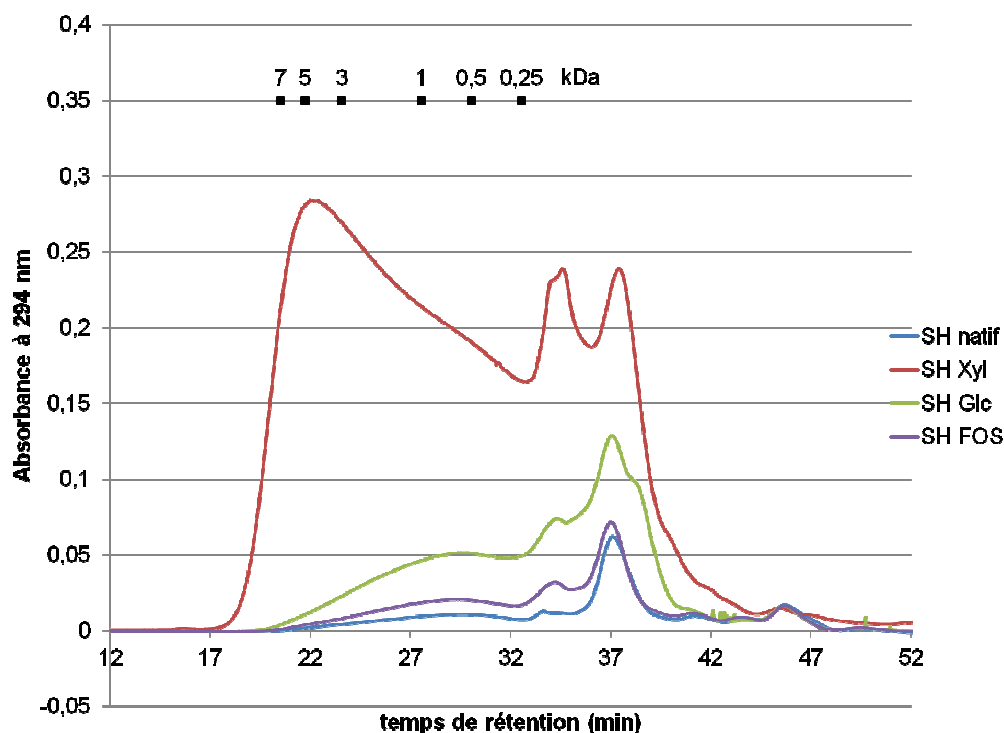


Figure 3.22 : Profils chromatographiques, extrait à 294nm, d'un hydrolysats de crevette et d'un hydrolysats de crevette incubé respectivement en présence de Xylose, Glucose et de FOS en eau distillée. Colonne Superdex peptide HR 10/300GL, élution au par un mélange 30 :70 d'acétonitrile et d'eau + TFA (0,01%), débit de 0,5ml.min⁻¹

A 294 nm, on observe les mêmes tendances qu'à 220 nm c'est-à-dire qu'il y a peu de différence entre le mélange natif et le mélange SH + FOS maillardisé ; la glycation en présence de Glucose entraîne une légère augmentation de l'absorbance, (figure 3.22). La glycation avec le Xylose entraîne la production de nombreux composés aromatiques, qui dans ce cas, sont de taille comprise entre 7000 et 100 Da.

Synthèse :

Premièrement, l'ordre de réactivité des glucides lors de la réaction de Maillard en milieu sec est le même pour les deux sources protéiques utilisées :

(moins réactif) **Dextran < FOS < Glucose < Xylose** (plus réactif)

De plus, la glycation entre l'hydrolysate de crevette et le Xylose entraîne l'apparition de composés de plus haut poids moléculaire que ceux de l'hydrolysate natif (entre 3 et 7kDa) ainsi que celle de nombreux composés aromatiques. Dans le cas de la glycation entre l'hydrolysate de crevette ou le caséinate de sodium avec le Glucose, ces apparitions sont moins marquées

3.2.2 Effet du poids moléculaire de la source protéique

Afin de voir l'impact de la taille des peptides sur la réaction de Maillard, la protéine de référence, le caséinate de sodium, a été hydrolysée par l'Alcalase® 2,4L afin d'augmenter le nombre de fonctions aminées libres. Toutefois, étant donné que seul le ratio E/S varie, c'est la proportion des différents peptides dans le milieu qui va changer (ce qui sera confirmé par les profils chromatographiques).

3.2.2.1 L'hydrolyse du caséinate

Dans un premier temps, quatre hydrolyses de deux heures à différents ratios Enzyme/Substrat ont été réalisées. Les ratios E/S choisis sont 0,375% ; 0.75% ; 1.5% et 3% soit 9, 18, 27 et 36 AU/kg. La figure 3.26 montre les cinétiques de degré d'hydrolyse (DH) du caséinate par l'Alcalase pour les quatre ratios E/S. Les quatre cinétiques d'hydrolyse présentent une vitesse de réaction rapide dans les premières minutes. Puis la vitesse diminue et le degré d'hydrolyse tend vers un plateau qui n'est pas atteint après deux heures d'hydrolyse. Plus la concentration en enzyme est importante, plus le DH au cours du temps est important. Ceci est en accord avec les résultats de Zhao *et al.* (2007) où la caséine est hydrolysée avec 4 concentrations différentes en Alcalase (de 12 à 48 AU/kg). L'évolution du DH au cours du temps montre le même profil que dans notre étude.

Les allures des courbes d'hydrolyse sont similaires à celles de courbes d'hydrolyse enzymatique obtenues à partir d'autres sources protéiques telles que des co-produits marins (Klompong *et al.*, 2007 ; Guérard *et al.*, 2002).

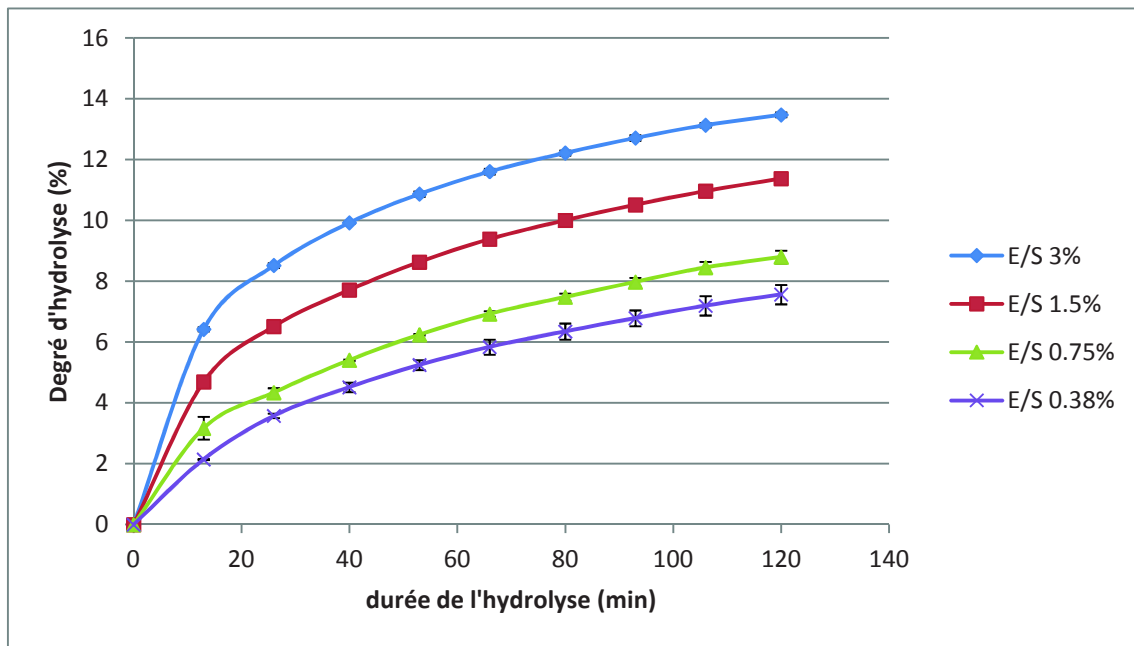


Figure 3.23 : Evolution du DH au cours du temps pour des ratios E/S compris entre 0,38% et 3%. Hydrolyse à pH 8, température de 50°C, ratio Substrat/Eau de 8%.

Lorsque l'on s'intéresse aux DH finaux obtenus, on remarque qu'ils sont inférieurs à ceux obtenus par Zhao *et al.* (2007). Dans notre cas, le degré d'hydrolyse maximum du caséinate atteint 13.5% en incubant le caséinate pendant 2 heures en présence d'Alcalase® 2.4L pour un ratio E/S de 3% alors que Zhao *et al.* (2007) atteignent un DH maximal de 16,5% en hydrolysant la caséine avec l'Alcalase. Toutefois, les conditions d'hydrolyse sont différentes. Premièrement, ils utilisent une concentration en substrat presque deux fois supérieure à la notre (S=15%) et la concentration en enzyme utilisée varie entre 12 et 48 AU/kg. De plus, l'hydrolyse est réalisée à 60°C, pH 8 pendant quatre heures, alors que nous avons réalisé les hydrolyses à 50°C pH 8 pendant deux heures. Ces auteurs montrent que l'hydrolyse de la caséine est plus poussée à 60°C qu'à 50°C en utilisant la même concentration en Alcalase (36 AU/kg) et en substrat. (15%). Pour les mêmes conditions de température, pH et concentration en enzyme, Zhao *et al.* (2007) obtiennent des DH supérieurs aux nôtres, même en comparant les valeurs à 2h d'hydrolyse ce qui peut s'expliquer par la concentration en substrat qui est de 15% dans leur cas et de 8% dans le notre. Cette différence peut aussi être due au procédé de fabrication de du substrat, en effet Zhao *et al.* (2007) utilisent de la caséine alors que nous utilisons du caséinate de sodium qui est obtenu par acidification de la caséine suivi de l'ajout d'un élément basique, ici le sodium.

Le degré d'hydrolyse augmente avec l'augmentation du ratio E/S. La représentation du degré d'hydrolyse en fonction de la concentration en enzyme (\log_{10}) a été utilisée pour déterminer les couples durée d'hydrolyse – ratio E/S pour hydrolyser le substrat à un DH fixé selon Guérard *et al.* (2002) (figure 3.24). Ces courbes ont été utilisées pour fixer les conditions d'hydrolyse afin d'atteindre les trois DH choisis : le DH maximal obtenu de 13,5%, un DH intermédiaire de 10% et un DH faible de 6,5%.

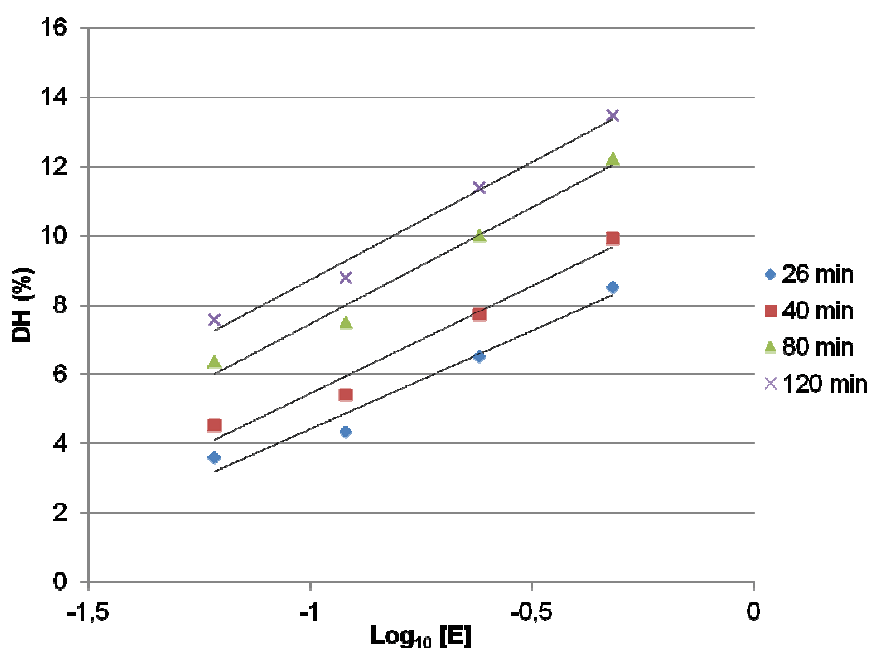


Figure 3.24 : relation entre le \log_{10} (concentration en enzyme) et le DH pour le caséinate de sodium.

Les conditions expérimentales retenues pour atteindre les DH choisis sont les suivantes :

- 13,5% (E/S= 3% ; 120min)
- 10% (E/S = 1.5%; 80 min)
- 6.5% (E/S = 1.5%; 26 min)

La réaction de Maillard a été conduite avec du Xylose ou du Dextran en présence ou non de tampon phosphate soit quatre conditions de réaction de Maillard pour chaque degré d'hydrolyse. Chaque mélange contenant le caséinate hydrolysé (CSH) + le glucide, a été préparé à partir d'un batch d'hydrolyse. La figure 3.25 montre les cinétiques d'évolution du DH pour les trois conditions choisies.

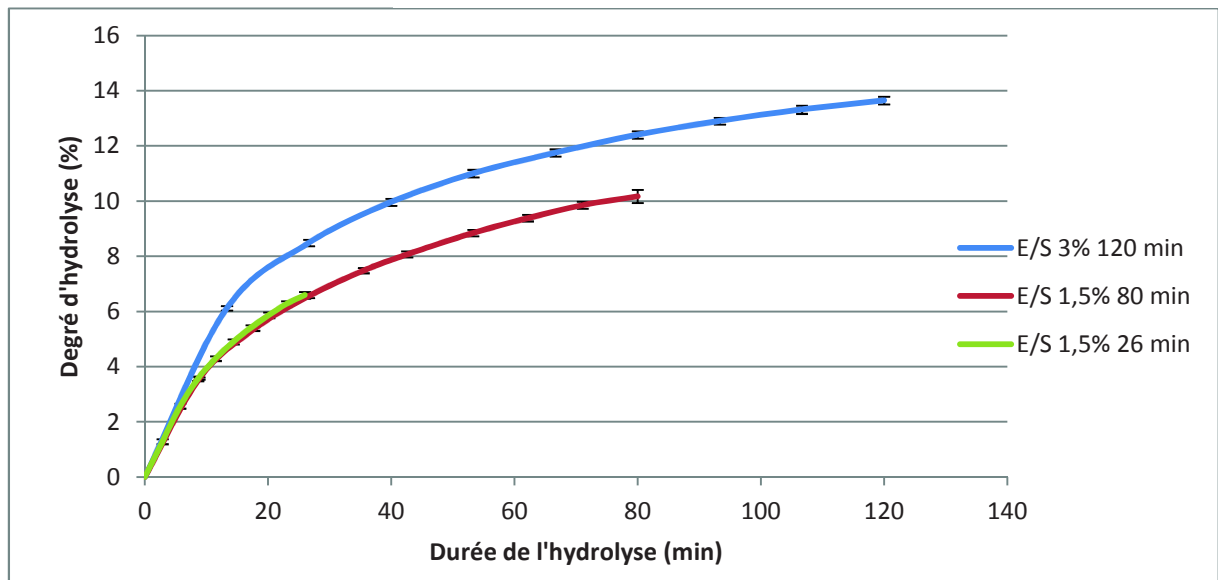


Figure 3.25 : Cinétique d'évolution du degré d'hydrolyse pour les trois conditions expérimentales choisies.

Pour chaque condition expérimentale, la courbe moyenne a été tracée. On remarque que les hydrolyses sont très reproductibles (CV moyen < 2) d'un batch à l'autre. De plus, on remarque sur la figure 3.25 que pour un même ratio de 1,5%, l'hydrolyse de 26 minutes correspond bien au début de l'hydrolyse mené durant 80 minutes.

L'hydrolyse du caséinate permet d'augmenter le nombre de fonctions aminées libres, comme le montre la figure 3.26. On observe une corrélation linéaire ($R^2 = 0,99$) entre le degré d'hydrolyse et la concentration en groupements aminés libres.

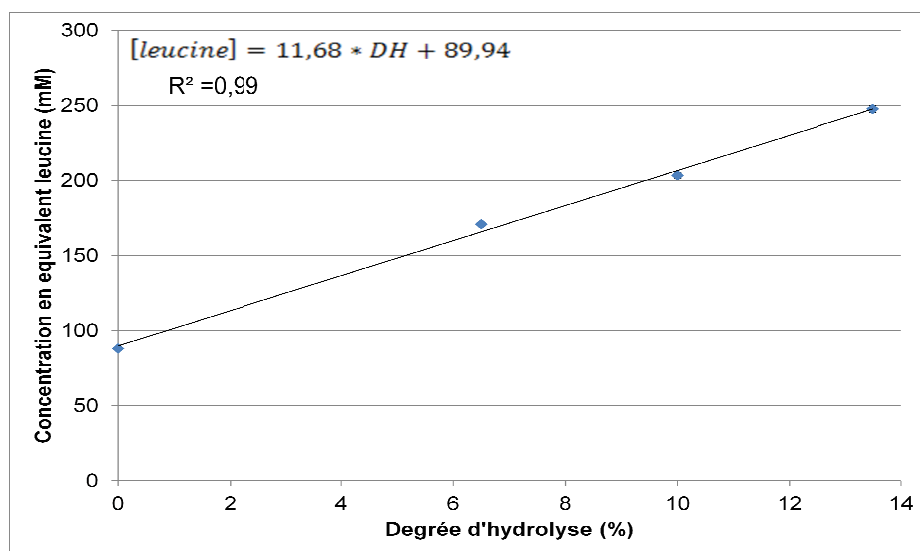


Figure 3.26 : Lien entre le DH et la concentration en fonctions aminées libres.

Toutefois la concentration en groupements aminés libres après une hydrolyse de deux heures (250mM équivalent leucine) est inférieure à celle de l'hydrolysate de crevette (430mM équivalent leucine). Cette différence reflète la taille et la répartition des peptides, l'hydrolysate de

crevette étant plus hydrolysé que l'hydrolysat de caséinate même pour un DH de 13.5%. De plus la composition en acides aminés des deux sources protéiques est différente ce qui aura un impact sur les vitesses de réaction.

3.2.2.2 Dosage des fonctions aminées libres

Pour réaliser l'étude de l'impact du poids moléculaire de la source protéique, sur la RM nous avons choisi de travailler avec deux glucides : le Xylose pour sa réactivité élevée dans la RM et le Dextran pour ses propriétés émulsifiantes.

La mesure des groupements aminés libres, avant et après la réaction de Maillard, permet d'évaluer la mobilisation des fonctions aminées libres lors de la RM.

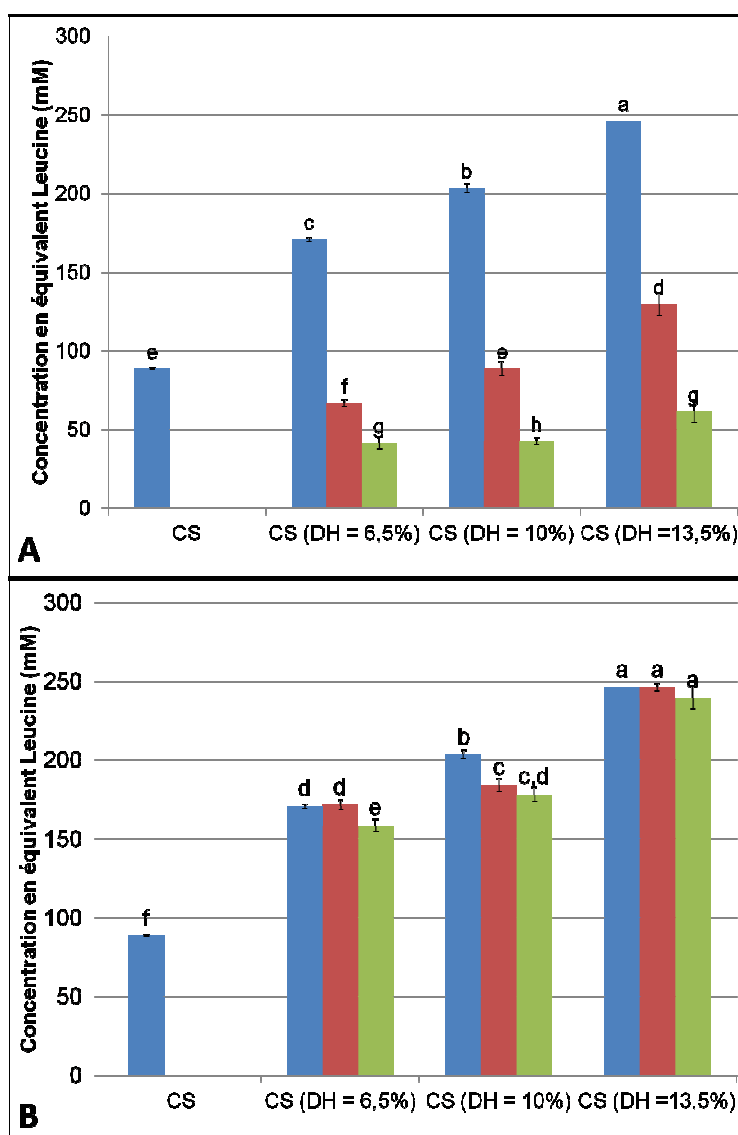


Figure 3.27 : Quantification des groupements aminés libres A : réaction de Maillard en présence de Xylose et B : réaction de Maillard en présence de Dextran (■ Avant la RM ; ■ Après la RM en eau distillée ; ■ Après la RM en tampon phosphate).

Sur la figure 3.27 A, on observe, une forte diminution des groupements aminés libres lors de la glycation avec le Xylose en présence ou non de tampon phosphate. La présence de tampon phosphate augmente la mobilisation des fonctions aminées libres lors de la réaction de Maillard, et dans ce cas on ne remarque pas de différence significative dans la concentration finale en groupements aminés libres pour les trois degrés d'hydrolyse. En présence de tampon, quel que soit le degré d'hydrolyse, environ 75% des fonctions aminées libres initiales sont consommées lors de la réaction de Maillard. Cette consommation correspond à une diminution de 128, 160 et 185 mM équivalent leucine pour CS (DH 6.5%) ; CS (DH 10%) et CS (DH 13.5%) respectivement.

En présence de Dextran (figure 3.27 B), on n'observe pas de diminution significative du nombre de fonctions aminées en présence des trois DH en absence de tampon phosphate sauf pour un DH de 10%. La présence de tampon phosphate permet une faible glycation, toutefois la diminution du nombre de groupements aminés libres n'est pas significativement différente pour les trois DH. On peut donc supposer que dans ce cas la réaction est limitée par les encombrements stériques liés aux ramifications du Dextran ainsi qu'au faible nombre de fonctions réductrices de cette molécule.

La diminution des fonctions aminées libres avant et après réaction de Maillard, pour les différentes conditions utilisées, est synthétisée dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5 : Diminution des fonctions aminées libres (en mM équivalent leucine) en fonction du degré d'hydrolyse, du glucide utilisé et de la présence ou non de tampon phosphate (Tp) lors de la réaction de Maillard.

	DH 6,5%		DH 10%		DH 13,5%	
	sans Tp	Avec Tp	sans Tp	Avec Tp	sans Tp	Avec Tp
Xylose	104,2 ± 2,1	129,4 ± 4,11	114,7 ± 4,5	160,9 ± 2,4	116, 4± 7,3	184,9 ± 7,1
Dextran	0 ± 2,9	12,2 ± 3,6	19,2 ± 4,3	25 ± 4,5	0 ± 1,6	6,6 ± 7,4

L'influence des peptides et/ou des protéines sur la réaction de Maillard reste un sujet délicat du fait de leur complexité. Néanmoins quelques auteurs (Lu *et al.*, 2005 ; Lan *et al.*, 2010 ; Ter Haar *et al.*, 2011) se sont penchés sur l'influence de la nature des peptides lors de la réaction de Maillard en utilisant des peptides purs tels que la diglycine, la triglycine ou la tetraglycine ou des peptides de synthèses.

Dans certains cas, une dégradation thermique des peptides peut avoir lieu pendant le chauffage induisant un enrichissement en fonctions aminées libres au cours de la réaction (Kim et Lee, 2009b). Ceci n'est pas le cas dans notre étude car les hydrolysats chauffés seuls ne présentent pas d'augmentation de la concentration en fonctions aminées libres.

A même concentration massique, plus la taille du peptide est faible, plus la concentration en fonctions aminées libres est importante. Ces différences peuvent entraîner des changements de vitesse de réaction. En effet, Ter Haar *et al.* (2011) observent une augmentation de 17% de la vitesse de réaction quand le ratio molaire lysine :Glucose passe de 1:2 à 1:5 mais seulement de 14% lorsque le ratio passe de 1:5 à 1:10.

La taille et la structures des peptides/protéines jouent un rôle dans la glycation et ce, en fonction du glucide utilisé. Ainsi Ter Haar *et al.*, (2011) ont mesuré le pourcentage de lysine modifiée au cours de la réaction de Maillard entre α -lactalbumine ou le FAAL (dipeptide : 3-(2-furyl)acryloyl-Ala-Lys-OH) en présence de Glucose, maltriose et maltoheptaose. En présence de Glucose les deux sources protéiques présentent la même cinétique (courbes superposables) de modification de la lysine. En revanche, lorsque ces deux sources protéiques sont en présence de maltriose ou de maltoheptaose, la mobilisation des fonctions aminées libres est plus importante en présence de FAAL qu'avec l' α -lactalbumine. Dans le cas du maltotriose, après avoir présenté la même cinétique de modification de la lysine pendant les premières 24h, on observe une diminution du taux de réaction en présence d' α -lactalbumine. Dans le cas du maltoheptaose, la cinétique de réaction avec l' α -lactalbumine est plus faible que celle en présence de FAAL et ce dès le début de la réaction. Cette différence s'expliquerait par la différence de mobilité des molécules (sources protéiques et glucidiques) mais aussi par l'accessibilité des groupements aminés libres après le début de la réaction (encombrements dus aux glucides glyqués).

Dans ce cas, le premier glucide greffé sur la protéine peut inhiber la glycation de glucides sur les autres sites de la protéine. Cette inhibition est due soit aux encombrements stériques soit à des changements conformationnels de la protéine du fait de la glycation qui masque les autres sites potentiellement réactifs.

Hwang *et al.* (2011) ont étudié différents mélanges d'acides aminés et de Glucose ou de fructose. En mesurant l'absorbance à 294nm des différents mélanges, ils montrent que certains acides aminés sont plus réactifs lors du chauffage en présence de fructose. Les mélanges fructose et tryptophane, alanine, asparagine, glutamine, acide aspartique, acide glutamique, histidine ou lysine possèdent les absorbance à 294nm les plus importantes. Cette longueur d'onde sert à détecter les composés intermédiaires de la réaction de Maillard. La composition en acides aminés de la source protéique hydrolysée, peut donc entraîner des différences de réactivité vis-à-vis de la réaction de Maillard.

Etant donné que la composition en acides aminés ne change pas avec l'hydrolyse enzymatique, on peut supposer que la réaction de Maillard est promue par :

- la concentration en fonctions aminées libres qui augmente avec le degré d'hydrolyse
- l'augmentation de la mobilité de la source protéique avec la diminution de son poids moléculaire.

3.2.2.3 Brunissement

Comme dans le cas de la protéine native, on observe à la fois un changement de l'aspect de la poudre (aspect visqueux, changement de la granulométrie) et de la couleur après la réaction de Maillard (figure 3.28). Néanmoins, le changement de couleur est visible à la fois dans les échantillons contenant du Xylose mais aussi dans ceux contenant du Dextran à partir du degré d'hydrolyse de 10%.

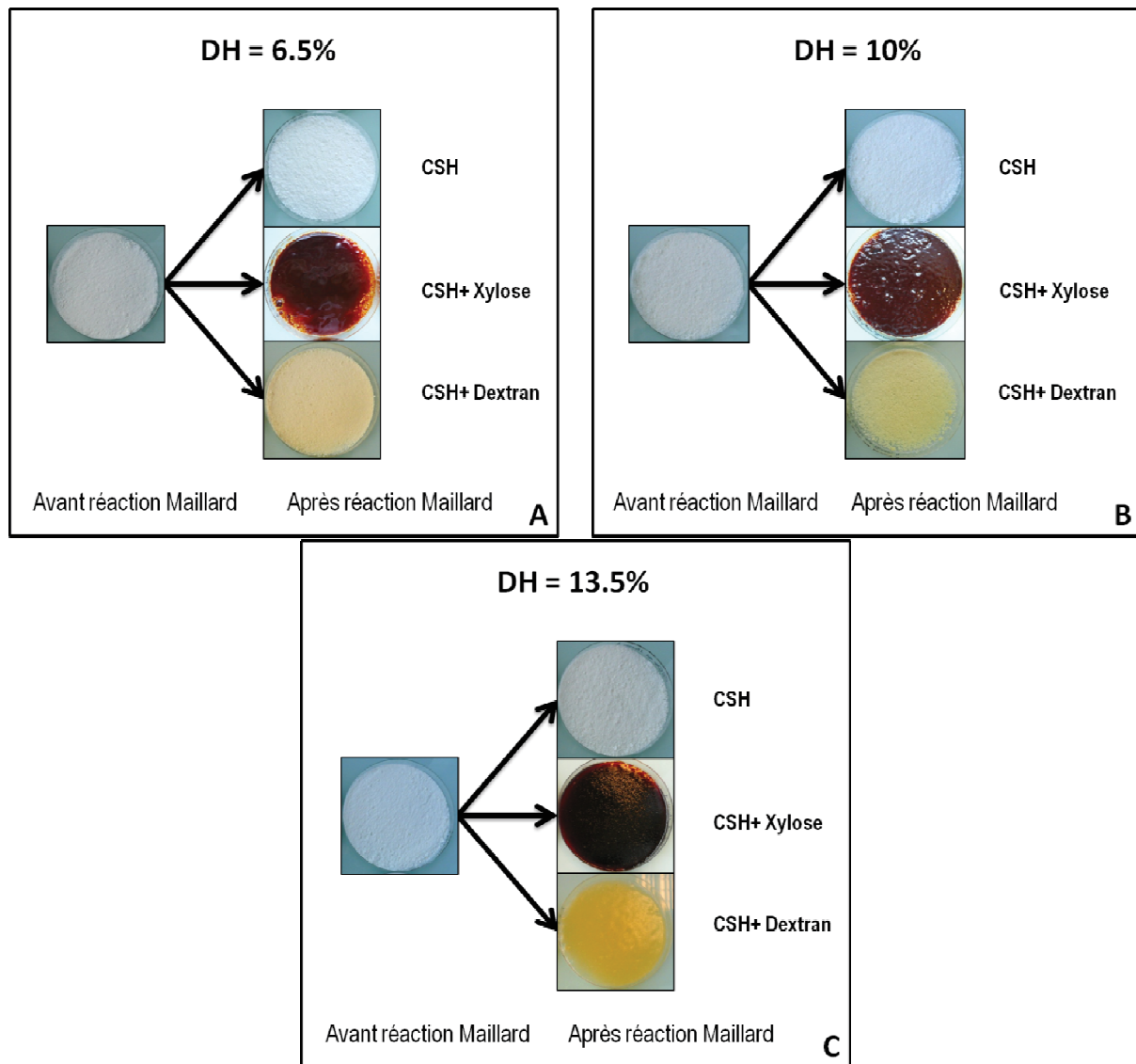


Figure 3.28 : Evolution de la couleur consécutive à une réaction de Maillard entre différents hydrates de carbonnes et le caséinate hydrolysé à 6.5% (A) ; 10% (B) et 13,5% (C)

Toutefois, l'incubation de l'hydrolysate de caséinate en présence de Xylose entraîne, comme pour la protéine native, une augmentation significative de l'absorbance à 420nm (figure 3.29). Celle-ci est multipliée, après réaction de Maillard par 32, 30 et 22 pour CSH (DH = 6.5%) Xylose, CSH (DH = 10%) Xylose et CSH (DH = 13.5%) Xylose, respectivement. On remarque que le brunissement est plus important en présence de Xylose qu'en présence de Dextran.

En présence de Dextran, on observe une augmentation significative de l'absorbance avec l'augmentation du degré d'hydrolyse, celle-ci est multipliée, après réaction de Maillard d'un facteur 1,2 et ce quel que soit le DH.

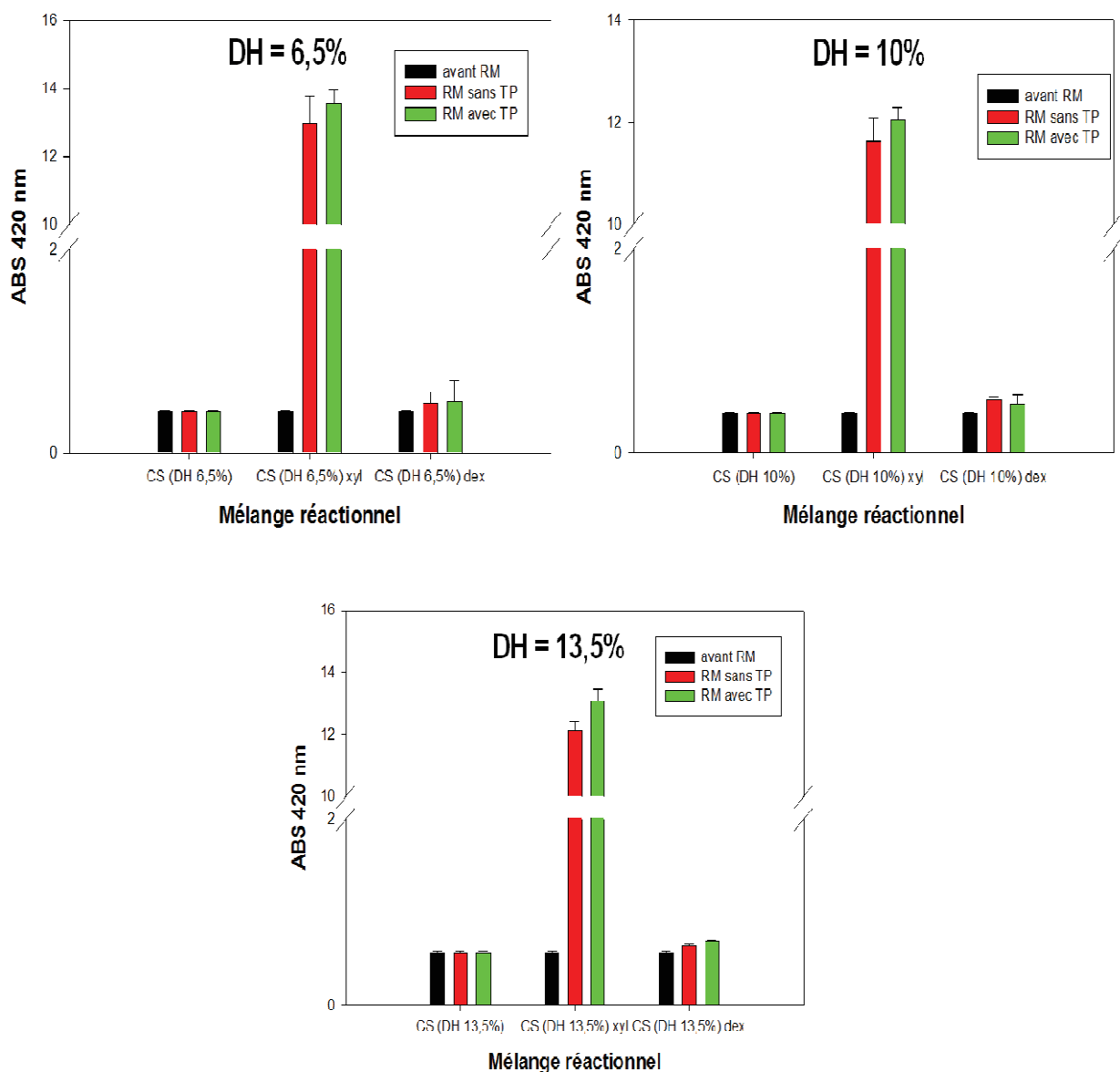


Figure 3.29 : Evolution du brunissement en fonction du degré d'hydrolyse.

Dans le cas de l'hydrolysate de crevette, l'absorbance à 420nm du mélange SH Xylose maillardisé atteint la valeur de 17, ce qui correspond à la multiplication par un facteur 40 de l'absorbance avant la réaction. Cette valeur d'absorbance est supérieure à celle des caséinates hydrolysés glyqués avec le Xylose. La différence peut s'expliquer par la différence de concentration en fonctions aminées libres ainsi que par composition différente en acides aminés des deux sources protéiques entraînant une réaction plus importante avec l'hydrolysate de crevette.

Comme pour l'évolution du nombre de groupements aminés libres on observe un effet positif du tampon phosphate sur le brunissement.

3.2.2.4 Etude des profils chromatographiques

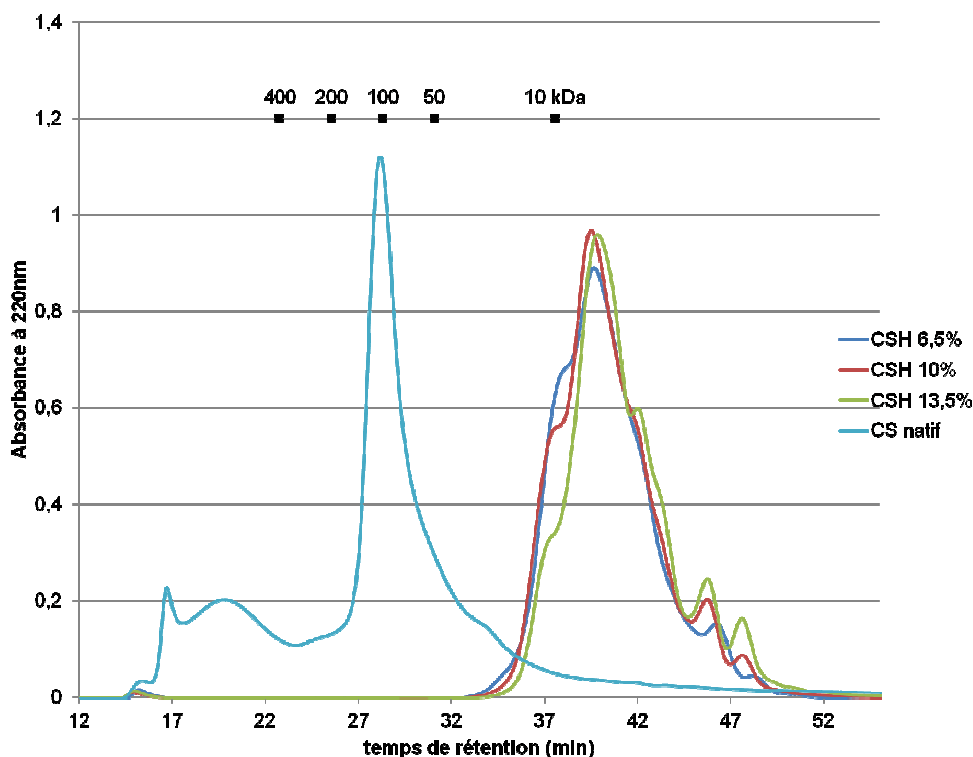


Figure 3.30 : Chromatogramme extrait à 220nm du caséinate natifs et des caséinates hydrolysés avec l'Alcalase® 2,4L. Colonne Superdex 200 10/300GL, élution par le tampon phosphate 50mM + NaCl 0.15M, débit de 0,5ml.min⁻¹.

Comme vu précédemment le caséinate natif sort à un temps de rétention supérieur à celui attendu (figure 3.30).

Dans le cas des hydrolysats de caséinate, les composés de haut poids moléculaires ne sont plus présents, les composés ont des poids moléculaires de l'ordre de 10 kDa. Cela suggère que l'hydrolyse a scindé les agrégats ou les micelles. Sur ces chromatogrammes, il est difficile de différencier les trois degrés d'hydrolyse, la colonne utilisée étant faiblement discriminante pour les faibles poids moléculaires (tableau 3.6). Afin de mieux caractériser les trois caséinates hydrolysés, une deuxième série de chromatographie a été réalisée avec une colonne Superdex peptide HR 10/300GL dont le domaine de fractionnement est compris entre 7 000 et 100 Da (figure 3.31).

Tableau 3.6 : répartition des poids moléculaire entre le caséinate natif et le caséinate hydrolysé à trois degré d'hydrolyse différents.

Glycoconjugué	Répartition des peptides (%) en fonction de leur poids moléculaire (Da)				
	> 400 000	400 000 - 200 000	200 000 - 100 000	100 000 - 50 000	< 50 000
CS natif	21,51	3,87	9,06	39,14	26,42
CSH 6,5%	0,52	0	0	14,53	84,95
CSH 10%	0,34	0,09	0,01	9,4	90,18
CSH 13,5%	0,45	0,01	0,06	5,58	93,9

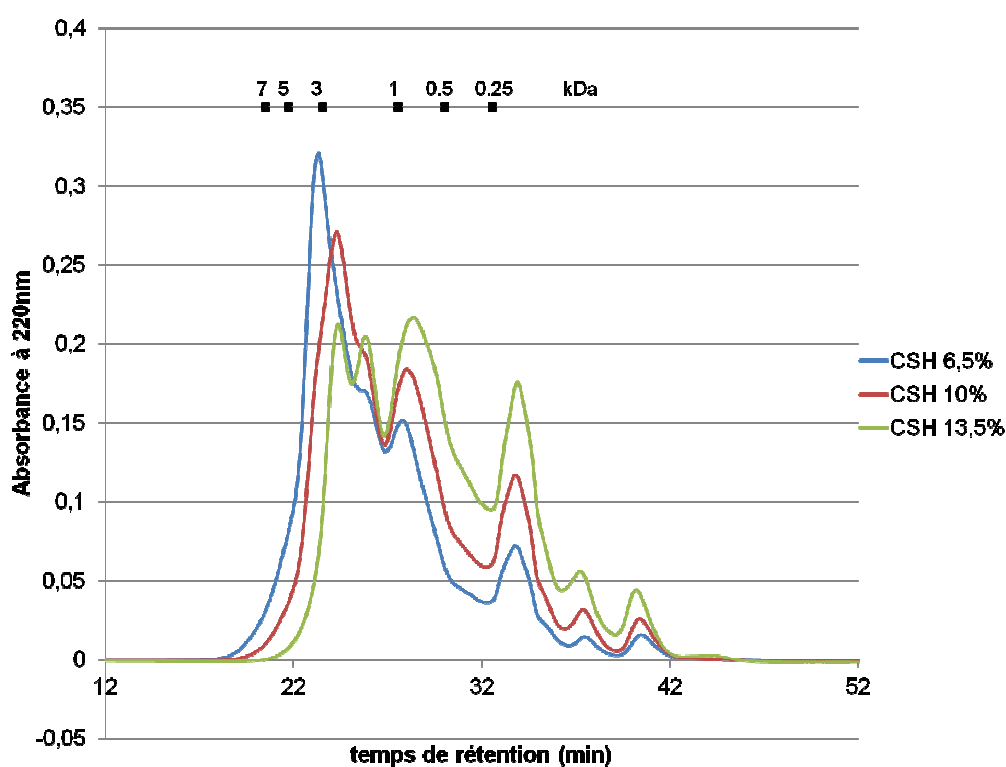


Figure 3.31 : Chromatogramme extrait à 220nm des caséinates hydrolysés natifs. Colonne Superdex peptide HR 10/300GL, élution par un mélange 30 :70 d'acétonitrile et d'eau + TFA (0,01%), débit de 0,5ml.min⁻¹

L'augmentation du degré d'hydrolyse se traduit par un glissement des chromatogrammes vers des poids moléculaires inférieurs à 5 kDa (figure 3.31).

Il semblerait que l'on ait un point de pivot à 1 kDa. En effet, lorsque l'on augmente le degré d'hydrolyse, on enrichit le milieu en peptides inférieurs à 1kDa et on appauvrit le milieu en peptide supérieur à 1kDa.

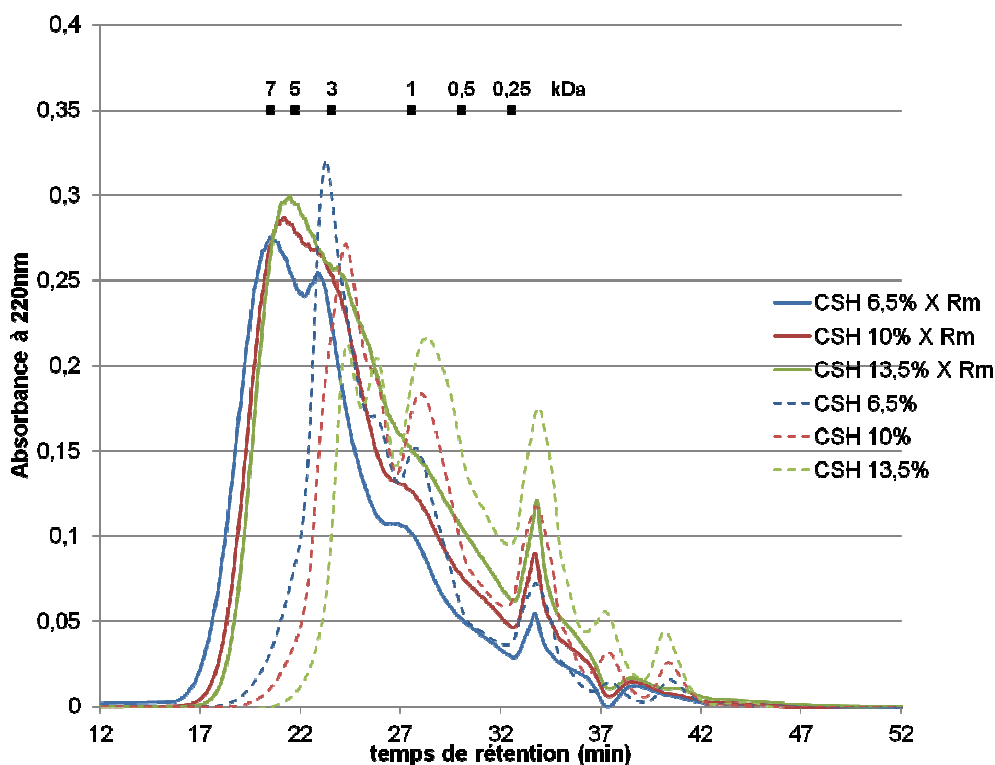


Figure 3.32 : Chromatogrammes extraits à 220nm des caséinates hydrolysés maillardisés avec du Xylose (trait plein), et des caséinates hydrolysés natifs (traits pointillés). Colonne Superdex peptide HR 10/300GL, élution par un mélange 30 :70 d'acétonitrile et d'eau + TFA (0,01%), débit de 0,5ml.min⁻¹

On remarque que : - (1) la réaction de Maillard semble avoir lissé les profils chromatographiques, gommant les différences visibles entre les échantillons natifs (traits pointillés). (2) Une augmentation du poids moléculaire des composés qui se traduit par un décalage vers la gauche des chromatogrammes par rapport aux caséinates hydrolysés natifs. Cette augmentation est due à la glycation avec les molécules de Xylose. Il semblerait que les peptides engagés dans la réaction de Maillard soit principalement les peptides inférieurs à 1kDa. La réaction de Maillard forme majoritairement des composés de masse moléculaire comprise entre 3 et 7 kDa.

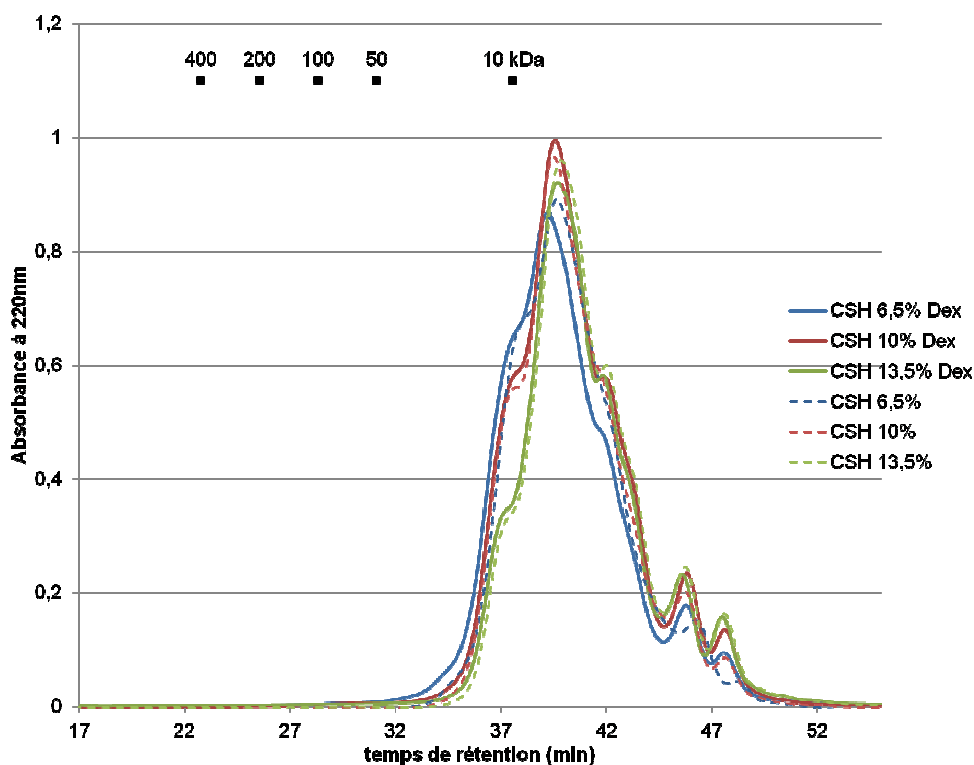


Figure 3.33 : Chromatogrammes extraits à 220nm des caséinates hydrolysés maillardisés avec du Dextran (trait plein), et des caséinates hydrolysés natifs (traits pointillés). Colonne Superdex peptide HR 10/300GL, élution par un mélange 30 :70 d'acétonitrile et d'eau + TFA (0,01%), débit de 0,5ml.min⁻¹.

Dans le cas de la glycation en présence de Dextran, les profils chromatographiques avant et après réaction de Maillard (traits pointillés/pleins) sont pratiquement superposables et ce quel que soit le degré d'hydrolyse utilisé. Ceci est en adéquation avec les résultats du dosage OPA qui montrent une glycation faible voir nulle en présence de Dextran.

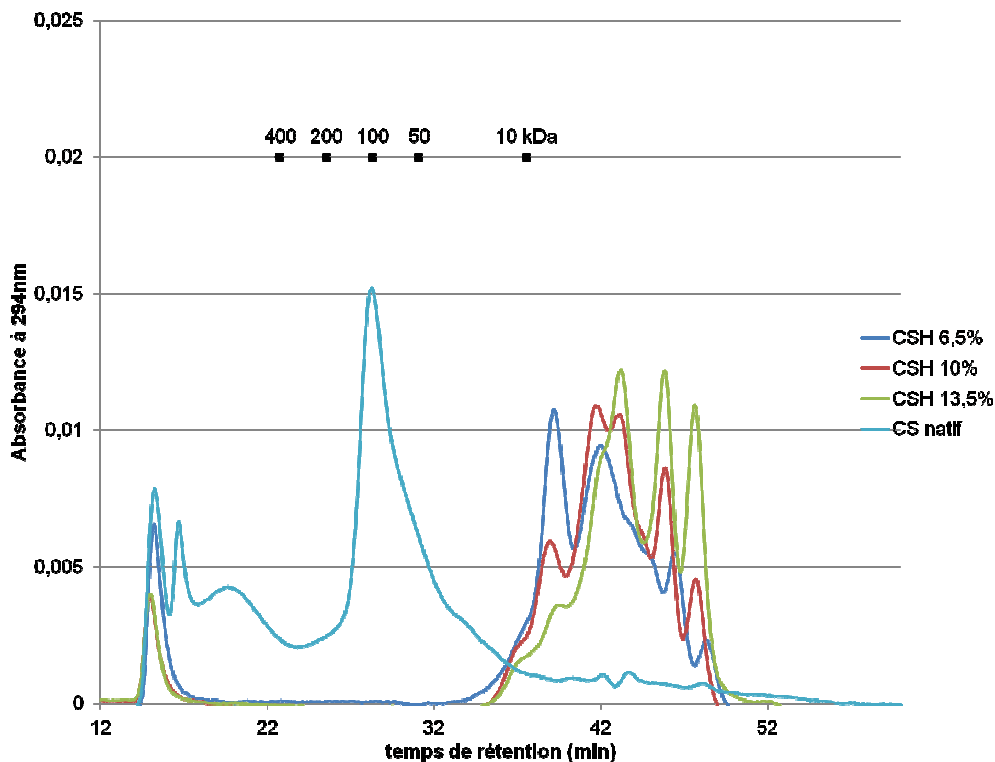


Figure 3.34 : Chromatogrammes extraits à 294nm du caséinate natif et des caséinates hydrolysés avec l'Alcalase® 2,4L. Colonne Superdex 200 10/300GL, élution au tampon phosphate 50mM (pH 7) + NaCl 0.15M, débit de 0,5ml.min⁻¹.

Pour le caséinate natif et les hydrolysats de caséinate, l'absorbance à 294 nm est faible (figure 3.34). Cette faible absorbance à 294 nm indique qu'il y a peu de composés aromatiques dans les échantillons natifs.

Synthèse :

On observe une augmentation linéaire du nombre de fonctions aminées libres avec le degré d'hydrolyse du caséinate de sodium.

L'hydrolyse enzymatique du caséinate de sodium enrichit le milieu principalement en peptides de poids moléculaire inférieur à 10 kDa.

La glycation des hydrolysats de caséinates de sodium avec le Xylose semble homogénéiser la répartition des poids moléculaires et ce quel que soit le degré d'hydrolyse utilisé.

3.2.3 Mise en évidence d'un facteur limitant

D'après les résultats obtenus avec l'hydrolysate de crevette glyqué avec le Xylose, soit une diminution de 50% respectivement des fonctions aminées libres, on peut se demander si le Xylose n'est pas le facteur limitant de la réaction. Pour explorer cette hypothèse, trois réactions de Maillard ont été réalisées avec l'hydrolysate de crevette, l'une avec le ratio protéines-glucide utilisé précédemment (SH X 1 : 1), une autre avec une concentration en Xylose doublée (SH X 1 : 2) et, enfin, la dernière avec une concentration en Xylose quadruplée (SH X 1 : 4).

3.2.3.1 Brunissement

L'augmentation de la teneur en Xylose n'entraîne pas de différence visuelle dans la couleur et l'aspect des produits (figure 3.35).

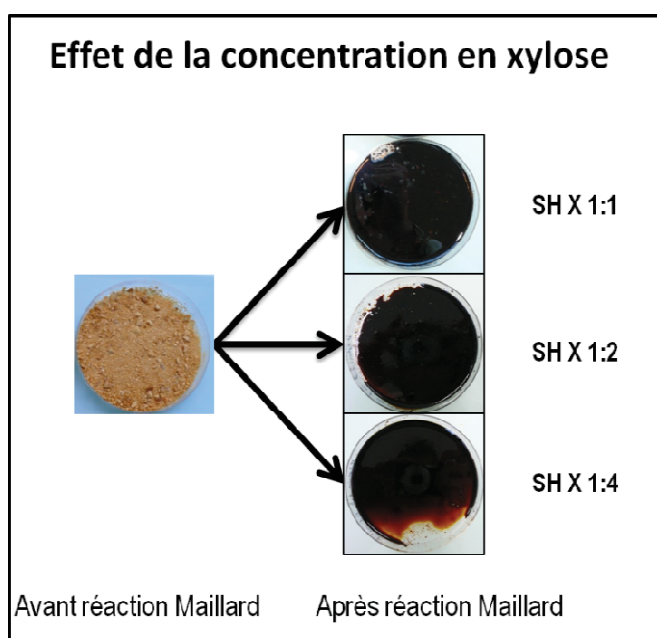


Figure 3.35 : Aspect des produits avant et après la réaction de Maillard avec différentes concentrations en Xylose.

La figure 3.36 présente le brunissement des différents produits avant et après la réaction de Maillard. On remarque qu'il y a une forte augmentation du brunissement après la réaction de Maillard pour les différents mélanges par rapport aux mélanges natifs. Toutefois quelle que soit la concentration en Xylose, et ce même en présence de phosphate, le brunissement des différents milieux après la réaction de Maillard est similaire. Le changement de la concentration en Xylose n'a, à priori, pas d'impact sur le brunissement.

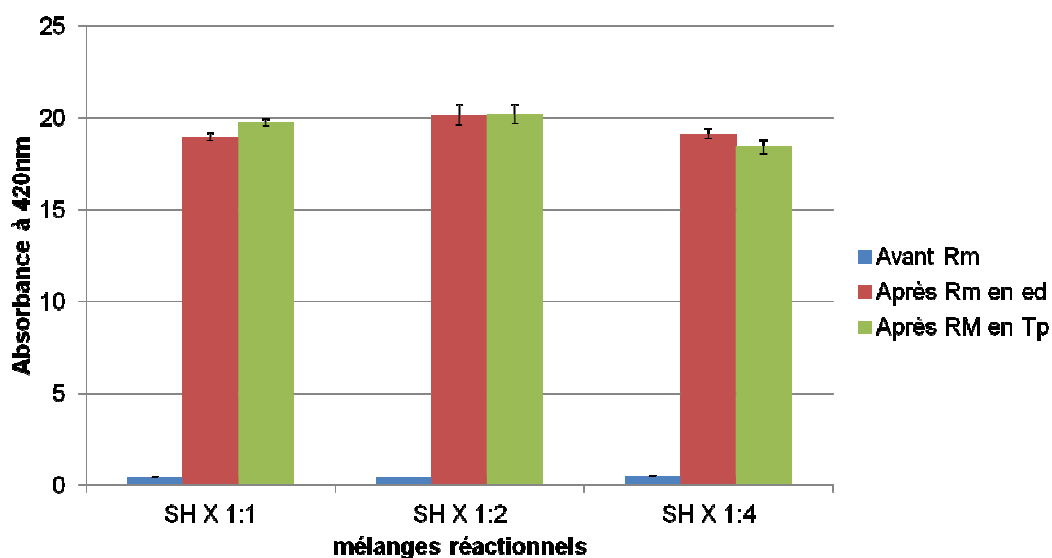


Figure 3.36 : Evolution du brunissement en fonction de la concentration en Xylose.

3.2.3.2. Dosage des fonctions aminées libres

Bien que l'on n'observe pas de différence significative de brunissement entre les différents mélanges, on peut se demander s'il y a eu un impact de la concentration en Xylose sur la mobilisation des fonctions aminées libres.

La figure 3.37 présente la quantification des fonctions aminées libres en fonction de la concentration en Xylose et de la présence de tampon phosphate.

Après la réaction de Maillard en présence de tampon phosphate, on remarque une diminution significative de la concentration en équivalent leucine par rapport aux mélanges sans tampon phosphate.

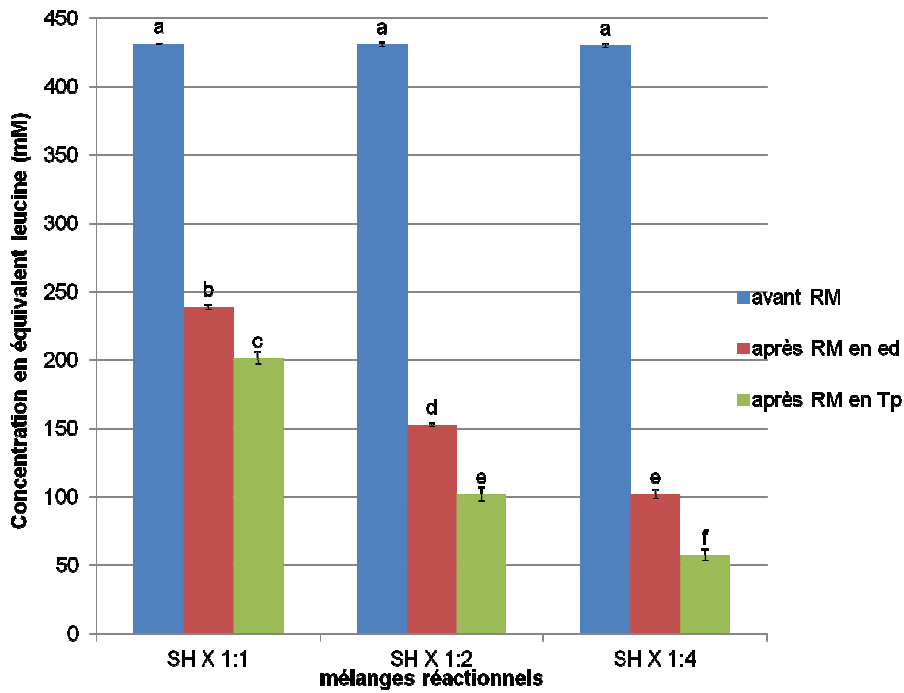


Figure 3.37 : Quantification des groupements aminés libres avant et après la réaction de Maillard entre l'hydrolysate de crevette et le Xylose à trois concentrations.

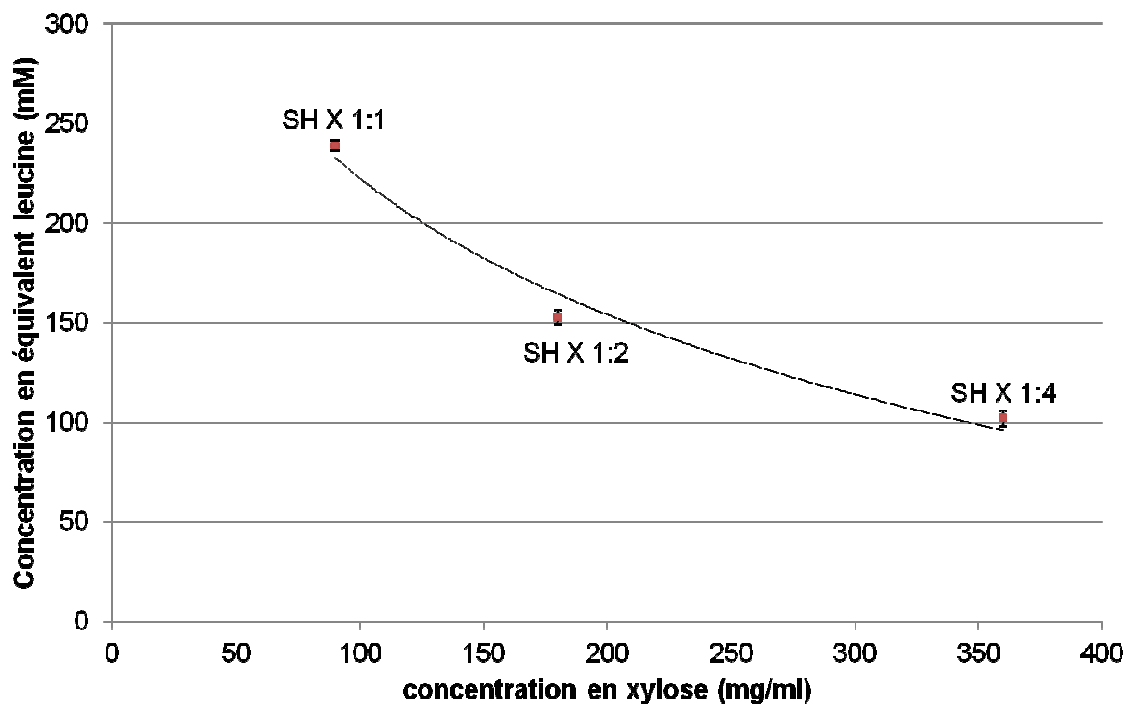


Figure 3.38 : Effet de la concentration en Xylose (mg/ml) sur la diminution des fonctions aminées libres exprimées en équivalent leucine (mM)

On observe une diminution de la concentration en groupements aminés libres avec l'augmentation de la concentration en Xylose dans le mélange. La concentration en Xylose est donc un facteur limitant de la réaction. Toutefois, dans la gamme de concentration choisie, une augmentation d'un facteur 2 n'entraîne pas une diminution par deux de la concentration en groupements aminés libres. On observe un ralentissement de la diminution de la concentration en groupements aminés libres entre 180 et 360 mg/ml de Xylose (figure 3.38).

Une relation logarithmique peut être établie entre la diminution de la concentration en équivalent leucine et la concentration en Xylose (mg/ml) introduite dans le mélange en conservant une concentration en hydrolysat de crevette de 150mg/ml.

$$[\text{équivalent leucine}] = -98,8 \ln([\text{Xylose}]) + 677,7$$
$$R^2 = 0,978$$

La concentration SHX 1 :4 soit 360mg.mL⁻¹ pour 90 mg.mL⁻¹ de source protéique est proche de la concentration limite. Dans les expériences précédentes avec l'hydrolysat de crevette, la concentration en Xylose était bien limitante pour la glycation.

3.2.3.3 Etude des profils chromatographiques

L'impact de la concentration en Xylose introduite dans le mélange sur les composés néoformés lors de la réaction de Maillard est mis en évidence aussi par les profils chromatographiques. Les chromatogrammes ont été extraits à 220nm (liaisons peptidiques) et 294nm (composés intermédiaires de la réaction de Maillard). Les chromatogrammes issus des RM en présence de tampon phosphate sont présentés en annexe 9 et 10.

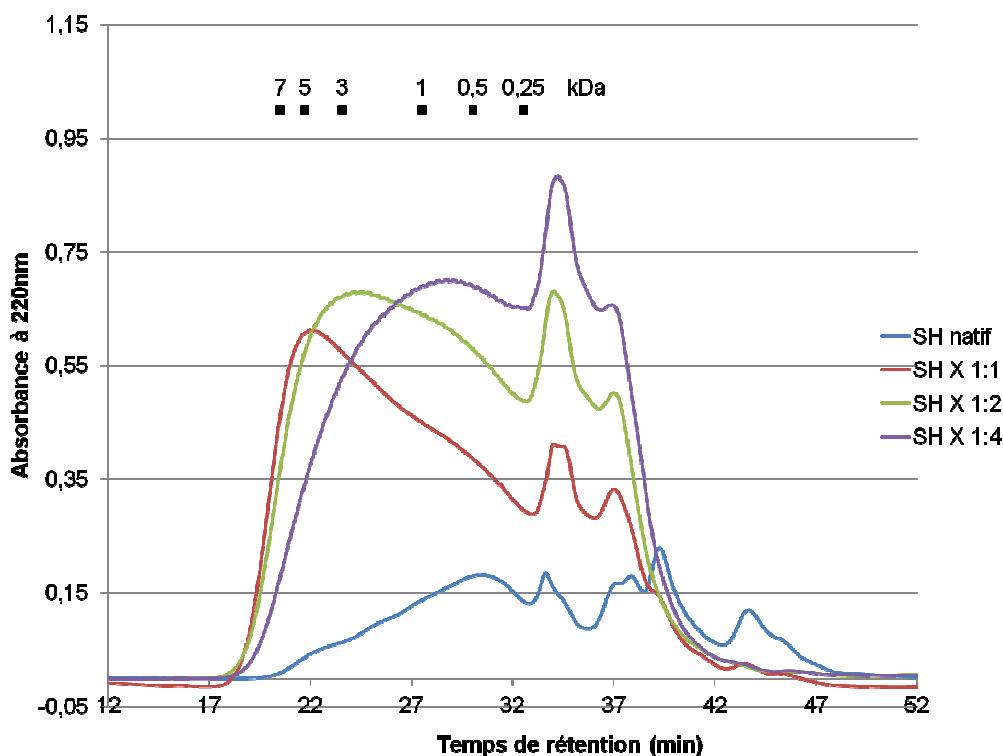


Figure 3.39 : Chromatogrammes extraits à 220nm des hydrolysats de crevette maillardisés en eau distillée avec différentes concentration en Xylose. Colonne Superdex peptide HR 10/300GL, élution par un mélange 30 :70 d'acétonitrile et d'eau + TFA (0,01%), débit de 0,5ml.min⁻¹.

Lorsque l'on compare d'hydrolysat natif et les trois mélanges hydrolysat/Xylose on remarque un changement dans les profils chromatographiques à 220nm (figure 3.39).

L'hydrolysat de crevette est de faible poids moléculaire, inférieur à 1kDa, il possède de nombreuses fonctions aminées libres qui le rendent très réactif vis-à-vis de la réaction de Maillard.

La répartition des poids moléculaire varie avec les différentes concentrations en Xylose. Dans le cas du mélange SH X 1 :1, on remarque que l'absorbance augmente par rapport à l'hydrolysat natif. Dans ce cas, la fraction la plus importante correspond à des poids moléculaires compris entre 3 et 7 kDa.

Si l'on regarde le profil chromatographique du mélange SH X 1 :2, on remarque qu'il est différent de celui du mélange SH X 1 :1. Bien qu'il y ait une augmentation des composés de poids moléculaire compris entre 1 et 7 kDa, les autres fractions de poids moléculaires inférieurs augmentent aussi. Néanmoins, il n'y a pas d'apparition de composés supérieurs à 7kDa.

Pour le mélange SHX 1 :4, le profil est aussi différent de ceux des mélanges SH X 1 :1 et SH X 1 :2. Par rapport aux deux autres cas, ce n'est pas la fraction de molécules de poids

moléculaires compris entre 3 et 7kDa mais la fraction inférieure à 250Da qui augmente. Dans ce cas aussi il n'y a pas d'apparitions de composés de poids moléculaires supérieur à 7kDa (tableau 3.7).

Tableau 3.7 : Répartition des poids moléculaires de l'hydrolysate de crevette natif et incubé respectivement en présence de Xylose à trois concentrations différents

Glycoconjugué	Répartition des peptides (%) en fonction de leur poids moléculaire (Da)				
	> 7000	7000-3000	3000-1000	1000-500	< 500
SH X natif	0,22	4,37	13,45	13,52	68,45
SH X 1:1 ed	6	20,99	23,53	12,33	37,15
SH X 1:1 tp	11,13	24,25	21,6	10,67	32,35
SH X 1:2 ed	3,6	16,44	23,88	13,85	42,23
SH X 1:2 tp	5,56	19,39	23,46	12,77	38,82
SH X 1:4 ed	1,52	10,09	21,57	14,91	51,91
SH X 1:4 tp	1,72	11,37	21,96	14,58	50,38

En présence de Xylose et d'hydrolysate de crevette, dans les conditions utilisées on ne produit pas de composés de très haut poids moléculaire.

On observe une augmentation de l'aire sous la courbe pour les trois mélanges SH Xylose. Plus la concentration en Xylose augmente plus l'aire sous la courbe augmente. Lorsque l'on trace la concentration en équivalent leucine en fonction du rapport des aires, on observe une relation linéaire ($R^2 = 0,99$).

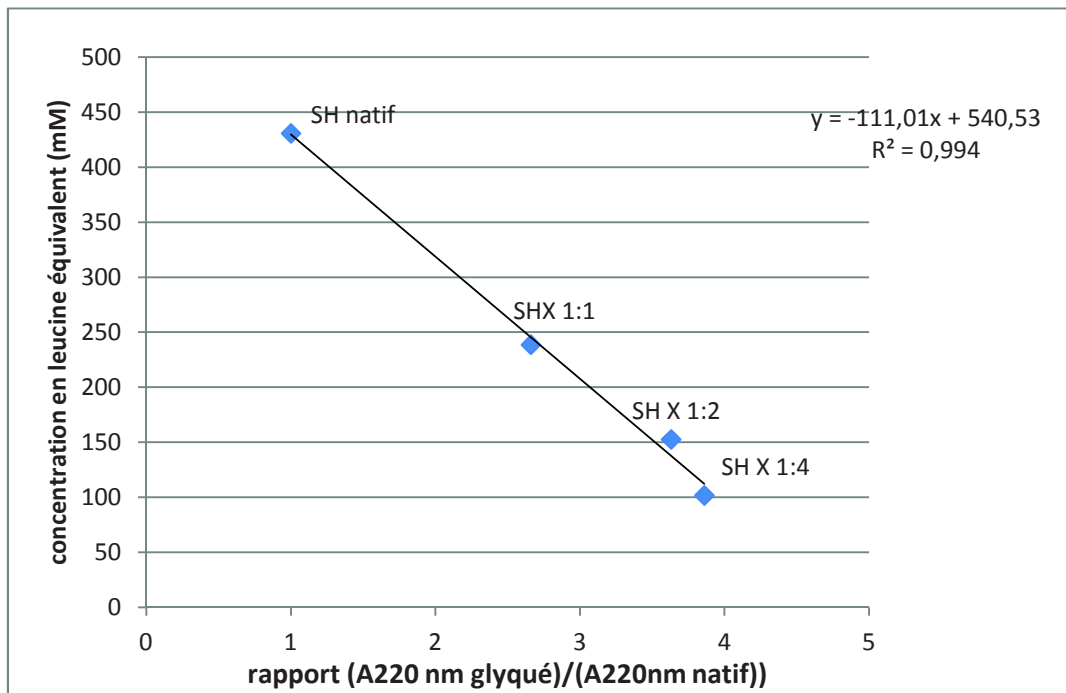


Figure 3.40 : Relation entre la concentration en fonctions aminées libres et la " "reactivité" du système.

Il semblerait qu'à partir de SHX 1 :2 il y ait un ralentissement que l'on remarquait déjà entre la concentration en Xylose dans le milieu et la mobilisation des fonctions aminées libres.

En utilisant des peptides de faibles poids moléculaires, on ne produit pas de macromolécules.

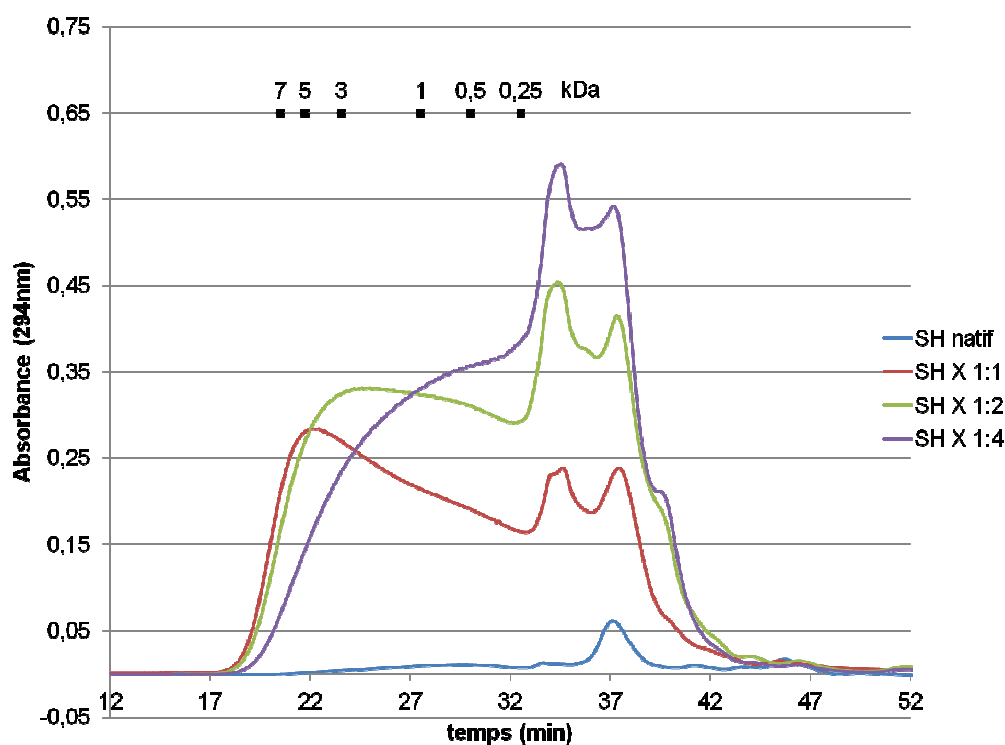


Figure 3.41 : Chromatogrammes extraits à 294 nm des hydrolysats de crevette maillardisés en eau distillée avec différentes concentration en Xylose. Colonne Superdex peptide HR 10/300GL, élution par un mélange 30 :70 d'acétonitrile et d'eau + TFA (0,01%), débit de 0,5ml.min⁻¹.

A 294nm, on voit l'apparition de composés aromatiques de petits poids moléculaires (inférieur à 250Da). L'augmentation de la concentration en Xylose augmente la proportion de composés aromatiques de petit poids moléculaires et non celle de composés de plus haut poids moléculaire. Ces résultats confirment les observations à 220nm.

Synthèse :

Dans les expériences précédentes avec l'hydrolysats de crevette, le Xylose a été introduit en concentration limitante dans la réaction de Maillard. Il semble y avoir une relation logarithmique entre le nombre de fonctions aminées libres présentes après RM et la concentration en Xylose introduite.

De plus, de fortes concentrations en Xylose, lors de la RM avec l'hydrolysats de crevette, semblent privilégier l'apparition de composés aromatiques de faibles poids moléculaires (inférieurs à 250Da).

3.2.4 Conclusion

La réaction de Maillard en milieu sec a permis de glyquer les diverses sources protéiques avec tous les glucides utilisés. L'ordre de réactivité des glucides est le même pour toutes les sources protéiques à savoir : Xylose > Glucose > FOS > Dextran.

Toutefois en fonction du glucide et de la source protéique, les conséquences de la réaction de Maillard ne sont pas les mêmes.

En présence des deux monosaccharides (Xylose et Glucose) on observe le développement de composés bruns qui sont peu ou pas détectés dans le cas des FOS ou du Dextran. De plus, avec l'hydrolysate de crevette, des composés de plus haut poids moléculaire (> 3kDa) sont formés et des composés aromatiques intermédiaires de la réaction sont détectés à 294nm.

L'hydrolyse du caséinate augmente la concentration en fonction aminées libres du milieu et l'enrichissement en peptides inférieurs à 1kDa alors que la concentration en peptides de poids supérieur diminue. Après réaction de Maillard avec le Xylose, les chromatogrammes se ressemblent plus et l'influence du degré d'hydrolyse est beaucoup moins marquée. On remarque tout de même la production de composés de poids moléculaire plus important.

Enfin l'augmentation de la concentration en Xylose augmente certes la consommation de fonctions aminées libres de l'hydrolysate de crevette lors de la réaction mais cela ne se traduit pas uniquement par l'apparition de composés de plus haut poids moléculaire. Ceux sont les fractions de faible poids moléculaire qui deviennent prédominantes dans le mélange final.

Ainsi nous avons montré par différentes méthodes que la réaction de Maillard avait lieu dans tous les mélanges réactionnels et entraînait une modification des sources protéiques. Il est donc intéressant d'évaluer les conséquences de ces modifications sur les propriétés technofonctionnelles et sur les propriétés biologiques.

3.3 Solubilités, tensions de surface et propriétés émulsifiantes des produits de la réaction de Maillard

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique (1.3.3), des sources protéiques glyquées par réaction de Maillard peuvent présenter des propriétés émulsifiantes modifiées. Ces propriétés émulsifiantes sont liées d'une part au degré d'affinité des composés formés pour l'eau, et d'autre part, à leurs propriétés tensioactives. Cette partie a ainsi pour objet dans un premier temps, de décrire le comportement en solution aqueuse des composés natifs et issus de la réaction de Maillard (solubilité, tension de surface, et taille). Ces caractérisations, réalisées en amont, permettront de mieux établir des liens entre propriétés en solution des composés obtenus et les propriétés émulsifiantes. Dans une deuxième partie, nous explorerons les propriétés émulsifiantes pour les composés natifs et les PRM obtenus avec le glucide le plus réactif et le moins réactif. Enfin, la dernière partie établira une synthèse.

3.3.1 Solubilité

La figure 3.42 présente la solubilité, sur une gamme de pH 3 à 9 du caséinate de sodium natif (CS) et du caséinate de sodium glyqué en eau distillée ou en tampon phosphate avec le Glucose (Glc), les FOS et le Dextran (Dex). Il faut noter que le caséinate glyqué avec le Xylose s'est révélé insoluble, il n'est donc pas représenté.

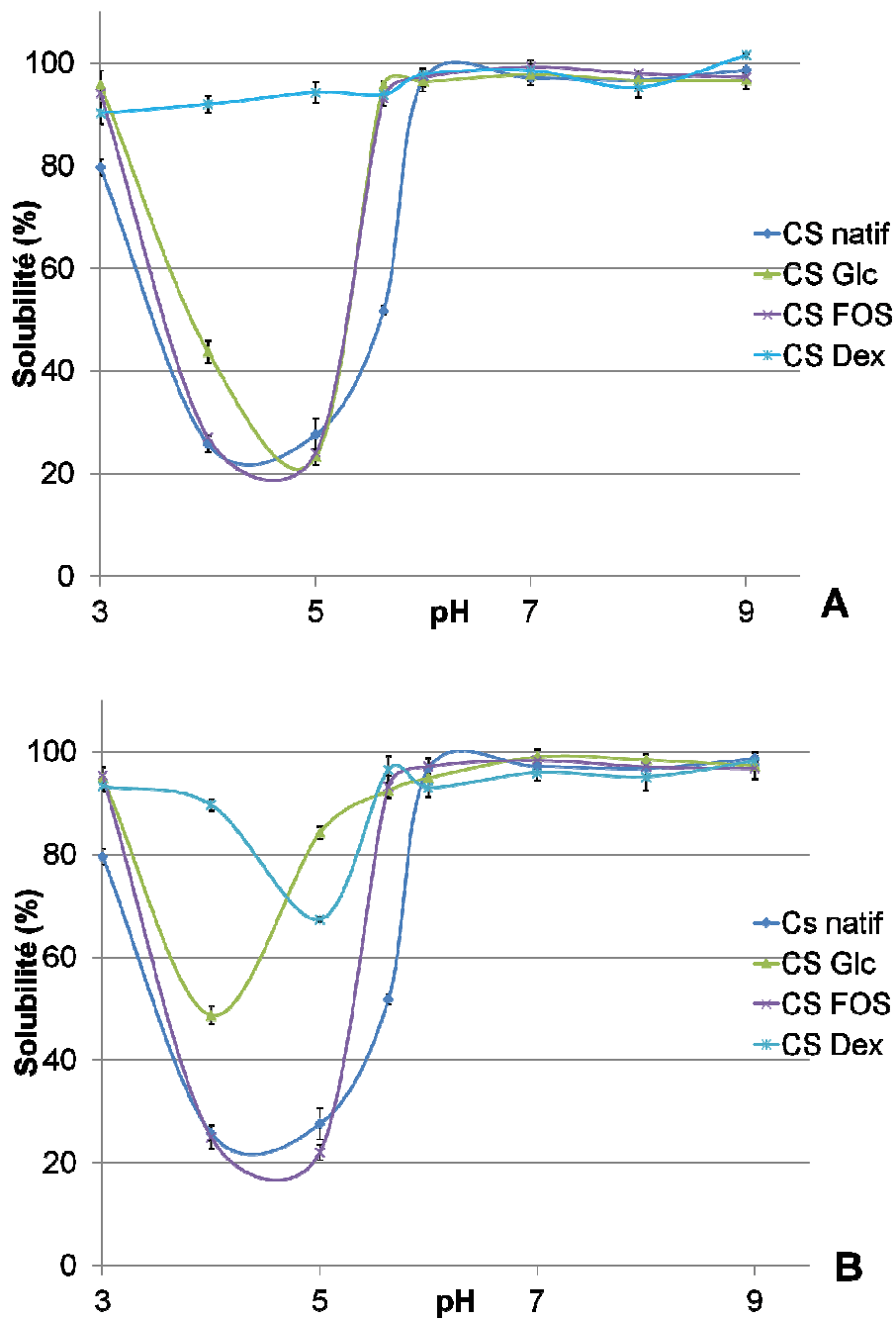


Figure 3.42 : Solubilité du caséinate de sodium natif et après réaction de Maillard en présence de Glucose, FOS et Dextran. La réaction de Maillard a été réalisée soit avec de l'eau distillée (A) ou soit avec du tampon phosphate (B).

On remarque sur la Fig. 3.42 une baisse importante de la solubilité du caséinate de sodium entre pH 4 et pH 5. Cette zone de pH correspond à son pH isoélectrique (pHi). Ceci est connue et conforme à la littérature (Cheftel *et al.*, 1985 ; Guo *et al.*, 1996).

Les produits de la réaction de Maillard en eau distillée (figure 3.42 A) issus du Glucose et des FOS montrent une diminution de la solubilité similaire à celle du caséinate natif. En effet la solubilité passe de 90% à 20% entre pH 4 et 5. Par contre dans le cas de la glycation avec le Dextran on observe une augmentation de la solubilité entre pH 4 et pH 5 par rapport au caséinate de sodium natif. Pour ce PRM la solubilité est comprise entre 90% et 95% sur la gamme de pH testée.

Les produits de la réaction de Maillard en tampon phosphate (figure 3.42 B), issus de CS-FOS présentent la même solubilité que le CS natif alors que les PRM issus de CS Glc et CS -Dex ont une solubilité différente, pour ces deux mélanges, une augmentation de la solubilité par rapport au CS natif est observée. Ainsi, le minimum de solubilité est observé à pH 4 pour CS Glc avec une solubilité de 50% et celui de CS-Dex correspond à une solubilité de 70% à pH 5.

Chevalier *et al.* (2001b) ont montré qu'après glycation avec l'arabinose ou le ribose la β -lactoglobuline (Blg) perd sa solubilité entre pH 3 et pH 5. Cette perte de solubilité est moindre en présence de glucide moins réactif lors de la réaction de Maillard. Les auteurs expliquent cette perte de solubilité par une modification importante de la conformation de la protéine. D'une manière générale, les auteurs supposent que plus la réaction de Maillard est poussée plus le pHi est déplacé vers des pH acides. Jiménez -Castaño *et al.* (2007) ont montré quant à eux que l'impact de la glycation sur la solubilité dépend de la protéine utilisée. Ils ont réalisé la réaction de Maillard entre le Dextran et trois protéines : la β -lactoglobuline, l' α -lactalbumine et la sérum albumine bovine (BSA). Ils montrent ainsi que la glycation du Dextran avec la Blg déplace le minimum de solubilité de la protéine vers le pH bas, celui-ci passant de 5 pour la protéine chauffée en absence de glucide à 4 pour la protéine glyquée. Tandis que dans le cas de l' α -lactalbumine et la BSA la glycation améliore la solubilité sur toute la gamme de pH par rapport à la protéine native chauffée. Dans le cas de l' α -lactalbumine la solubilité de la protéine glyquée avec le Dextran est supérieure à celle de la protéine native. Nos résultats sont en accord avec ces derniers, comparativement à ceux obtenus par Chevalier *et al.* (2001b)..

La figure 3.43 présente la solubilité de l'hydrolysate de crevette natif et de l'hydrolysate de crevette glyquée en eau distillée ou en tampon phosphate avec le Xylose, le Glucose, les FOS ou le Dextran.

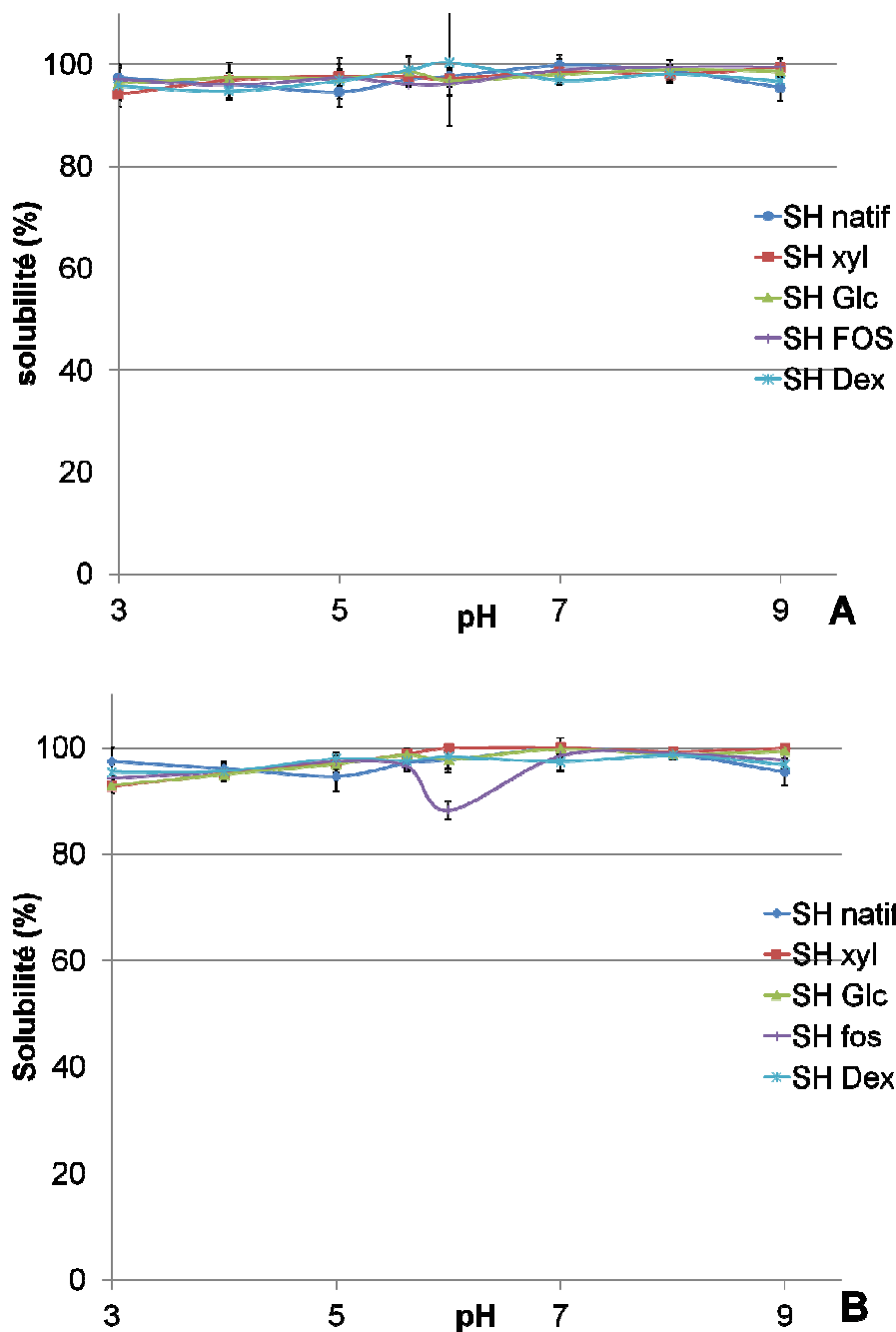


Figure 3.43 : Solubilité de l'hydrolysate de crevette natif et après réaction de Maillard en présence de Xylose, Glucose, FOS et Dextran. La réaction de Maillard est réalisée en eau distillée (A) ou en tampon phosphate (B).

On remarque sur la figure 3.43 que pour l'hydrolysate de crevette avant ou après glycation et avec ou sans phosphate, tous les composés montrent une solubilité comprise entre 90 et 100% sur toute la gamme de pH. Les différents glucides utilisés lors de la réaction de Maillard ne semblent pas avoir une influence sur la solubilité des hydrolysats de crevette.

Ces résultats pouvaient être attendus. En effet, les hydrolysats de poissons sont plus solubles que les protéines natives dont ils sont issus car l'hydrolyse enzymatique affecte la taille moléculaire ainsi que les groupements polaires et ionisables.

Gbogouri *et al.* (2004) ont montré que les hydrolysats de tête de saumon ont une solubilité plus importante que les protéines natives sur une gamme de pH allant de 3 à 11. Ainsi la solubilité de la protéine native est comprise entre 20 et 30% et elle est supérieure à 75% pour tous les hydrolysats. Chalamaiah *et al.* (2010) ont montré des résultats similaires avec des hydrolysats d'œufs de Mrigal. La protéine d'œuf native présente une diminution de la solubilité (inférieure à 40%) entre pH 4 et pH 8 ; dans le reste de la gamme la solubilité est comprise entre 50 et 60%. Après hydrolyse par la papaine ou l'Alcalase 2,4L, la solubilité de la protéine d'œuf est supérieure à 70% sur toute la gamme de pH ; de plus la diminution de la solubilité observée pour la protéine native ne se retrouve pas dans les hydrolysats. Les auteurs supposent que l'hydrolyse a libéré des groupements polaires augmentant l'affinité avec le solvant sur une plus large gamme de pH.

Klompong *et al.* (2007) ont montré que pour des protéines de Sélar à bandes dorées, une augmentation de degré d'hydrolyse (DH) entraîne une augmentation de la solubilité. Ainsi les hydrolysats de DH 5% obtenus avec l'Alcalase ont une solubilité entre 90 et 95% alors que ceux ayant un DH de 25% ont une solubilité entre 95 et 100%. Sinha *et al.* (2007) ont montré le même phénomène avec des protéines de lactosérum hydrolysées. Ils supposent que cette amélioration de la solubilité est attribuable à la dissociation en petites sous-unités qui possèdent plus d'affinité avec le solvant.

La figure 3.44 présente la solubilité des caséinates hydrolysés natifs et après glycation avec le Xylose et du Dextran en présence ou non de tampon phosphate.

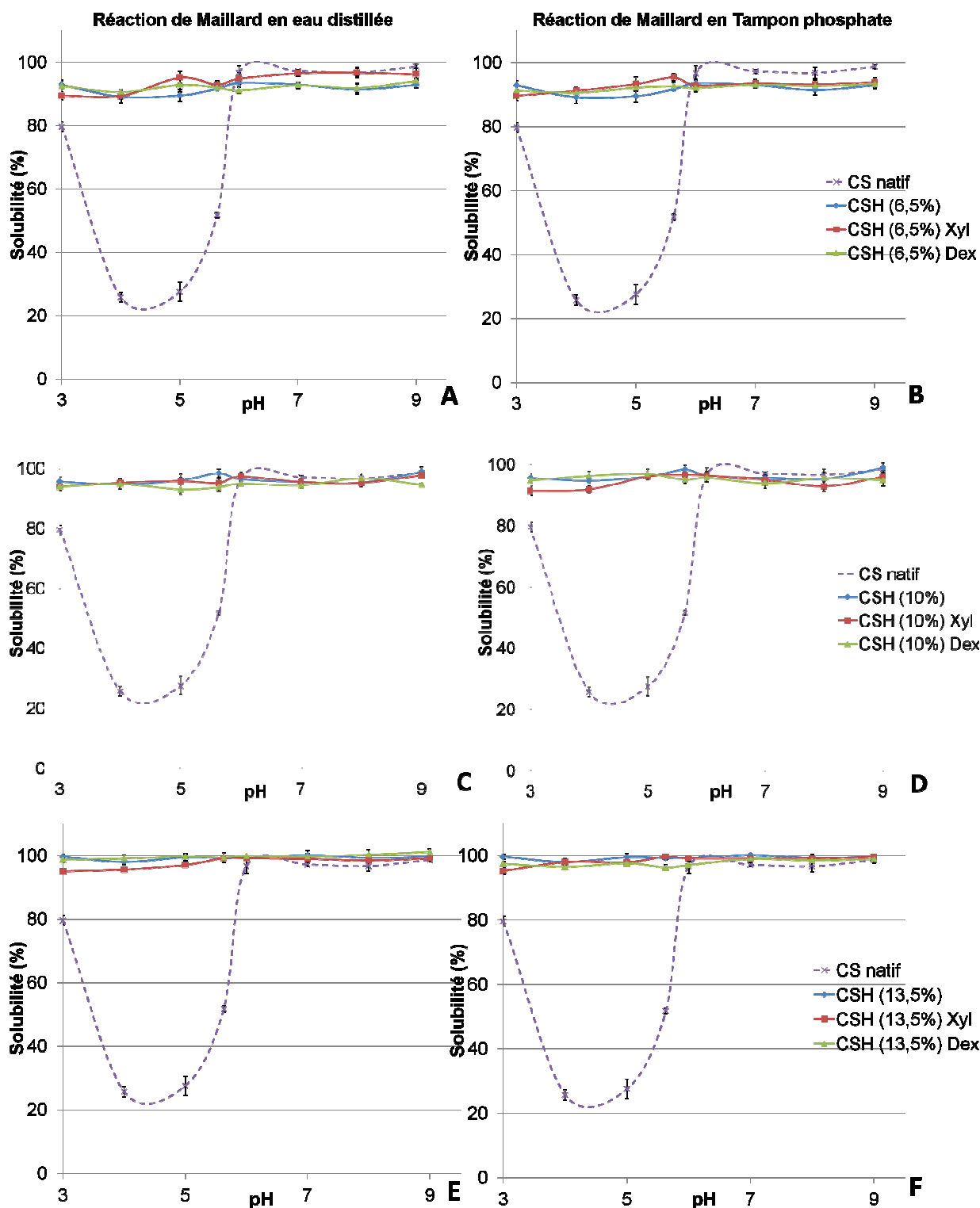


Figure 3.44 : Solubilité des glycoconjugués issus de la réaction de Maillard, en présence ou non de tampon phosphate, entre le caséinate de sodium hydrolysé DH 6.5% (A et B), DH 10% (C et D) ou DH 13.5% (E et F) et le Xylose ou le Dextran.

On observe sur la figure 3.44 que contrairement au caséinate natif qui présente une diminution de la solubilité entre pH 4 et pH 5, les hydrolysats de caséinate présentent une

solubilité supérieure à 90% sur toute la gamme de pH, quel que soit le degré d'hydrolyse, le glucide utilisé, et l'absence ou la présence de phosphate.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hydrolyse enzymatique augmente la solubilité même pour des pH proches du pHi. En effet, du fait de leur plus petite taille moléculaire et de la libération de certaines fonctions, les hydrolysats présentent plus de groupements polaires et ionisables leur assurant une meilleure solubilité (Thiansilakul *et al.*, 2007).

La figure 3.45 présente la solubilité de l'hydrolysate de crevette glyqué en eau distillée ou en tampon phosphate avec trois concentrations différentes en Xylose.

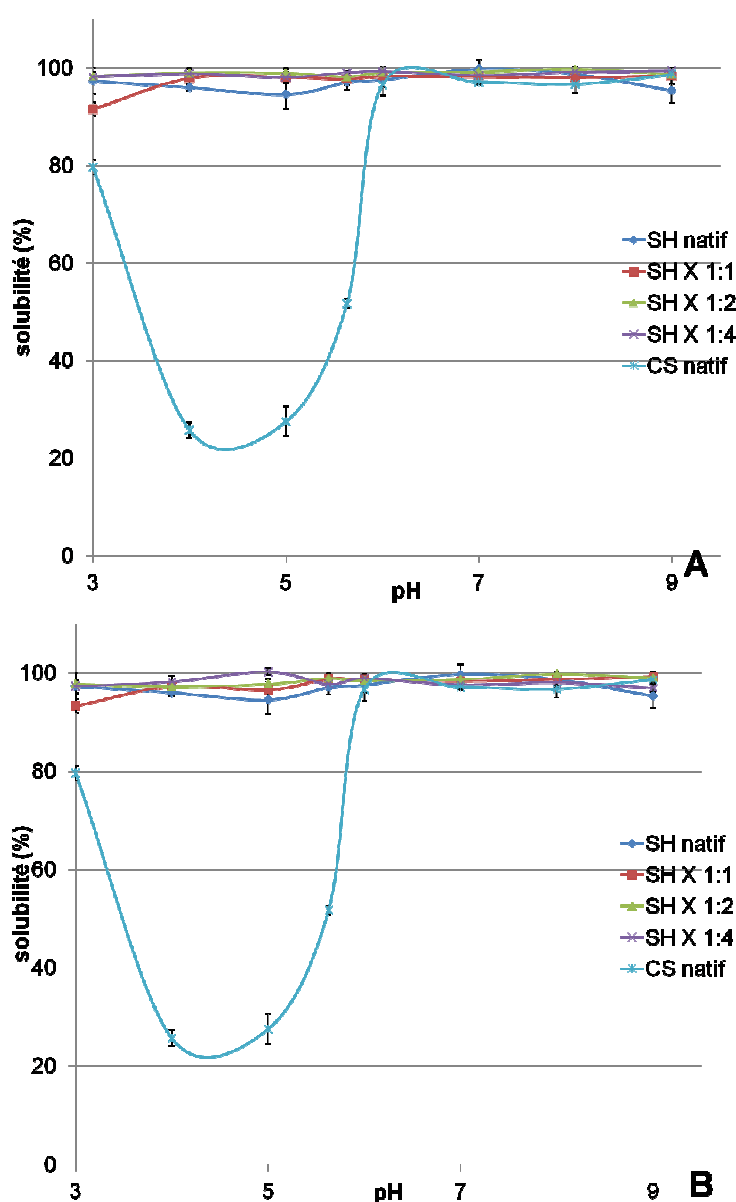


Figure 3.45 : Solubilité des glycoconjugués issus de la réaction de Maillard, en présence ou non de tampon phosphate, entre l'hydrolysate de crevette et le Xylose à trois concentrations différentes.

On observe sur la figure 3.48 qu'il n'y a pas de différence entre la solubilité de l'hydrolysate natif et de l'hydrolysate glyqué avec le Xylose et ceci, quel que soit la concentration en Xylose utilisée lors de la RM. La concentration en glucide lors de la RM n'a aucune influence sur la solubilité de l'hydrolysate de crevette. Celui-ci garde une solubilité importante (supérieure à > 90%) sur toute la gamme de pH

Synthèse :

Tout d'abord, le glycoconjugué caséinate/Xylose s'est révélé insoluble. Par ailleurs, la présence de phosphate au cours de la RM augmente la solubilité du glycoconjugué caséinate/Glucose (de 70%), et diminue celle obtenue du glycoconjugué caséinate/Dextran (de 28,5%). Par ailleurs, l'hydrolysate de crevette et ceux du caséinate ont montré de très hautes solubilités. Leurs solubilités n'ont de plus pas été modifiées par la RM, quel que soit le glucide utilisé et l'absence ou la présence de phosphate. Enfin, des concentrations de Xylose différentes utilisées pour la réaction de Maillard, avec ou sans phosphate, n'ont pas d'effet sur la solubilité de l'hydrolysate natif de crevette.

3.3.2 Tension de surface

Les tensioactifs sont des molécules dont les propriétés leur permettent de diminuer la tension superficielle de l'eau et la tension interfaciale entre deux liquides non miscibles. Ces tensioactifs, peuvent être amphiphiles et ont la capacité de se localiser aux interfaces. Pour des applications alimentaires, l'habilité d'une molécule à baisser la tension interfaciale, est une propriété recherchée pour l'obtention d'émulsions stables à l'échelle du consommateur (Le Neindre, 1993). Ce sont ces valeurs de tensions de surface des PRM que nous étudierons dans cette partie. Elles ont été étudiées d'une part avec des mélanges protéines/glucides sans réaction de Maillard, puis après réaction de Maillard.

Enfin, de nouveau dans cette étude, le glycoconjugué caséinate/Xylose étant insoluble, ces tensions de surfaces n'ont pu être étudiées.

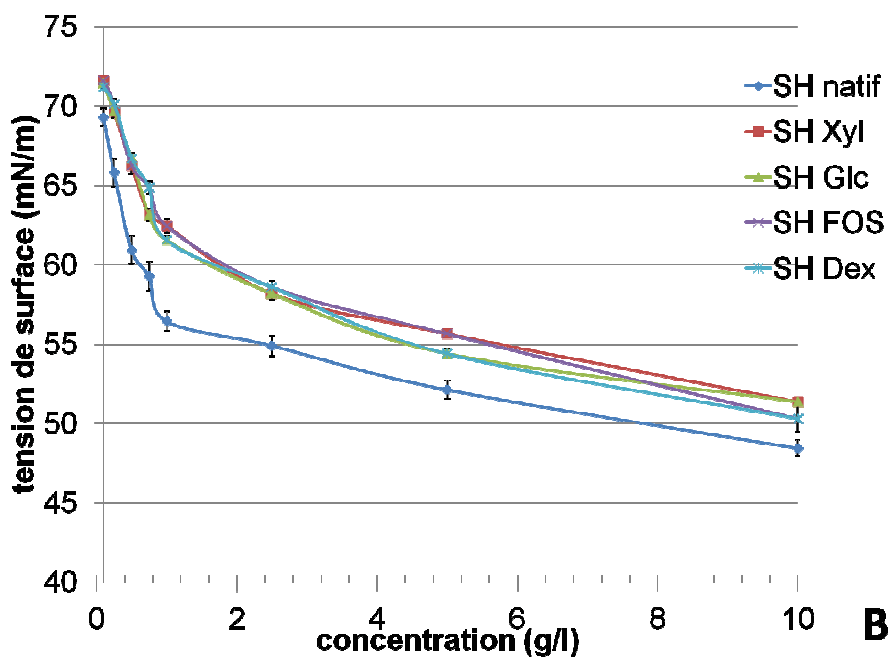
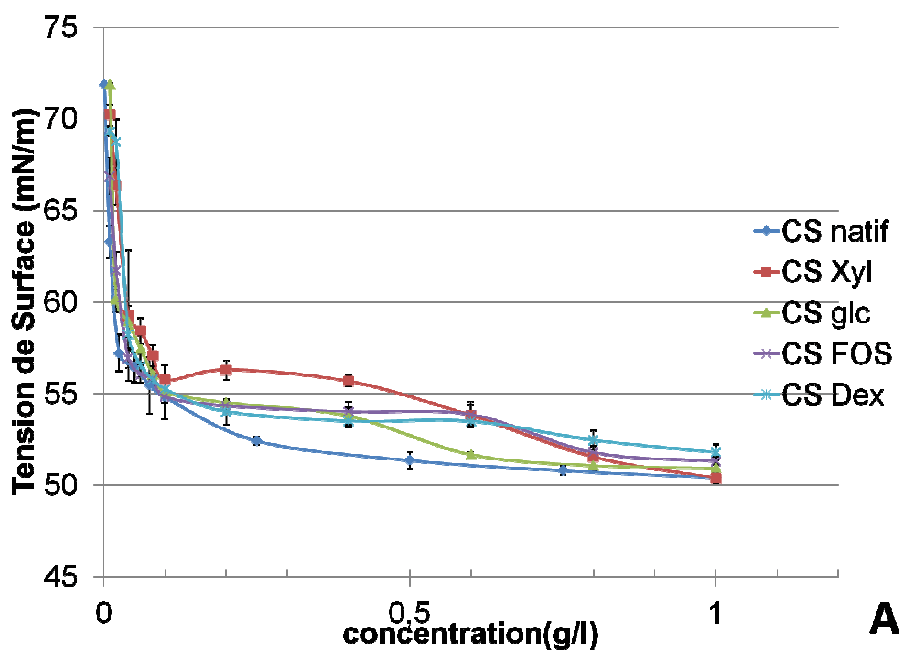


Figure 3.46 : Evolution de la tension de surface en fonction de la concentration en caséinate de sodium (A) ou en hydrolysats de crevette (B) natif ou en présence de Xylose, Glucose, FOS ou Dextran sans réaction de Maillard.

La figure 3.46 présente l'évolution de la tension de surface pour le caséinate de sodium ou l'hydrolysats en mélange avec les glucides étudiés et sans réaction de Maillard. Pour le témoin, le caséinate de sodium (figure 3.46A), pour des concentrations comprises entre 0 et 0,25g/l, on observe une diminution importante de la tension de surface suivie d'un plateau. Ce dernier pourrait s'expliquer par l'apparition de la concentration micellaire critique (CMC) du caséinate de sodium qui se situe entre 0,5 et 0,74g/L. Un comportement similaire est observé pour l'hydrolysats

natif. La présence des glucides et des sources protéiques en mélange (sans RM) sur la tension de surface (TS) donne une même allure de courbe que les sources protéiques natives mais des valeurs de tension de surface supérieures.

Les figures 3.47 A et B présentent l'évolution de la tension de surface des mélanges issus du caséinate de sodium après glycation avec le Xylose, le Glucose, les FOS et le Dextran respectivement en présence d'eau distillée ou de tampon phosphate

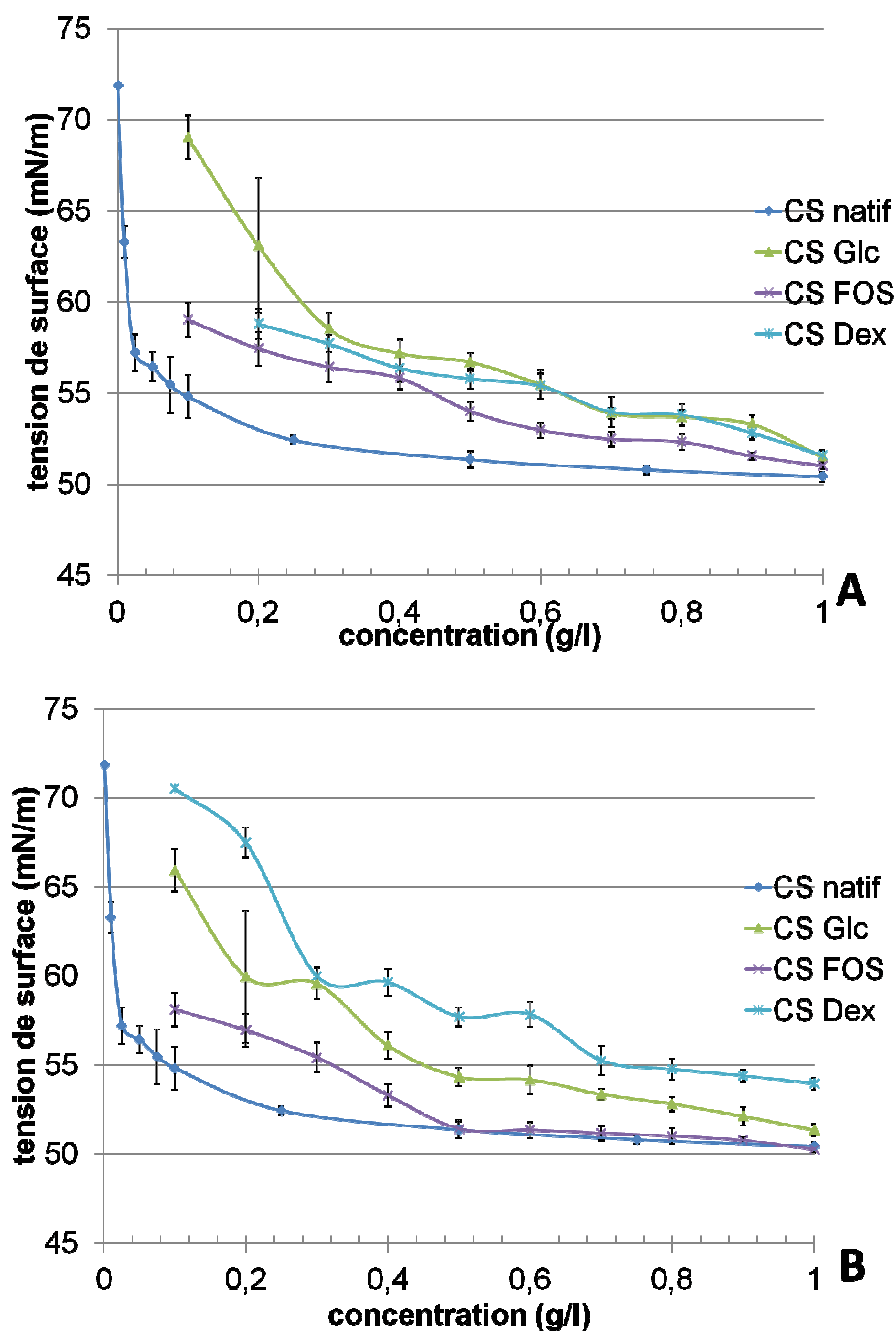


Figure 3.47 : Evolution de la tension de surface en fonction de la concentration en caséinate de sodium en présence ou non de Glucose, FOS ou Dextran après réaction de Maillard en eau distillée (A) ou en tampon phosphate (B)

Après réaction de Maillard entre le caséinate de sodium et les FOS ou le Dextran (figure 3.47A), les courbes montrent l'apparition moins nette d'un plateau, avec l'augmentation de la concentration.

Dans le cas de CS-Glc, on observe une diminution de la tension de surface d'abord importante pour des concentrations comprises entre 0,1 et 0,3g/l puis l'impact de la concentration sur la tension de surface diminue pour des concentrations supérieures. Les valeurs de tension de surface obtenues après 0,3g/l sont similaires à celles obtenues pour le mélange glyqué CS-Dex.

La glycation du caséinate de sodium avec le Glucose, les FOS ou le Dextran en présence de tampon phosphate entraîne donc une modification de l'évolution de la tension de surface par rapport au caséinate natif (figure 3.47B).

Ainsi la glycation avec le Glucose et le Dextran entraîne une diminution importante de la tension de surface pour des concentrations comprises entre 0,1 et 0,3g/l suivi d'une diminution moins marquée qui tend vers un plateau. Dans ces deux cas les valeurs de tension de surface sont supérieures à celles du caséinate de sodium natif.

Pour le mélange CS-FOS, on observe une diminution importante de la tension de surface pour des concentrations comprises entre 0,1 et 0,5g/l. Au-delà de cette concentration la tension de surface reste quasiment stable avec l'augmentation de la concentration. De plus dans ce cas, les valeurs de tension de surface obtenues pendant la phase de plateau sont similaires à celles du caséinate de sodium natif.

Quel que soit les PRM observés, la tension de surface obtenue est supérieure à celle du caséinate de sodium. La RM en eau distillée n'améliorerait donc pas la tension de surface par rapport au caséinate de sodium natif.

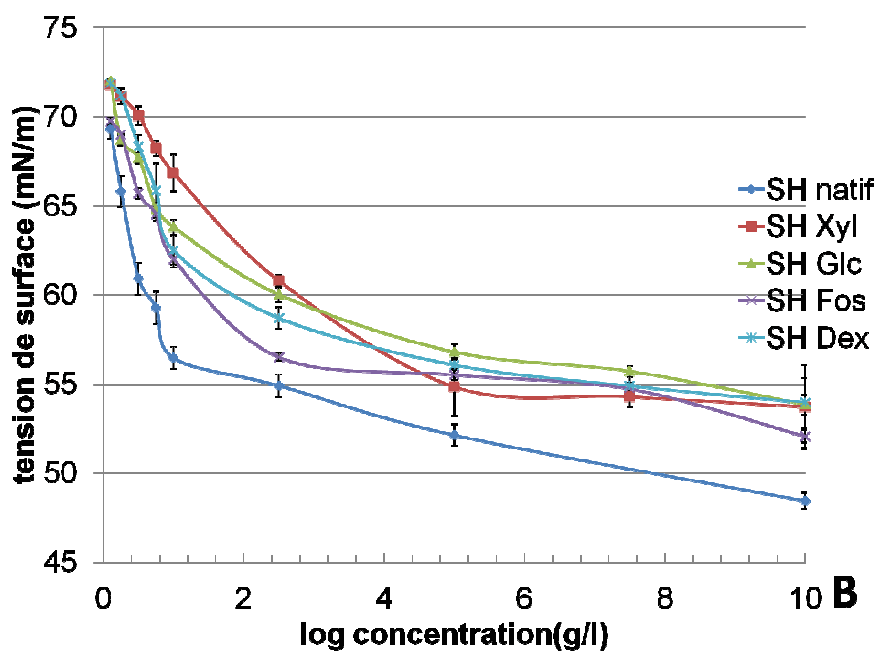
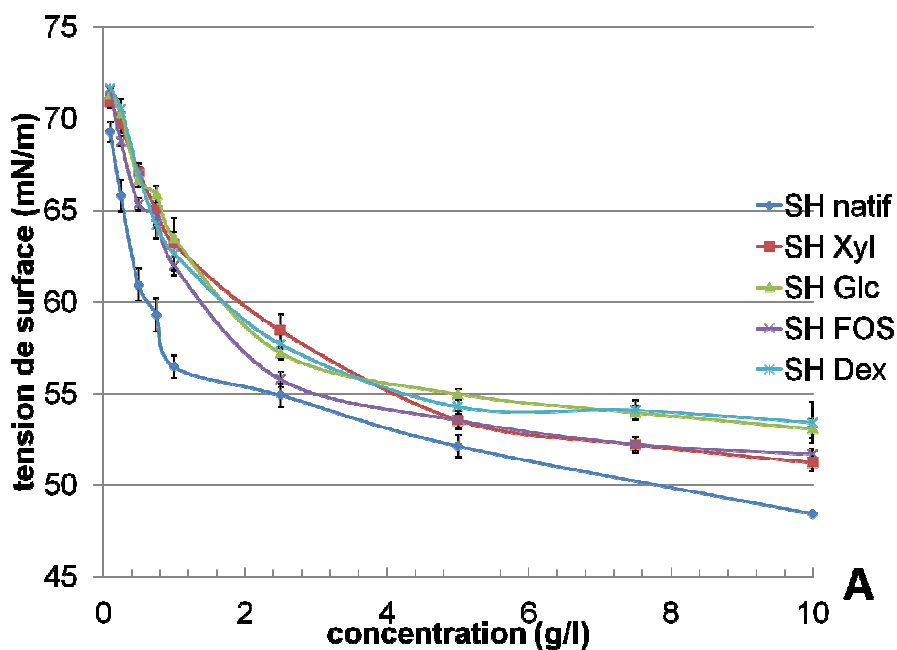


Figure 3.48 : Evolution de la tension de surface en fonction de la concentration en hydrolysate de crevette en présence de Xylose, Glucose, FOS ou Dextran après réaction de Maillard en eau distillée (A) ou en en tampon phosphate (B).

Pour l'hydrolysate de crevette (figure 3.48A), les composés glyqués en eau distillée avec un des quatre glucides étudiés présente la même évolution de la tension de surface que l'hydrolysate de crevette natif. Comme pour l'hydrolysate de crevette, on observe d'abord pour des concentrations comprises entre 0,1 et 2g/l une diminution rapide de la tension de surface puis un

ralentissement. De plus, les tensions de surfaces sont du même ordre de grandeurs pour l'hydrolysate de crevette natif et pour les différents mélanges issus de la glycation.

Dans le cas de l'hydrolysate de crevette (figure 3.48 B), pour des concentrations en produits de la réaction de Maillard comprises entre 0,1 et 2g/l on observe une baisse importante de la tension de surface et ce pour les quatre mélanges étudiés. A partir de 2g/l la tension de surface se stabilise et tend vers un plateau. Ce comportement est similaire à celui de l'hydrolysate de crevette natif, toutefois, les valeurs de tension de surface des mélanges glyqués sont supérieures à celles de l'hydrolysate de crevette natif.

Ainsi la glycation en eau distillée ou en tampon phosphate ne semble modifier la baisse de la tension de surface du caséinate de sodium ou de l'hydrolysate de crevette avec l'augmentation de la concentration.

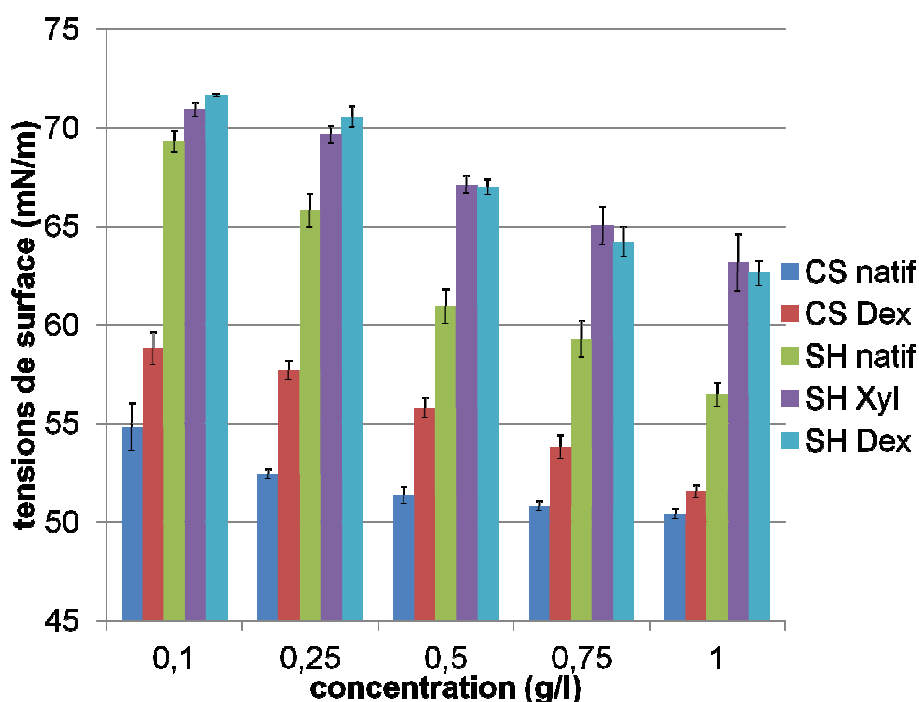


Figure 3.49 : comparaison des tension de surfaces entre le caséinate de sodium et l'hydrolysate de crevette avant et après réaction de Maillard avec le Xylose et le Dextran.

La Figure 3.49 résume les résultats présentés de la Fig. 3.46 à 3.48 sur la gamme de concentration de 0,1 à 1 mg/ml. Lorsque l'on compare le caséinate de sodium natif et l'hydrolysate de crevette natif ou après glycation, on remarque qu'à concentration égale, la tension de surface du caséinate de sodium est plus faible que celle de l'hydrolysate et ce avant ou après réaction de

Maillard. Il semble qu'il faille une concentration 10 fois supérieure pour l'hydrolysate de crevette pour abaisser la tension de surface à 55mN/m.

Medrano *et al.* (2009 ; 2012) ont montré que la glycation entre la Blg et le Lactose ou le Glucose ne modifie pas la tension de surface. Toutefois ils montrent que les modifications engendrés par la réaction de Maillard ont des conséquences sur les propriétés technofonctionnelles notamment les propriétés moussantes. Wierenga *et al.* (2012) montrent des résultats similaires.

Hiller et Lorenzen (2010) reportent des résultats similaires pour des produits de la réaction de Maillard issus de la glycation de caséinate de sodium ou de protéines de lactosérum avec le Glucose, le Lactose, la Pectine ou le Dextran. Dunlap et Coté (2005) montrent que comparativement les produits de faibles poids moléculaire issus de la réaction de Maillard entre la Blg et le Dextran entraîne une baisse plus importante de la tension de surface que ceux de plus haut poids moléculaire. Ces différences sont dues à la diminution de la vitesse d'adsorption aux interfaces des composés de haut poids moléculaire.

Synthèse

Parmi les propriétés sous-jacentes aux propriétés émulsifiantes et moussantes, l'habilité d'une molécule à abaisser les tensions de surface a un rôle important. Or dans notre cas, on s'aperçoit que la RM n'a pas d'influence sur la diminution de la tension de surface pour le caséinate de sodium et l'hydrolysate de crevette.

3.3.3 Facteurs influençant les propriétés émulsifiantes

Pour évaluer les propriétés émulsifiantes des PRM, nous avons réalisé des émulsions modèles dont nous avons suivi le vieillissement. Les résultats obtenus sont présentés et discutés dans cette partie. Pour cette étude, sur la base des résultats présentés en partie 3.2, seuls les PRM obtenus avec les glucides très réactifs (Xyl) et peu réactif (Dex) ont été étudiés.

Les cinétiques de déphasage des émulsions ont été réalisées grâce au suivi du front de séparation des phases (cf. page 91). Ce suivi, a ensuite permis d'estimer la fraction volumique de phase dispersée (%) sur un temps de suivi de 4 h (cf. 2.5.2). Les émulsions étant constituées d'un

ratio huile/eau de 50/50 (p/p) ce qui correspond à une fraction volumique de phase dispersée (huile) de 52% avec une densité de l'huile de 0,93.

3.3.3.1 Type de glucide

Les effets du type de glucide sur les propriétés émulsifiantes des sources protéiques natives ont été étudiés. Comme indiqué plus haut, le caséinate de sodium et l'hydrolysate de crevette glyqué avec le Xylose et le Dextran ont été évalués, dans des émulsions H/E 50/50 (p/p) à pH 4,5 et pH 7.

Les figures 3.50 et 3.51 montrent l'impact du glucides utilisés lors de la réaction de Maillard sur les cinétiques de la fraction volumique de phase dispersée d'émulsions contenant soit du caséinate de sodium maillardisé ou non avec du Xylose et du Dextran (figure 4.50) soit de l'hydrolysate de crevette glyqué ou non avec du Xylose et du Dextran (figure 3.51)

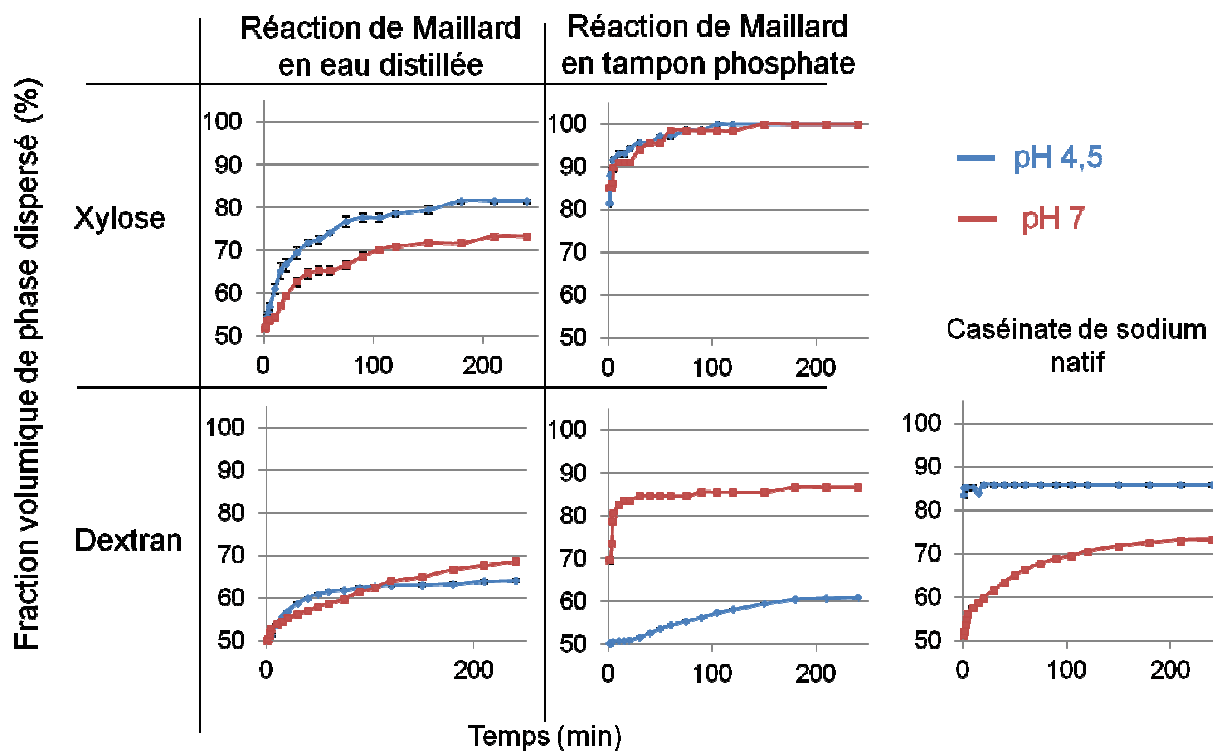


Figure 3.50 : Effet PRM (0,05%) dans l'émulsion à différents pH sur l'évolution de la fraction volumique de phase dispersée pour le caséinate de sodium glyqué avec du Xylose ou du Dextran après RM en eau distillée ou en tampon phosphate.

La figure 3.50 montre que pour le caséinate de sodium natif et CS – Xyl maillardisé en tampon phosphate, la fraction volumique de phase dispersée augmente fortement passant de

50% à 100% dans les premières minutes de suivi. Ce comportement traduit un déphasage immédiat de l'émulsion après fabrication.

Par contre pour les mélanges Cs – Dex maillardisés en tampon phosphate ou eau distillée, on remarque qu'à pH 4,5 la fraction volumique de phase dispersée évolue peu passant de 50% à 60 – 65% en quatre heures. Toutefois le profil des cinétiques de ces deux composés est différent. Ainsi pour CS – Dex maillardisé en tampon phosphate, la cinétique est quasi linéaire après une phase de latence de 30 minutes ; alors que pour CS – Dex maillardisé en eau distillée, on observe une augmentation importante de la fraction volumique de phase dispersée dans les premières minutes passant de 50% à 60% puis une phase stationnaire pendant le reste du suivi.

Dans le cas de CS – Xyl maillardisé en eau distillée, on observe une augmentation progressive de la fraction volumique de phase dispersée entre 0 et 90 minutes passant de 50% à 80% puis la fraction volumique de phase dispersée atteint un plateau. Cette émulsion est qualifiée d'instable mais elle ne présente pas un déphasage immédiat comme le caséinate natif.

Pour les émulsions réalisées à pH 7, on remarque que pour presque tous les mélanges les émulsions ont un comportement différent de celui à pH 4,5 sauf pour les mélanges CS – Xyl maillardisés en tampon phosphate et CS – Dex maillardisés en eau distillée.

Pour le caséinate de sodium natif, on observe pour l'émulsion à pH 7 une diminution de la fraction volumique de phase dispersée par rapport à l'émulsion à pH 4,5 ce qui démontre une augmentation des propriétés émulsifiantes à pH7.

Dans le cas de CS – Xyl maillardisé en eau distillée, on observe une légère amélioration des propriétés émulsifiantes à pH 7 par rapport à pH 4,5. Ainsi, bien que les deux courbes aient la même allure, la fraction volumique de phase dispersée à pH 7 est inférieure à celle à pH 4,5. Ceci traduit une meilleure activité émulsifiante à pH 7. Toutefois pour ces deux pH, la fraction volumique de phase dispersée est supérieure à celle du caséinate de sodium natif à pH 7. La glycation avec le Xylose n'a donc pas entraîné une amélioration des propriétés émulsifiantes de la protéine native.

Pour le CS – Dex maillardisé en eau distillée, il n'y a pas de différence significative dans les cinétiques de la fraction volumique de phase dispersée à pH 4,5 et pH 7. Le pH ne semble pas dans ce cas avoir un impact sur les propriétés émulsifiantes.

Pour CS – Dex maillardisé en tampon phosphate, la fraction volumique de phase dispersée augmente fortement dans les premières minutes passant de 50% à 85% puis reste stable jusqu'à la fin du suivi. On observe donc à l'instar de l'émulsion à pH 4,5 un déphasage rapide et une déstabilisation de l'émulsion.

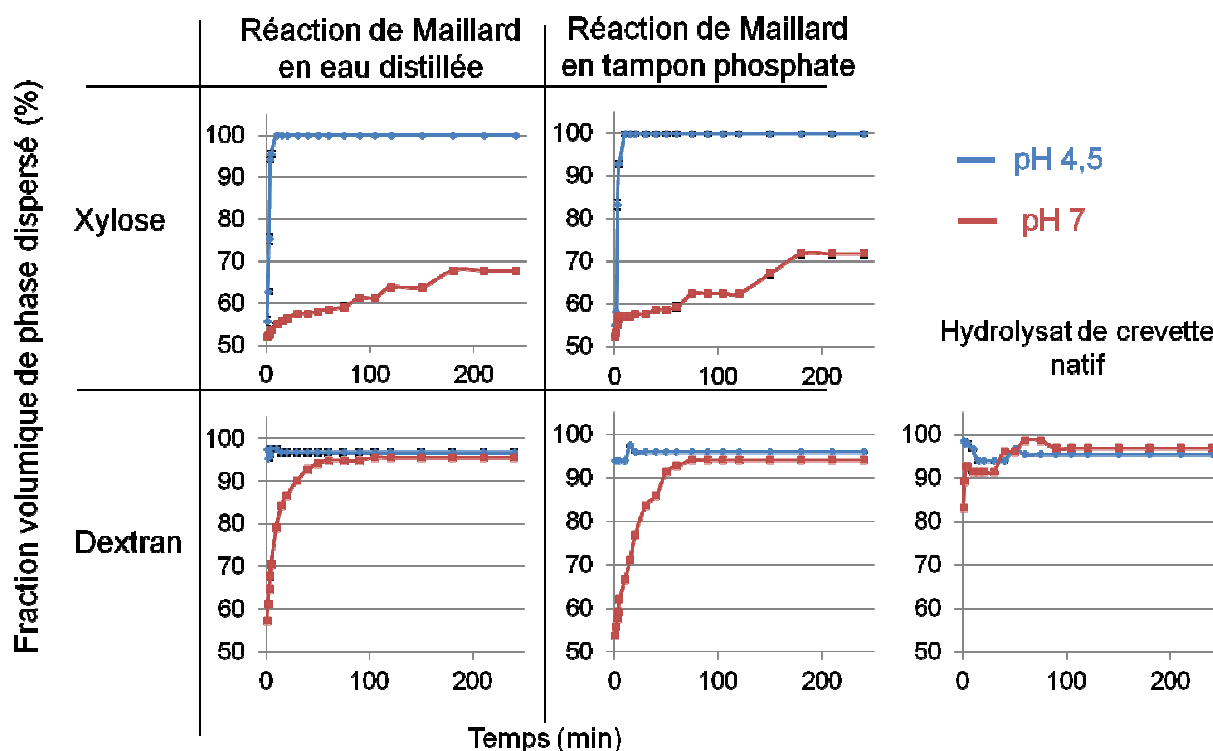


Figure 3.51 : Effet des PRM (0,05%) dans l'émulsion à différents pH sur l'évolution de la fraction volumique de phase dispersée pour l'hydrolysate de crevette glyqué avec du Xylose ou du Dextran après RM en eau distillée ou en tampon phosphate.

Dans le cas de l'hydrolysate de crevette à pH 4,5, quel que soit le mélange, le même comportement est observé à savoir une augmentation importante de fraction volumique de phase dispersée dans les premières minutes passant de 50% à 95 – 100%. Les émulsions sont donc instables et tendent très rapidement vers le déphasage total.

A pH 7, on observe deux comportements différents dans l'évolution de la fraction volumique de phase dispersée.

Le premier correspond au comportement des émulsions contenant de l'hydrolysat de crevette natif et SH – Dex maillardisé en eau distillée ou en tampon phosphate. Dans ce cas, la fraction volumique de phase dispersée augmente fortement dans les premières minutes passant de 50% à 90%. La fraction volumique de phase dispersée tend vers 100% c'est-à-dire la séparation totale des deux phases.

Le second correspond au comportement des émulsions contenant SH – Xyl maillardisé en eau distillée et en tampon phosphate. Dans ces deux cas, on observe une augmentation linéaire de la fraction volumique de phase dispersée pendant le suivi passant de 50% à 70% après 4 heures de repos. On observe donc un effet stabilisant de la glycation par le Xylose.

On remarque donc qu'en fonction du glucide, de la source protéique et des conditions de réaction de Maillard utilisées, et du pH l'impact de la réaction de Maillard n'a pas le même impact sur les propriétés émulsifiantes.

En fonction du type de glucide utilisé lors de la réaction de Maillard les propriétés émulsifiantes ne sont pas modifiées de la même manière. Ainsi Hiller et Lorenzen (2010) ont montré que l'activité émulsifiante de protéine de lait (lactosérum et caséinate) augmente lors de la réaction de Maillard avec les Pectines et le Dextran alors que celle-ci diminue en présence de lactose et de Glucose. De même l'augmentation de la stabilité des émulsions a principalement été détectée dans le cas des mélanges issus de la glycation avec les pectines et le Dextran. Li *et al.* (2009b) ont montré l'effet inverse, c'est-à-dire que pour les protéines de riz, c'est la glycation avec le Glucose ou le Lactose qui permet la plus forte amélioration des propriétés émulsifiantes (activité et stabilité). La glycation avec le Dextran ou la Maltodextrine entraîne une amélioration beaucoup plus faible. Les auteurs soulignent que l'amélioration des propriétés émulsifiantes a lieu au cours des premières étapes de la réaction de Maillard, une réaction prolongée entraînant une perte d'activité (Miralles *et al.*, 2007). Toutefois les réactions en présence de polysaccharides sont plus lentes que celles avec des glucides simples. Il semblerait donc que les conditions de glycation principalement la source protéiques soit un paramètre plus important que le type de glucide utilisé pour modifier les propriétés émulsifiantes. Ainsi comme nous l'avons montré pour le caséinate de

sodium une augmentation de la stabilité est engendrée par la glycation avec le Dextran et non avec le Xylose et dans le cas de l'hydrolysate de crevette le phénomène inverse est observé.

Parmi les études utilisant uniquement des glucides simples, Saeki *et al.* (1997) ont montré que l'amélioration des propriétés émulsifiantes de protéine myofibrillaire de carpe pouvait être obtenue par glycation avec le Glucose pendant les premières étapes de la réaction de Maillard. Chevalier *et al.* (2001) ont quant à eux évalué l'impact de la glycation entre la Blg et différents monosaccharides et d'un disaccharide sur les propriétés émulsifiantes et moussantes. Ils montrent qu'en fonction de la réactivité des glucides, l'impact n'est pas le même sur les propriétés fonctionnelles. Les glucides les plus réactifs vis-à-vis de la réaction de Maillard montrent les plus fortes activités émulsifiantes soit une diminution de la taille des gouttelettes d'huile notamment à pH 5 alors qu'il n'y a pas de différence significative entre la protéine native et la protéine glyquée avec les différents glucides à pH 7. Néanmoins les glucides ayant une réactivité intermédiaire montrent eux une amélioration des propriétés moussantes notamment une meilleure stabilité et un drainage faible. Les auteurs suggèrent que la forte modification de la Blg par le ribose et l'arabinose entraîne une modification drastique de la structure globulaire de la protéine et une meilleure stabilité des émulsions à pH 5.

Selon la littérature, l'augmentation d'une la stabilité interfaciale serait due à l'organisation des complexes protéines – glucides aux interfaces, la partie protéique étant dirigée vers la phase lipidique et la partie glucidique vers la phase aqueuse. De plus les produits de la réaction de Maillard, principalement formés avec des polysaccharides entraînent des couches interfaciales plus épaisses que les protéines natives entraînant une stabilisation par répulsion électrostatique entre les gouttelettes (Fechner *et al.*, 2007 ; Hiller et Lorenzen, 2010). Cette hypothèse a été démontrée par Wooster et Augustin (2006) avec la β -lactoglobuline glyquée avec le Dextran. Dans cette étude, les auteurs ont mesuré l'épaisseur de la couche interfaciale en présence de Blg ou de Blg glyquée avec du Dextran de différents poids moléculaires. Ils ont montré que l'épaisseur de la couche interfaciale peut passer de 3 μ m en présence de Blg native à 20 μ m en présence de Blg glyquée avec du Dextran de haut poids moléculaire. L'épaisseur des couches adsorbées après digestion par la Dextranase est similaire à celle de la Blg native. Ceci suggère que la partie

protéique des glycoconjugués permet l'arrimage aux interfaces et que la partie glucidique crée une barrière autour des gouttelettes.

Toutefois le type de protéines utilisées lors de la réaction de Maillard a un impact sur la glycation. Ainsi Einhorn – Stoll *et al.* (2005) ont montré que la glycation avec la pectine augmente l'activité émulsifiante des protéines de lactosérum alors qu'elle diminue celle du caséinate de sodium. Les auteurs supposent que la structure résiduelle micellaire du caséinate de sodium limite la réaction de Maillard comparativement à la structure dépliée et globulaire des protéines de lactosérum. Cette influence du type de protéine utilisée a aussi été montrée par Álvarez *et al.* (2012) qui ont glyqué différentes fractions de plasma de porc avec du Dextran. L'amélioration des propriétés émulsifiantes dépend dans ce cas de deux paramètres : la fraction protéique étudiée ainsi que la concentration utilisée dans l'émulsion. En effet lors de l'utilisation des glycoconjugués issus des fractions II et III qui correspondent à des globulines, les auteurs montrent une amélioration des propriétés émulsifiantes pour une concentration de 10mg/ml par rapport aux protéines natives. Toutefois pour une concentration en glycoconjugués de 4 mg/ml, ce qui correspond à une concentration de 1mg/ml de protéines, l'effet inverse est démontré. Cela serait dû au fait que la partie hydrophobe portée par les protéines n'est pas en concentration suffisante pour entraîner une adsorption et un recouvrement des gouttelettes d'huile provoquant une diminution des propriétés émulsifiantes. Par contre, dans le cas de la fraction IV composée essentiellement d'albumine, l'amélioration des propriétés émulsifiantes par la glycation avec le Dextran est démontrée aux deux concentrations étudiées. Les auteurs imputent cette amélioration au fait que pour cette fraction, la concentration en groupement hydrophobe est suffisante pour former une émulsion et que l'addition de groupement hydrophile améliore d'autant plus cette propriété.

Ainsi, le type de protéine est, peut être, plus important que le glucide utilisé lors de la réaction de Maillard. L'utilisation d'hydrolysat protéique suivi d'une glycation peut entraîner une amélioration des propriétés émulsifiantes. Ainsi Hassan *et al.* (2007) ont montré que l'hydrolyse enzymatique de protéines de Millet améliorerait les propriétés émulsifiantes et la stabilité des émulsions d'un facteur 2 par rapport à la protéine native. Après glycation de l'hydrolysat par le galactomannan, les propriétés émulsifiantes sont augmentées d'un facteur 4,5 et la stabilité des émulsions d'un facteur 5. Les auteurs ont attribué ces améliorations au fait que les résidus hydrophobes des hydrolysats de protéines de Millet s'adsorbent aux interfaces et que le

polysaccharide greffé s'oriente vers la phase aqueuse couvrant la surface des gouttelettes et prévenant la coalescence. Dans le cas de l'hydrolysate de crevette, Decourcelle *et al.* (2010) ont montré que la glycation d'un hydrolysate de crevette avec le Xylose en milieu liquide permettait une modification de l'activité émulsifiante. Cette modification pourrait être due à une migration vers les interfaces plus efficace du glycoconjugué. De plus l'utilisation des glycoconjugués entraînerait une concentration en molécules plus importante aux interfaces ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur de la couche interfaciale.

Dans le cas du caséinate de sodium, on observe une amélioration des propriétés émulsifiantes après glycation avec le Dextran, cet effet est particulièrement observé au pH 4,5 qui correspond au pHi du caséinate de sodium.

Des résultats similaires ont été montrés par différents auteurs. Drusch *et al.* (2009) ont précisé que généralement la glycation des protéines par la réaction de Maillard améliorait les propriétés émulsifiantes des protéines particulièrement à des pH proche du pHi. Ainsi Al Hakkak et Kavale (2002) ont montré que la glycation entre le caséinate de sodium et la pectine améliore les propriétés émulsifiantes par rapport au caséinate de sodium natif. Ces propriétés sont particulièrement améliorées à pH 4, cela peut être dû à l'augmentation de la solubilité à ce pH du fait des parties glucidiques. Fechner *et al.* (2007) ont montré que la taille des gouttelettes des émulsions contenant du caséinate glyqué avec du Dextran n'est pas affectée par l'acidification, celles-ci sont même plus petites qu'en présence de caséinate natif et flocculent peu. Les auteurs ajoutent que la formation de glycoconjugués entre le caséinate et le Dextran permet d'améliorer la solubilité à pH 4 – 4,5 par rapport au caséinate natif. L'utilisation de ces glycoconjugués dans des émulsions doubles permet la formation de plus petites gouttelettes d'huile et une distribution de taille moins large. De plus, la glycation confère une augmentation de la stabilité contre l'agrégation et la coalescence notamment en condition acide.

3.3.3.2 Concentration en glucide

La figure 3.52 présente les cinétiques de la fraction volumique de phase dispersée de l'hydrolysate de crevette glyqué avec trois concentrations en Xylose dans des émulsions à pH 4.5 (A et B) ou à pH 7 (C et D).

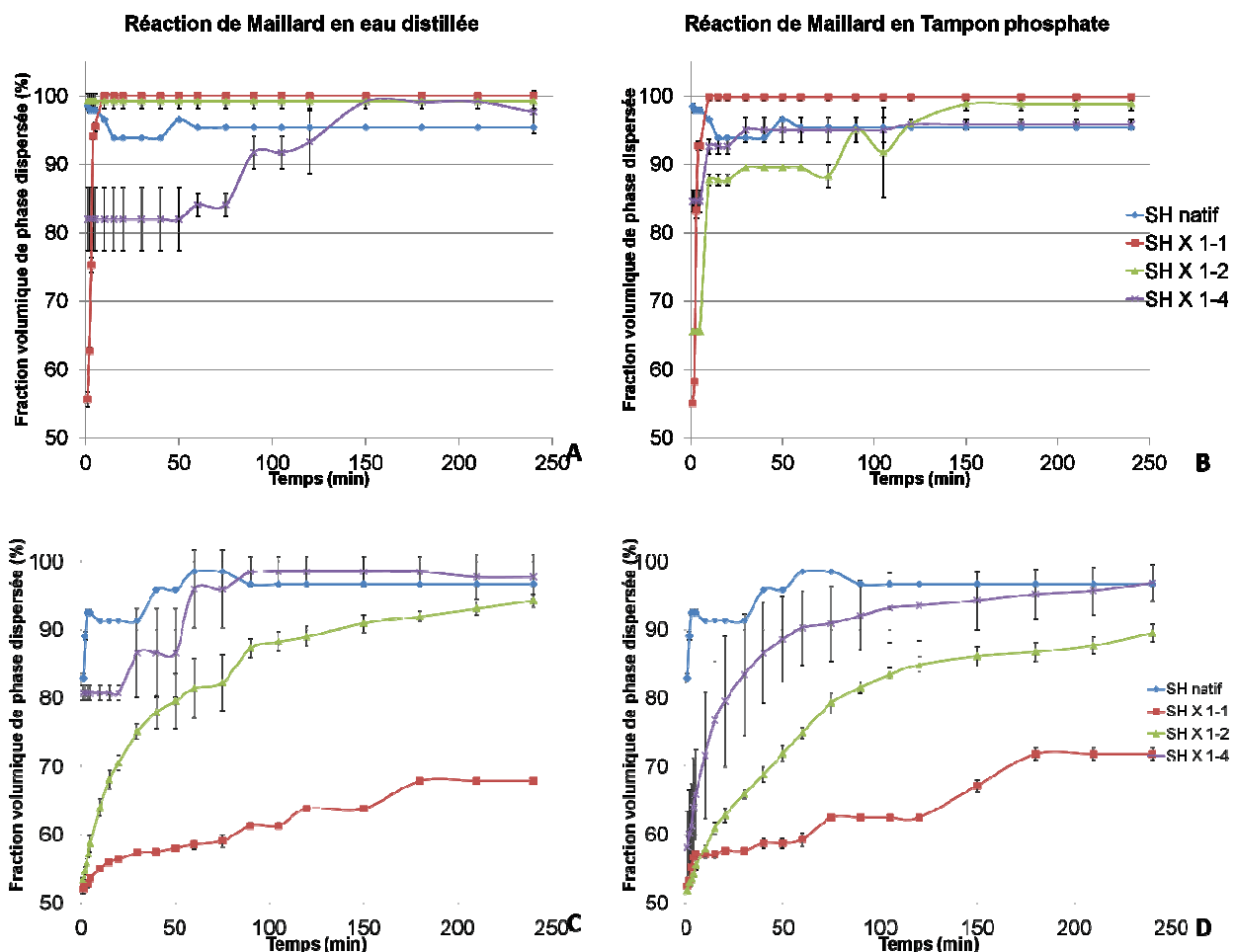


Figure 3.52 : Cinétiques de la fraction volumique de phase dispersée d'une émulsion (ratio eau/huile 50/50) contenant les hydrolysats de crevette glyqués (0,05%) avec trois concentrations en Xylose dans des émulsions à pH 4,5 (A et B) ou à pH 7 (C et D).

Les figures 3.52 A et B montrent qu'à pH 4,5 quel que soit les conditions de réaction de Maillard les émulsions fabriquées présentent une augmentation rapide voir instantanée de la fraction volumique de phase dispersée passant de 50% à plus de 85%. Cette augmentation traduit une déstabilisation rapide de l'émulsion. On peut supposer que dans ces cas les produits de la réaction de Maillard n'ont pas la capacité nécessaire pour s'adsorber aux interfaces. Il en résulte des phénomènes de crémage couplés à la coalescence qui provoquent une déstabilisation rapide de l'émulsion.

Lorsque les émulsions sont réalisées à pH 7, (figures 3.52 C et D) on s'aperçoit qu'à un temps t, plus la concentration en Xylose lors de la réaction de Maillard était importante, plus la valeur de la fraction volumique de phase dispersée au temps t est importante.

Ainsi, cette augmentation de la fraction de phase dispersée au cours du temps avec l'augmentation de la concentration en Xylose dans le mélange pourrait être liée au fait que les émulsions étant réalisées à la même concentration en produits de la réaction de Maillard, plus la concentration en glucide est importante, plus la part protéique diminue. Ainsi, pour des produits issus des mélanges SH X 1 :2 ou SH X 1 :4, la part protéique des produits de la réaction de Maillard serait en quantité insuffisante pour présenter des propriétés émulsifiantes.

3.3.3.3 Hydrolyse enzymatique.

L'hydrolyse enzymatique améliore la solubilité du caséinate de sodium avant et après glycation avec le Dextran et le Xylose. Nous nous sommes intéressés à son impact sur les propriétés émulsifiantes qui en découlent.

La figure 3.53 présente les cinétiques de la fraction volumique de phase dispersée des émulsions contenant les trois hydrolysats de caséinate.

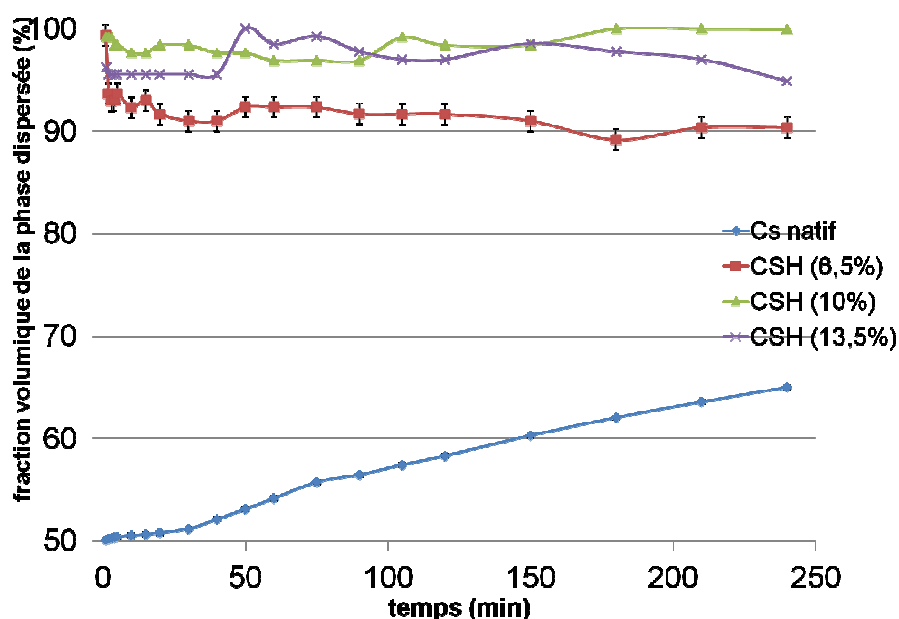


Figure 3.53 : Cinétiques de la fraction volumique de phase dispersée d'une émulsion (ratio eau/huile 50/50 ; pH 7) contenant les hydrolysats de caséinate de sodium à différent degré d'hydrolyse à la concentration de 0,05%.

Les émulsions contenant du caséinate de sodium hydrolysé montrent une cinétique de la fraction volumique de phase dispersée qui est typique d'une émulsion instable, et ce, quelque soit le degré d'hydrolyse. En effet, la fraction volumique de phase dispersée passe de 50% à 90% dans les premières minutes de suivi et reste constante pour le reste du suivi. Alors que le

caséinate de sodium natif montre une augmentation linéaire de la fraction volumique de phase dispersée jusqu'à atteindre au bout de 4h la valeur de 67%.

L'hydrolyse enzymatique du caséinate de sodium entraîne une perte des propriétés émulsifiantes de la protéine. Cette perte peut être expliquée par le fait que le caséinate est une protéine linéaire qui peut s'adsorber et se réarranger aux interfaces. L'hydrolyse entraîne une diminution du poids moléculaire et change la conformation de la protéine notamment l'alternance des groupements hydrophiles et hydrophobes. De ce fait il est possible que les hydrolysats de caséinate ne soient plus assez amphiphiles pour pouvoir stabiliser de manière efficace les interfaces (Gbogouri *et al.* 2004).

Klompong *et al.* (2007) ont montré que dans le cas de l'hydrolyse enzymatique de protéine de Selar, plus le degré d'hydrolyse est élevé plus la capacité émulsifiante et la stabilité des émulsions diminuent. Ce phénomène a aussi été montré par Nanilanon *et al.* (2011) avec des hydrolysats de brème. Cette diminution des propriétés fonctionnelles avec l'augmentation du degré d'hydrolyse peut être expliquée par le poids moléculaire des peptides. En effet, les peptides de faible poids moléculaire bien qu'ils migrent plus rapidement aux interfaces ne sont pas assez amphiphiles ni capables de se réorienter ou de se réorganiser aux interfaces pour conférer une bonne capacité émulsifiante (Kristinsson et Rasco, 2000 ; Gbogouri *et al.*, 2004).

De plus Nanilanon *et al.* (2011) ont montré que la concentration en peptides utilisés dans les émulsions peut masquer l'impact du degré d'hydrolyse. Ainsi dans leur étude, ils réalisent des émulsions à trois concentrations en protéines pour trois degrés d'hydrolyse. Pour une concentration de 0,1% en protéine dans l'émulsion, l'effet du degré d'hydrolyse est visible. Par contre cet effet est masqué pour des concentrations en protéine dans l'émulsion supérieure ou égale à 0.25%. Dans ce cas, il n'y a pas de différence significative entre les trois degrés d'hydrolyse testés pour les propriétés émulsifiantes. A faible concentration, l'adsorption des protéines aux interfaces est gouvernée par des phénomènes de diffusion. Tandis qu'à forte concentration, la diffusion des protéines aux interfaces est un phénomène « incompatible thermodynamiquement », il en résulte une accumulation des protéines dans la phase aqueuse et non aux interfaces (Thiansilakul *et al.*, 2007).

Ainsi dans le cas des hydrolysats, les propriétés émulsifiantes sont gouvernées par des propriétés moléculaires et plus particulièrement la taille des peptides et la concentration employée dans les émulsions.

La figure 3.54 présente l'impact de la glycation des hydrolysats de caséinate sur les cinétiques de la fraction volumique de phase dispersée des émulsions.

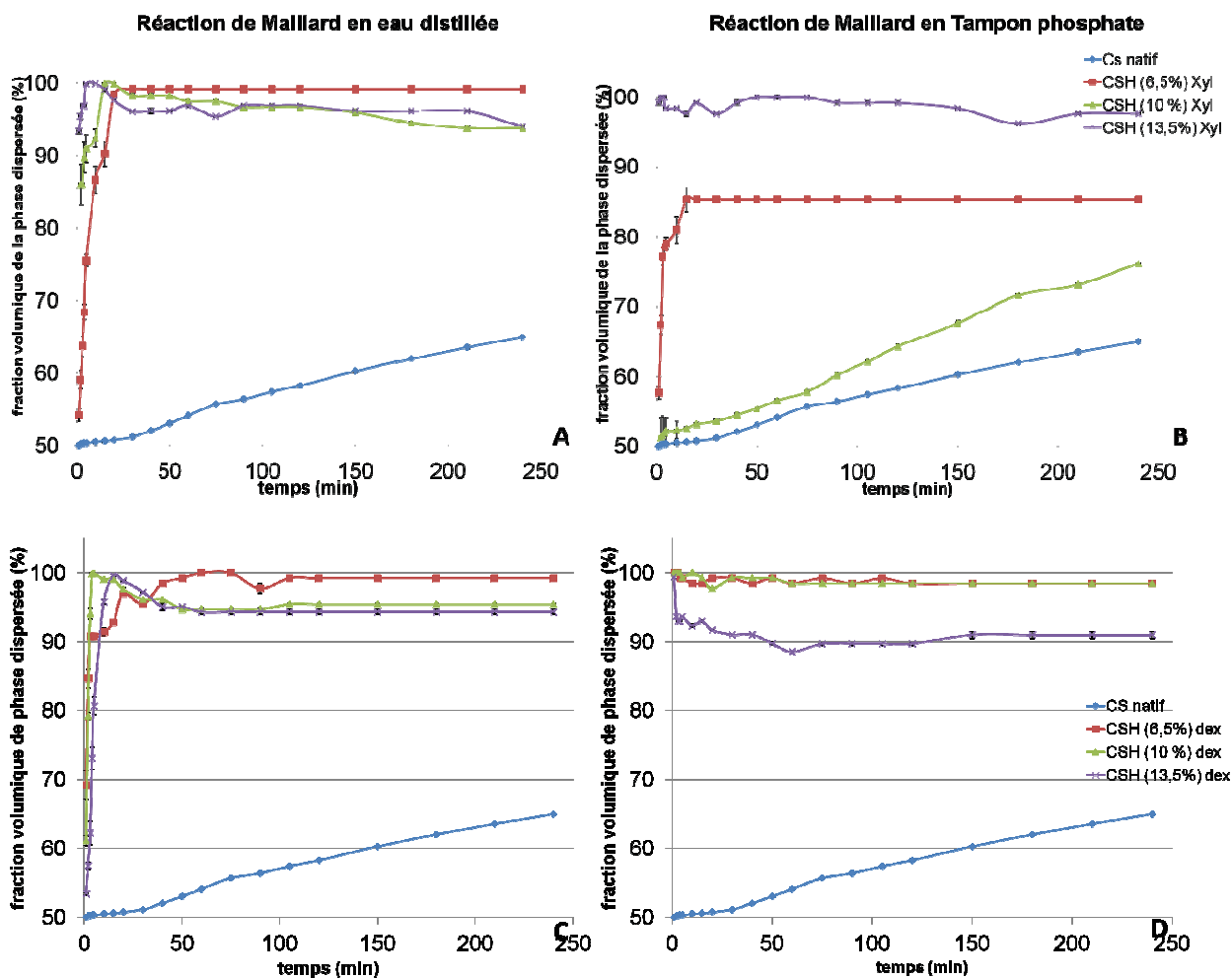


Figure 3.54 : Cinétiques de la fraction volumique de phase dispersée d'une émulsion (ratio eau/huile 50/50 ; pH 7) contenant les hydrolysats de caséinate de sodium à différents degrés d'hydrolyse glyqués en eau distillée (A et C) ou en tampon phosphate (B et D) avec le Xylose ou le Dextran à la concentration de 0,05%.

Lorsque l'on regarde les cinétiques de la fraction volumique de phase dispersée des émulsions contenant les différents hydrolysats de caséinate glyqués avec le Xylose en eau distillée (figure 3.54A), on remarque que, quel que soit le degré d'hydrolyse, les cinétiques ont le même comportement. La fraction volumique de phase dispersée augmente fortement passant de

50% à presque 100% dans les premières minutes du suivi. Les émulsions sont donc déstabilisées dès l'arrêt de l'émulsification.

Lorsque la réaction de Maillard a lieu entre les hydrolysats de caséinate et le Xylose en tampon phosphate, la présence des différents composés entraîne des comportements différents dans les émulsions. Ainsi trois comportements peuvent être dégagés (figure 3.54B).

Le premier comportement correspond à l'émulsion contenant l'hydrolysat de caséinate (DH 13,5%) – Xylose. Dans ce cas la fraction volumique de phase dispersée passe de 50% à 100% dès l'arrêt de l'agitation. L'émulsion produite est donc instable.

Le deuxième comportement correspond à l'émulsion contenant l'hydrolysat de caséinate (DH 6,5%) glyqué avec le Xylose. Dans ce cas la fraction volumique de phase dispersée augmente de 50% à 85% pendant les 15 premières minutes puis reste stable jusqu'à la fin du suivi.

Enfin le troisième comportement correspond à l'émulsion contenant l'hydrolysat de caséinate (DH 10%) glyqué avec le Xylose. Dans ce cas la fraction volumique de phase dispersée augmente linéairement tout au long du suivi pour atteindre la valeur de 75% au bout de quatre heures. Cette évolution linéaire dénote une migration des gouttelettes selon la gravité. De plus le culot étant trouble on peut supposer que l'émulsion est polydisperse.

Dans le cas de la glycation des hydrolysats de caséinate avec le Dextran en présence ou non de tampon phosphate, les cinétiques de fraction volumique de phase dispersée ont le même comportement. Ce comportement est celui d'une émulsion instable qui déphase immédiatement après la fabrication.

Dans le cas du caséinate de sodium, l'hydrolyse enzymatique entraîne une perte des propriétés émulsifiantes par rapport à la protéine initiale. Cette perte n'est pas compensée par la glycation avec un glucide simple ou un polysaccharide.

3.3.3.4 Poids moléculaire du Dextran.

La figure 3.55 présente l'impact du poids moléculaire du Dextran utilisé lors de la glycation avec le caséinate et l'hydrolysate de crevette sur les cinétiques de la fraction volumique de phase dispersée des émulsions fabriquées à trois pH différents.

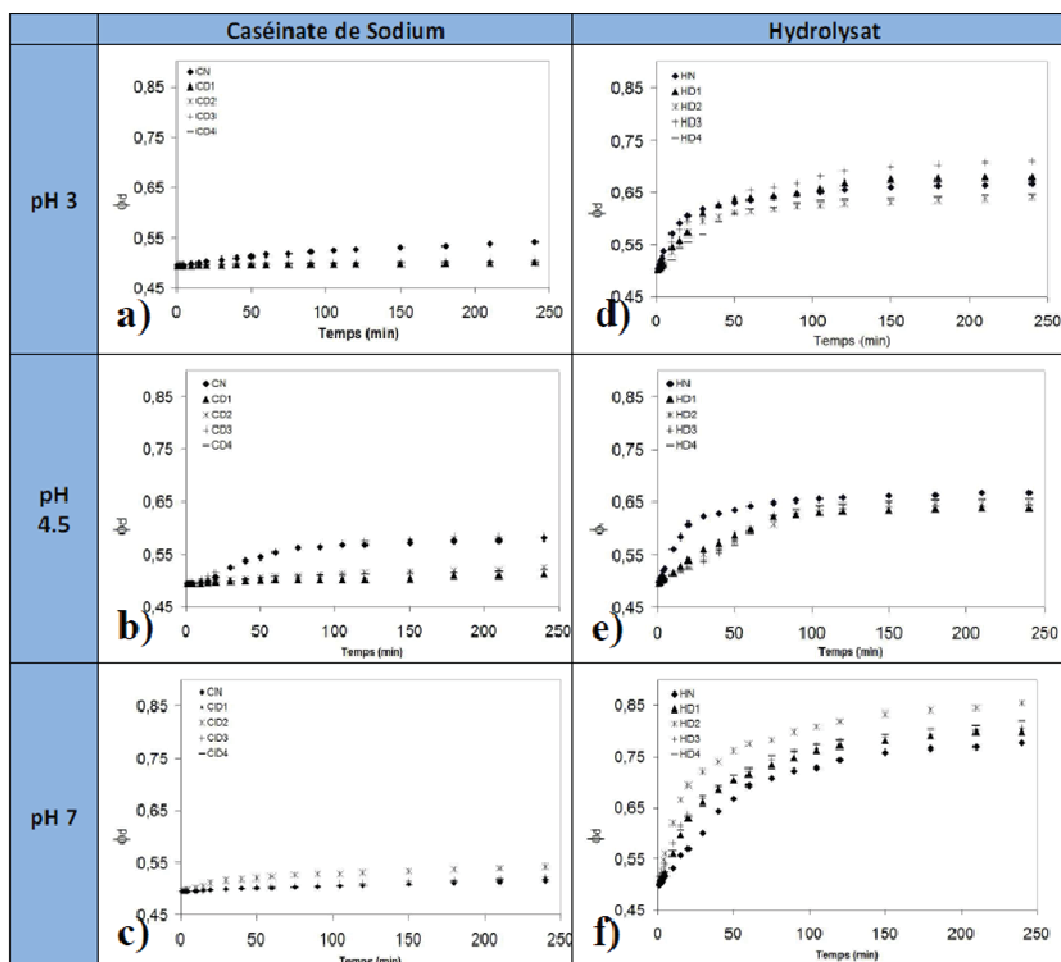


Figure 3.55 : Evolution de la fraction volumique de la phase dispersée (Φ) des émulsions au cours du temps contenant les glycoconjugués en eau distillée ou les témoins natifs à 0,5 % et à différents pH (N : Natif ; D1 : Dextran 6000, D2 : Dextran 40000, D3 : Dextran 100000, D4 : Dextran 270000 ; a à c : caséinate ; d à f : Hydrolysate).

On constate d'après les figures 3.55 a et c que le volume de la fraction volumique de la phase dispersée pour le caséinate est quasiment la même pour les différents pH. Cependant à pH 4,5, on remarquera que le CS natif et le CS Dex 100000 se distinguent des autres, leur fraction volumique de la phase dispersée est plus importante. Ces résultats pourraient être expliqués pour le pH 4,5 car à ce pH nous sommes au pH_i du caséinate de sodium. D'après les graphiques de l'hydrolysate (Fig 3.55 : d, e, f) nous constatons que le pH où les émulsions sont le plus stable est le pH 4,5 (Fig 3.55 : e), les fractions volumiques de la phase dispersée pour ce pH sont les moins importantes contrairement au pH 3 qui est le pH le moins stable (Fig 3.55 : d) et les émulsions à

pH 7 (Fig 3.55 : f) ont un comportement proche de celles à pH 4,5. Quand la fraction volumique de la phase dispersée augmente en fonction du temps, il y a une concentration des globules gras en surface dans la phase continue en fonction du temps. Ces résultats interprètent le phénomène de crémage des émulsions obtenues. Nous pouvons aussi dire que la fraction volumique de la phase dispersée évolue différemment en fonction de la protéine et du pH utilisés pour les tests.

Nous pouvons conclure d'après cette figure (Fig 3.55) qu'entre les deux sources protéiques, le pH le plus stable n'est pas le même, ce qui veut dire que la stabilité varie en fonction des glucides et des protéines utilisés. Cependant, nous n'observons pas de relation entre les différents poids moléculaires du Dextran et la diminution du crémage.

3.3.4 Caractéristiques rhéologiques des émulsions

L'utilisation de glucides en présence de protéines dans des émulsions avant ou après réaction de Maillard peut entraîner des modifications dans la rhéologie de l'émulsion (Tadros, 2004). De plus les mesures rhéologiques de telles émulsions peuvent offrir des éléments sur la structure ainsi que sur les phénomènes d'évolution se déroulant dans l'émulsion.

3.3.4.1 Mesures rhéologiques

Le tableau 3.8 résume les indices d'écoulement (n) et la consistance (K) des émulsions contenant les différents mélanges. Les mesures ont été réalisées après quatre heures de repos pour les émulsions étudiées à pH 7 contenant 0,5% de composés. La fraction volumique de phase dispersée a aussi été mesurée au temps de mesure.

Tableau 3.8 : valeur de l'indice de consistance (k), d'écoulement (n), de la viscosité apparente à $13s^{-1}$ (η_{10}) et $103s^{-1}$ (η_{100}) et de la fraction volumique de phase dispersée des pour les émulsions après 4 heures de vieillissement

	K (Pa.s)	n	η_{10} (Pa.s)	η_{100} (Pa.s)	ϕ
CS	$0,28 \pm 0,1$	$0,73 \pm 0,02$	$0,1 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,02$	0,52
CSD	$0,39 \pm 0,1$	$0,72 \pm 0,33$	$0,13 \pm 0,03$	$0,1 \pm 0,02$	0,52
CSX	$0,48 \pm 0,22$	$0,72 \pm 0,08$	$0,21 \pm 0,07$	$0,13 \pm 0,02$	0,72
SH	$0,64 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,09$	$0,12 \pm 0,02$	0,78
SH D	$0,57 \pm 0,11$	$0,62 \pm 0,01$	0,27	$0,1 \pm 0,02$	0,81
SH X	$4,58 \pm 0,5$	$0,39 \pm 0,02$	$0,79 \pm 0,05$	$0,27 \pm 0,01$	0,79
SH X1:2	$1,5 \pm 0,16$	0,53	$0,37 \pm 0,08$	$0,17 \pm 0,02$	0,81
SH X 1:4	1,55	0,47	0,32	0,13	0,83

Dans le cas du caséinate de sodium natif et après glycation avec le Dextran on remarque qu'il n'existe pas de différence significative dans la valeur de fraction volumique de phase dispersée, dans l'indice d'écoulement ainsi que pour les viscosités obtenues. La glycation avec le Dextran entraîne une légère augmentation de la consistance de l'émulsion. Le faible taux de glycation avec le Dextran pourrait expliquer cette similarité entre le caséinate de sodium natif et la caséinate de sodium glyqué avec le Dextran.

Pour tous les échantillons les indices d'écoulement sont inférieurs à 1 ce qui laisse penser que les émulsions se comportent comme des fluides pseudoplastiques (Sathivel *et al.*, 2009)

Lorsque que l'on compare l'évolution du module élastique (G'), du modules visqueux (G'') et de la viscosité complexe (η^*) lors d'un balayage en déformation d'une émulsion contenant soit du caséinate de sodium soit du caséinate de sodium maillardisé avec du Dextran, on n'observe pas de différence significative entre les deux émulsions pour ces paramètres (figure 3.56).

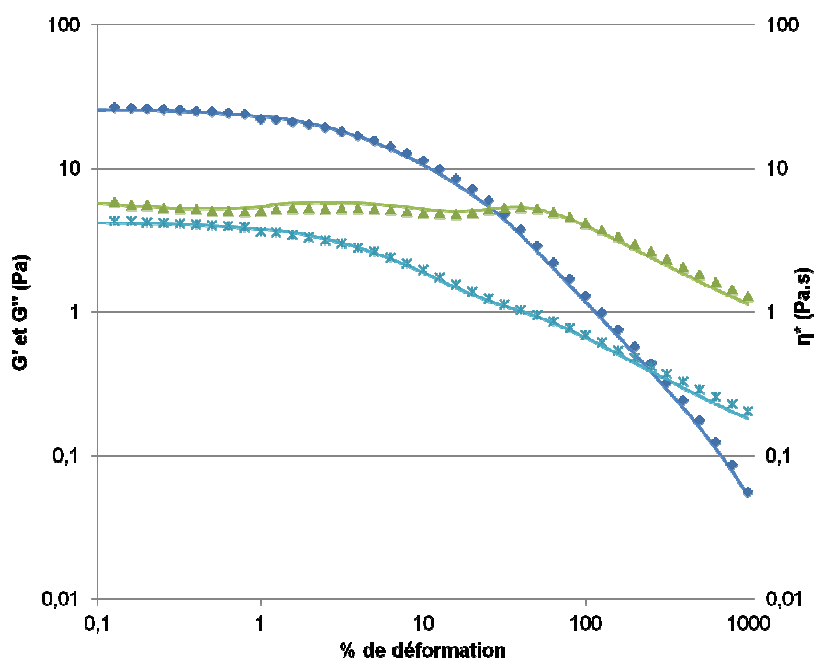


Figure 3.56 : Balayage en déformation d'une émulsion contenant du caséinate de sodium natif (traits pleins) ou du caséinate de sodium glyqué avec du Dextran (symboles).

Cette absence de différences peut être due à la faible modification du caséinate de sodium lors de sa glycation avec le Dextran. En effet, comme vu dans la partie 3.2, la glycation avec le Dextran n'entraîne qu'une faible diminution du nombre de fonction aminée libres.

Ainsi, le faible impact de la glycation, n'entraîne pas de différence majeure dans la rhéologie des émulsions fabriquées avec du caséinate de sodium glyqué avec du Dextran. Cette absence de différence est aussi remarquable lors du balayage en fréquence des échantillons (annexe 11)

Dans le cas de l'hydrolysate de crevette (SH), on remarque qu'en fonction du glucide utilisé lors de la glycation les effets sur les valeurs de consistance, d'écoulement et de viscosité des émulsions sont différents. Toutefois, toutes les mesures ont été réalisées sur des émulsions ayant des valeurs de fraction volumique de phase dispersée proche.

Ainsi, la glycation avec le Dextran n'entraîne pas de différence significative dans les valeurs des différents paramètres par rapport à l'hydrolysate natif. Comme pour le caséinate de sodium, on peut supposer que cette absence de différence est liée au faible taux de glycation du polysaccharide.

Par contre, la glycation de l'hydrolysat de crevette avec le Xylose entraîne des différences significatives par rapport à l'hydrolysat de crevette natif. On observe, et ce quelque soit la concentration en Xylose utilisée lors de la réaction de Maillard une augmentation de la consistance et une diminution de l'indice d'écoulement. De plus, il n'y a pas de différences significatives entre les mélanges SH X 1 :2 et SH X 1 :4 qui correspond à des mélanges où lors de la réaction de Maillard la concentration en Xylose à été doublée ou quadruplée. Ces mélanges présentent toutefois une valeur de consistance et de viscosité apparente plus faible que pour le mélange SH X. ce mélange présente les plus fortes différences avec l'hydrolysat natif. La consistance augmente d'un facteur 4 par rapport à celle de l'hydrolysat de crevette natif et la viscosité apparente η_{10} d'un facteur 2,6. Ces données laissent suggérer que les émulsion contenant l'hydrolysat glyqué avec le Xylose ont des concentrations en gouttelettes d'huile plus importante et surement moins polydisperse et possédant une structure entre gouttelette plus rigide que lors de l'utilisation d'hydrolysat de crevette natif (Chanamai et McClements, 2000 ; Decourcelle *et al.*, 2010). Le système tendrait vers un empilement maximal des gouttelettes et donc un encombrement ce qui le rapprocherait du comportement d'un fluide présentant un seuil de viscosité.

Lorsque que l'on compare les émulsions contenant de l'hydrolysat de crevette maillardisé avec du Xylose et celle contenant du caséinate de sodium, on observe des différences significative lors du balayage en déformation (annexe 12) et du balayage en fréquence (figure 3.57)

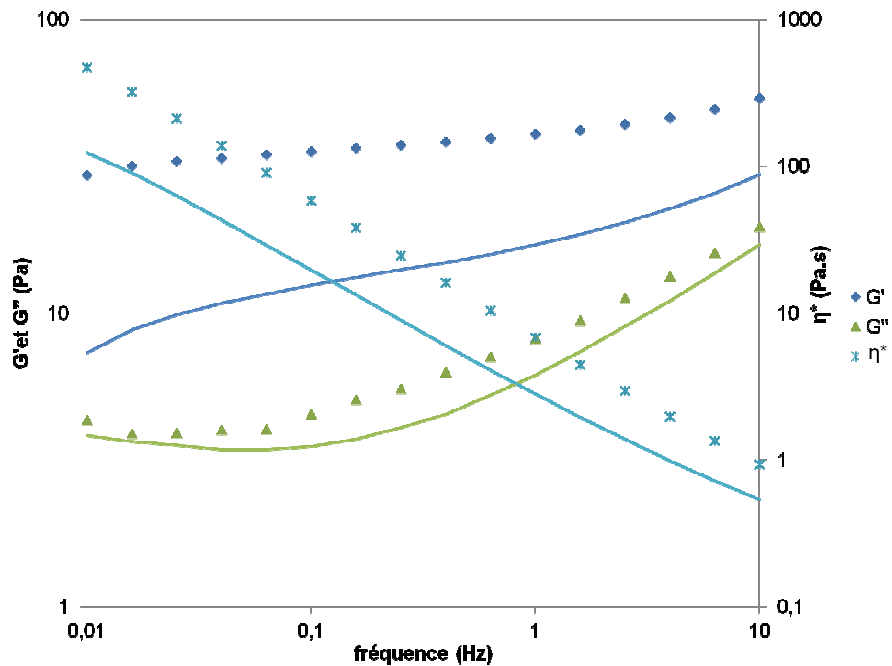


Figure 3.57 : Balayage en fréquence d'une émulsion contenant du caséinate de sodium natif (traits pleins) ou l'hydrolysate de crevette glyqué avec du Xylose (symboles).

Lors du balayage en fréquence de ces deux émulsions (figure 3.66), on remarque que l'évolution des deux modules est de la viscosité est similaire bien que les valeurs soit supérieure pour l'émulsion contenant du caséinate par rapport à celle contenant SH-Xyl. On observe que sur toute la gamme de fréquence G' est supérieur à G'' , les émulsions présentent donc un comportement solide sur la gamme de fréquence étudiée (Moates *et al.*, 2001). De plus on remarque que les deux modules sont relativement indépendants de la fréquence appliquée. De mêmes résultats ont été reportés par Chen *et al.* (2011) et Manoj *et al.* (2000) avec d'autres systèmes d'émulsions. Ces auteurs supposent que cette indépendance des modules vis-à-vis de la fréquence démontre que les émulsions sont hautement floclées.

De plus on remarque que la viscosité chute avec l'augmentation de la fréquence ce qui indique une rupture du réseau avec l'augmentation de la fréquence (Manoj *et al.* , 2000).

Les systèmes montrent un comportement qui s'assimile à celui de systèmes très concentrés. De plus, le module élastique présente un plateau ce qui peut se traduire par le fait que la fraction volumique de phase dispersée est à son empiement maximal ce qui limite les mouvements entre gouttelette. Pour valider cette hypothèse il serait nécessaire d'évaluer la distribution de la taille des gouttelettes. Il serait aussi intéressant de déterminer la fraction volumique effective des objets dans l'émulsion.

Ainsi, les émulsions contenant du caséinate de sodium ou de l'hydrolysate de crevette Maillardisés avec le Xylose présentent une floculation importante. Toutefois, le réseau généré par les floccs est plus rigide dans le cas du caséinate de sodium du fait des valeurs plus importantes.

3.3.4.2 Microscopie de Force Atomique

Lors des expériences de tensions de surface à Lorient, un essai en microscopie de forces atomiques a été réalisé sur l'hydrolysate de crevette et l'hydrolysate de crevette glyqué avec le Xylose (figure 3.58).

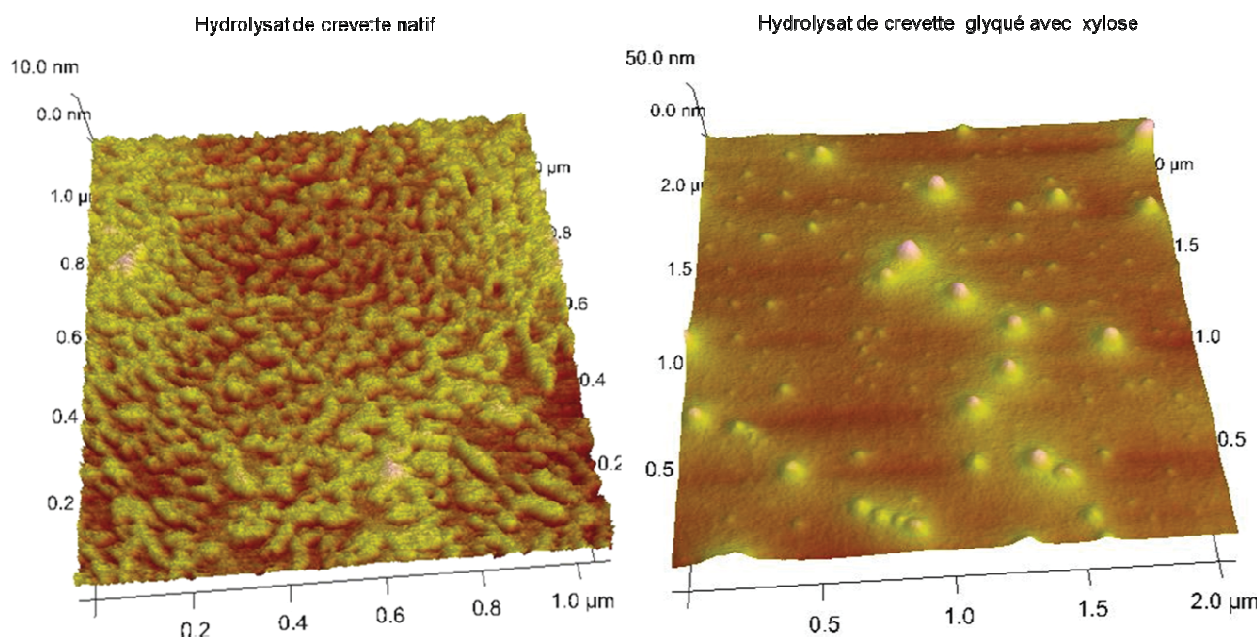


Figure 3.58 : Image de la topographie d'une plaque de Mica sur laquelle a été déposée de l'hydrolysate de crevette natif ou de l'hydrolysate de crevette glyqué avec le Xylose par AFM.

On observe des différences significatives entre les deux échantillons, il semble que l'hydrolysate de crevette en solution se comporte plus sous forme de molécules individuelles. Après glycation avec le Xylose, on observe des objets qui sont plus gros qui ne s'étalent pas à la surface dénotant une structure plus rigide. Cette apparition de structure après la glycation peut être l'une des explications à l'augmentation de la consistance observée lors des mesures de viscosimétrie.

Toutefois afin d'affiner les résultats de rhéologie et de microscopie de force atomique, il serait judicieux d'effectuer des mesures complémentaires notamment de potentiel zéta, mais

aussi de caractériser la taille des gouttellettes dans les émulsions formées et de réaliser des mesures de tensions interfaciales entre la phase huileuse et la phase aqueuse.

3.3.5 Conclusion

La réaction de Maillard entraîne dans certains cas une modification des propriétés fonctionnelles des sources protéiques utilisées. Cet impact de la réaction de Maillard est différent en fonction à la fois de la source protéique et du glucide.

Ainsi dans le cas du caséinate de sodium, la réaction de Maillard entraîne une augmentation de la solubilité, notamment au niveau du pHi du caséinate et ce quelque soit le glucide utilisé à l'exception du Xylose. Pour les propriétés émulsifiantes, la glycation avec les glucides simples (Glucose et Xylose) ainsi qu'avec les FOS a un impact plutôt négatif, c'est-à-dire que les émulsions fabriquées déphasent plus rapidement au cours du temps que celles contenant du caséinate de sodium natif. Par contre, la glycation en présence de Dextran entraîne une cinétique de la fraction volumique de phase dispersée inférieure à celle du caséinate de sodium natif, et ce à différent pH, dénotant une amélioration de la stabilité de l'émulsion. Toutefois, les expériences en rhéologie ne détectent pas de différences significatives entre les émulsions contenant le caséinate natif et le caséinate glyqué avec le Dextran.

L'hydrolyse enzymatique du caséinate de sodium entraîne une augmentation de la solubilité qui devient supérieure à 90% sur toute la gamme de pH étudié. Par contre, les émulsions fabriquées avec les hydrolysats de caséinate natif ou maillardisés présentent un déphasage rapide (< 2heures) et donc une instabilité des émulsions. On peut donc supposer que l'hydrolyse enzymatique du caséinate de sodium bien que permettant l'augmentation du nombre de composés ioniques et polaires diminue les caractéristiques hydrophobes limitant de ce fait l'affinité des molécules avec la phase huileuse et donc les propriétés émulsifiantes.

Pour l'hydrolysate de crevette, la réaction de Maillard n'a pas d'effet sur la solubilité ou la tension de surface quelque soit le glucide utilisé. Toutefois, des comportements différents sont observables dans les émulsions. Ainsi les composés maillardisés avec le Xylose présente une évolution de la fraction volumique de la phase dispersée linéaire et similaire à celle du caséinate de sodium natif. De plus par rapport aux émulsions contenant de l'hydrolysate de crevette natif, ces émulsions possèdent une consistance et une viscosité supérieure ce qui indique que la glycation avec le Xylose induit une structuration du système.

Toutefois aux vues de ces différents résultats, il semble être difficile de prédire, les conséquences d'un point de vue fonctionnel de la réaction de Maillard à partir d'une source protéiques et d'un glucide. Néanmoins, dans notre étude deux couples source protéique/glucide se dégagent pour l'amélioration des propriétés fonctionnelles, notamment les propriétés émulsifiantes, par la réaction de Maillard. Il s'agit du couple caséinate de sodium / Dextran et hydrolysate de crevette / Xylose.

En plus d'avoir une incidence sur les propriétés technofonctionnelles, la réaction de Maillard peut produire des composés ayant des propriétés biologiques notamment des propriétés antioxydantes. Les émulsions étant des systèmes sensibles à l'oxydation, il est intéressant de mesurer les capacités potentiellement antioxydantes des différents mélanges.

3.4 La capacité antioxydante

La réaction de Maillard peut générer des composés antioxydants. Ceux-ci vont agir via différents mécanismes (donneurs d'électrons ou donneurs de protons). Afin d'évaluer ces activités, plusieurs tests utilisant différents mécanismes ont été réalisés. Nous avons choisi trois tests antioxydants pour caractériser nos produits : le pouvoir réducteur, l'activité antiradicalaire (par le test au DPPH) et le test ORAC.

Un autre mécanisme de la protection antioxydante est l'inhibition/élimination des substances pro-oxydantes dont certains métaux tels que le fer. Cette protection peut être assurée par la capacité à chélater les ions métalliques des PRM. Dans notre étude, nous avons évalué la capacité des PRM à chélater le fer.

3.4.1 Effet de la capacité antioxydante en fonction du type de glucide et de la source protéique utilisée lors de la réaction de Maillard

Dans cette partie, nous présentons les résultats des activités antioxydantes obtenues pour la protéine de référence, le caséinate de sodium, et ceux obtenus pour le co-produit marin, l'hydrolysate de crevette. Dans les deux cas, les tests ont été réalisés sur les protéines natives et les protéines après glycation avec les quatre glucides.

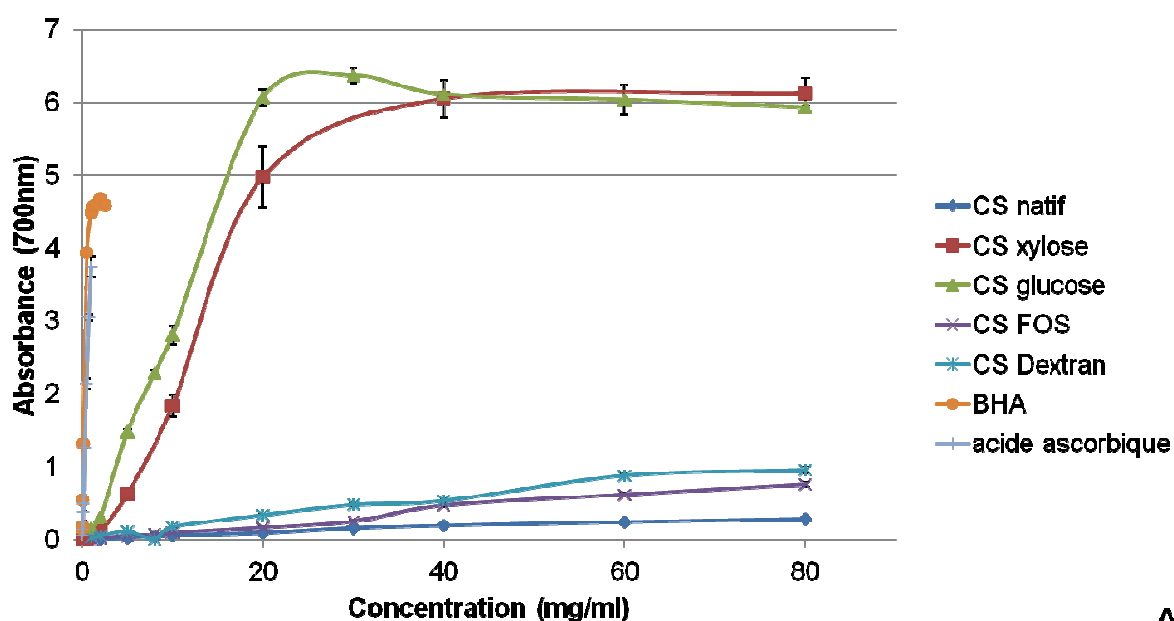
Le pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur, c'est-à-dire la capacité d'une substance à donner un électron, est un test largement utilisé dans la littérature. En effet, la réaction de Maillard peut générer des composés réducteurs parmi lesquels les substances aromatiques et les réductones. L'avantage de ce test est qu'il est simple à mettre en œuvre, reproductible et fiable. De plus, il permet d'évaluer la contribution des substances dans les réactions d'oxydo-réduction qui régissent le processus d'oxydation.

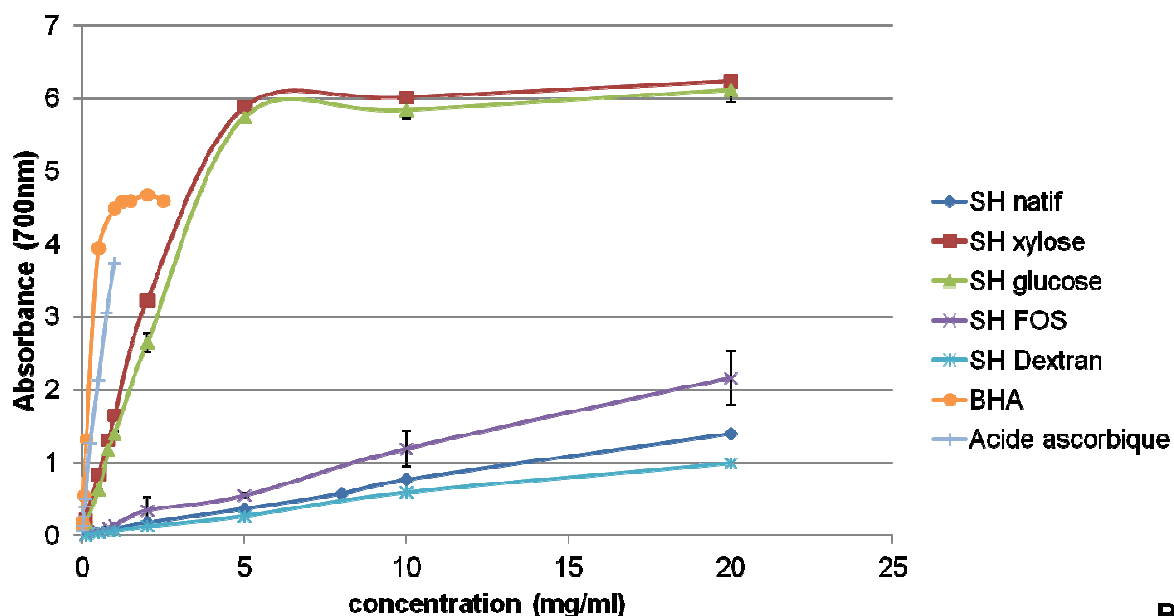
Dans le test de l'évaluation du pouvoir réducteur, plus l'absorbance à 700nm est élevée, et plus le pouvoir réducteur d'une substance est considéré comme important.

Pour évaluer le pouvoir réducteur, un effet dose a été réalisé pour tous les échantillons analysés. La figure 3.59 montre l'évolution de l'absorbance à 700nm des échantillons : hydrolysate

de crevette natif (SH) et hydrolysats glyqués en eau distillée par le Xylose, le Glucose, les FOS et le Dextran, d'une part, et le caséinate (CS) non glyqué ainsi que le caséinate glyqué en eau distillée par le Xylose, Glucose, les FOS et le Dextran. Les deux contrôles positifs sont l'acide ascorbique et le BHA. L'évolution des absorbances des échantillons maillardisés en présence de tampon phosphate, ne présentant pas de différence avec les échantillons maillardisés en eau distillée, est présentée en Annexe 13.



A



B

Figure 3.59 : Evaluation du pouvoir réducteur des échantillons (Caséinate A et hydrolysats de crevette B) avant et après réaction de Maillard en eau distillée avec différents glucides. Contrôles positifs : BHA et acide ascorbique.

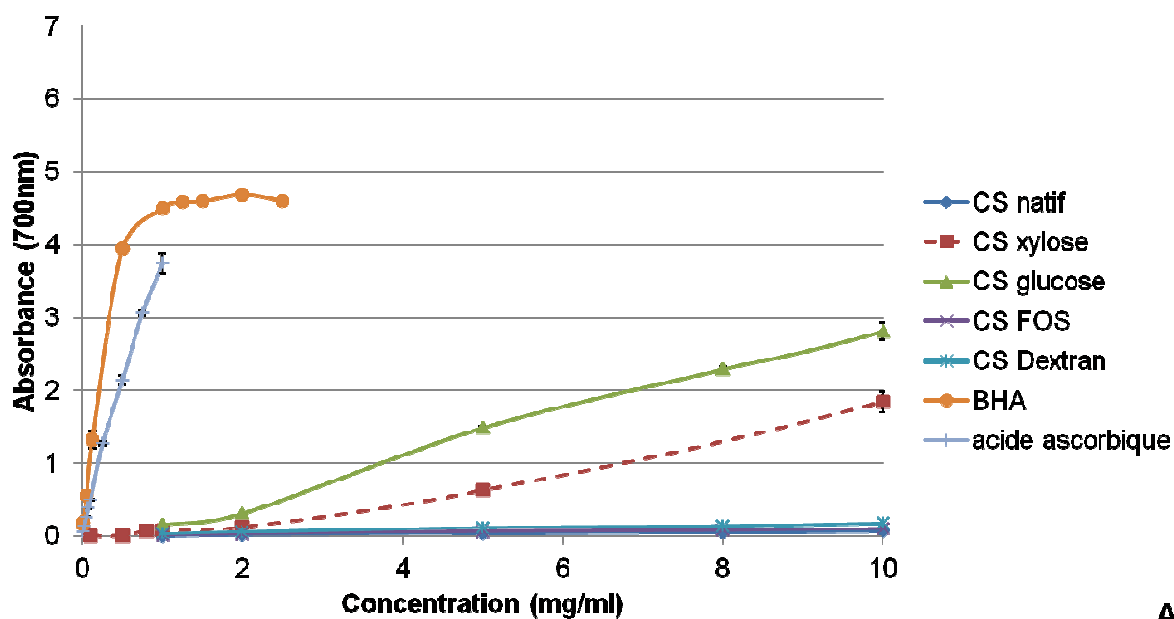
On peut déduire trois groupes de produits à partir de l'observation de la figure 3.59.

Le premier groupe est composé des témoins positifs : le BHA et l'acide ascorbique. Ces deux échantillons montrent une augmentation linéaire très rapide de l'absorbance qui tend vers un plateau avec l'augmentation de la concentration en échantillon. Ce plateau est atteint pour 1mg.ml^{-1} dans le cas du BHA et il n'est pas atteint dans la gamme étudiée pour l'acide ascorbique.

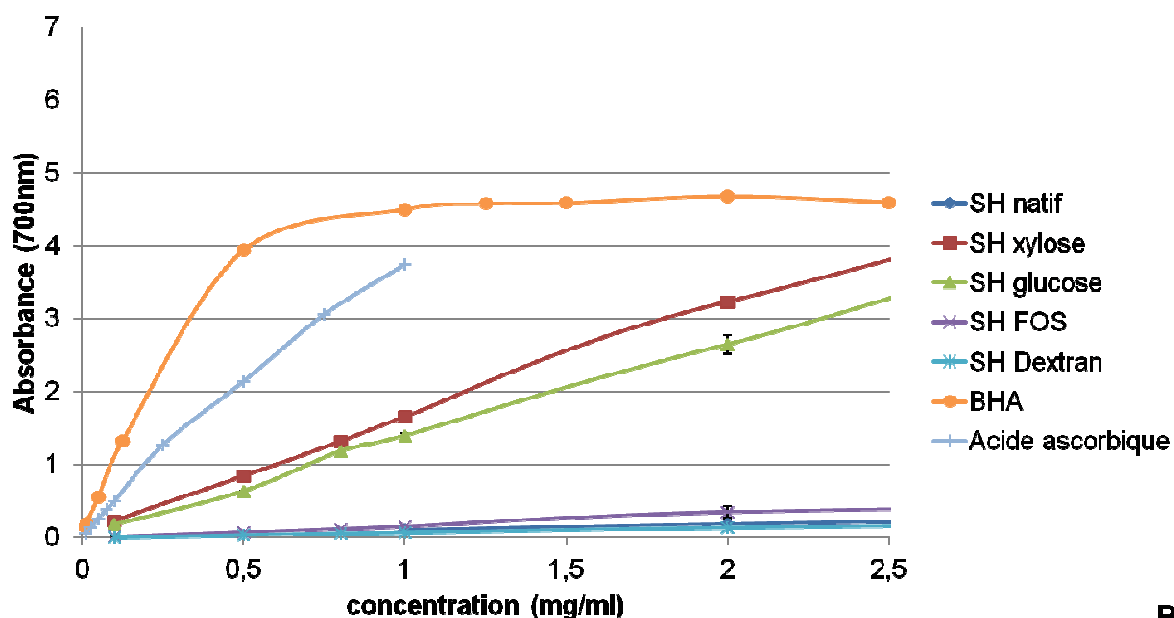
Le deuxième groupe présente une augmentation rapide de l'absorbance à 700nm suivie d'un plateau, c'est le cas de l'hydrolysate de crevette après glycation avec le Xylose et le Glucose et du caséinate de sodium glyqué avec le Xylose et le Glucose. Le plateau est atteint pour une concentration de 5mg.ml^{-1} après glycation de l'hydrolysate de crevette avec le Xylose ou le Glucose, pour une concentration de 30mg.ml^{-1} pour le caséinate glyqué avec le Xylose et pour une concentration de 20 mg.ml^{-1} dans le cas du caséinate glyqué avec le Glucose.

Enfin le troisième groupe montre une augmentation linéaire de l'absorbance avec une faible pente et dans les gammes de concentrations étudiées, le plateau n'est pas atteint. C'est le cas de l'hydrolysate de crevette natif et du caséinate natif ainsi que des échantillons glyqués avec les FOS et le Dextran.

La figure 3.60 présente un zoom de la figure 1 pour des concentrations en échantillons comprises entre 0 et 10 mg.ml^{-1} pour les échantillons issus du caséinate de sodium et entre 0 et $2,5\text{mg.ml}^{-1}$ pour les échantillons issus d'hydrolysate de crevette.



A



B

Figure 3.60 : Zoom sur le pouvoir réducteur des échantillons (caséinate A et hydrolysat de crevette B) avant et après réaction de Maillard en eau distillée avec différents glucides. Contrôles positifs : BHA et acide ascorbique.

Sur cette figure, on remarque qu'aux faibles concentrations en échantillons, les courbes obtenues pour le pouvoir réducteur sont assimilables à des droites. A partir de ces deux graphiques, les pentes à l'origine pour les différents échantillons ont été calculée.

Ainsi, la pente des courbes à l'origine est de 3,97 pour l'acide ascorbique et de 8,08 pour le BHA (groupe 1).

Pour le groupe 2, la pente à l'origine pour CS-Xyl est de 0,22, celle de CS-Glc de 0,29, celle de SH-Xyl de 1,26 et celle de SH-Glc de 1,16. On remarque, que bien que ces échantillons appartiennent au même groupe, les pentes des échantillons issus de l'hydrolysat de crevette sont supérieures à celles de ceux issus du caséinate, ce qui signifie que les échantillons issus de l'hydrolysat de crevette sont plus actifs que ceux issus du caséinate.

Enfin pour le groupe 3, les pentes à l'origine sont comprises entre 0,004 et 0,01 pour les échantillons de caséinate et entre 0,05 et 0,1 pour les échantillons d'hydrolysat de crevette.

Afin de comparer les échantillons entre eux ainsi qu'avec les contrôles positifs, nous avons déterminé la concentration nécessaire pour atteindre une absorbance égale à 0,5 : dans ce cas, plus cette grandeur est faible, et plus l'échantillon est considéré comme étant actif. Les échantillons du caséinate de sodium glyqué avec le Xylose sont aussi présentés dans le tableau 3.9, toutefois, ceux-ci ne sont pas significatifs du fait de la faible solubilité de ces composés.

Tableau 3.9. Etude comparée du pouvoir réducteur des échantillons avant et après réaction de Maillard. La concentration nécessaire pour atteindre une absorbance de 0,5 est exprimée en mg.mL⁻¹ (ed = eau distillée ; Tp = tampon phosphate).

Echantillon	fer réducteur	
	Concentration (mg/ml) pour atteindre une DO =0.5	
	RM en ed	RM en Tp
CS natif	NA	
CS Xylose	4,4 ± 0,2	1,35 ± 0,3
CS Glucose	2,5 ± 0,02	2,41 ± 0,05
CS FOS	32,1 ± 3,12	34,8 ± 2,5
CS Dextran	42,6 ± 2,45	51,1 ± 1,92
SH natif	6,87 ± 0,27	
SH Xylose	0,28 ± 0	0,31 ± 0
SH Glucose	0,4 ± 0,01	0,62 ± 0,01
SH FOS	4,48 ± 0,33	5,79 ± 0,09
SH Dextran	8,29 ± 0,18	10,89 ± 0,19
Acide ascorbique	0,1 ± 0	
BHA	0,04 ± 0	

En présence de caséinate de sodium, l'absorbance de 0,5 n'est jamais atteinte même à la concentration de 80mg.ml⁻¹. En revanche, elle est atteinte après Maillardisation du caséinate avec

tous les glucides utilisés. La glycation du caséinate par le Glucose améliore de façon importante le pouvoir réducteur. Celui-ci reste très faible dans le cas d'une glycation par le FOS ou le Dextran. L'amélioration du pouvoir réducteur reflète l'ordre de réactivité des glucides lors de la réaction de Maillard à savoir Glucose > FOS > Dextran.

Dans le cas de l'hydrolysate de crevette, on remarque que l'hydrolysate natif possède un pouvoir réducteur avant même la glycation. Après réaction de Maillard en présence de Xylose, Glucose et FOS on observe une augmentation du pouvoir réducteur et une diminution de celui-ci en présence de Dextran. Le pouvoir réducteur augmente d'un facteur 25 pour la glycation en présence de Xylose ; 17 pour celle en présence de Glucose et 1,5 pour celle en présence des FOS. La présence d'un pouvoir réducteur dans les échantillons maillardisés peut être due à la présence des composés aromatiques détectés à 294nm lors de la chromatographie d'exclusion stérique.

Toutefois que ce soit pour les caséinates glyqués ou pour les hydrolysats de crevette glyqués, les échantillons sont moins actifs que les deux contrôles positifs (BHA et acide ascorbique)

L'allure générale des courbes, à savoir une augmentation linéaire du pouvoir réducteur avec la concentration suivi de l'atteinte d'un plateau est retrouvée dans la littérature. Ainsi, lors de l'évaluation du pouvoir réducteur des produits de la réaction de Maillard issus du caséinate et Glucose, Gu *et al* (2009) observent la même allure de courbes. Toutefois, dans l'étude des protéines de plasma de porc glyquées avec du Glucose, du fructose ou du galactose, Benjakul *et al.* (2005) n'observent qu'une augmentation linéaire du pouvoir réducteur en fonction de la concentration en produits de la réaction de Maillard. Ceci peut être dû à la gamme de concentration choisie qui n'était pas assez large pour observer le plateau avec ces composés.

De par la production de composés réducteurs, notamment les composés hétérocycliques et les composés d'Amadori, la réaction de Maillard est supposée générer une augmentation de l'activité réductrice. Bien que cela se vérifie sur plusieurs modèles comme le caséinate-Glucose (Gu *et al.*, 2009), les protéines de plasma de porc et différents glucides (Benjakul *et al.*, 2005), des concentrats de protéines de lait irradiées (Chawla *et al.*, 2009), certaines études montrent un effet négatif de la réaction de Maillard sur le pouvoir réducteur. Ainsi Liu et Kitts (2011) ont montré que

la torréfaction de grains de café diminuait d'un facteur deux le pouvoir réducteur par rapport aux grains non torréfiés, cette diminution est notamment due à la diminution de la teneur en composés phénoliques après réaction de Maillard. La même tendance a été montrée par Duh *et al.* (2001) lors de la torréfaction de l'orge. La comparaison de ces études montre que la réaction de Maillard améliore le pouvoir réducteur dans le cas de protéines mais a priori pas dans le cas de systèmes plus complexes (grains d'orge ou de café).

La comparaison des valeurs de pouvoir réducteur avec la littérature peut aussi devenir complexe. En effet, bien que la majorité des études présentent leurs résultats en valeurs d'absorbances brutes, certaines expriment leurs résultats en fonction du contrôle positif comme Liu et Kitts (2011) où les résultats sont donnés en g d'acide chlorogénique (CGA) équivalent par gramme de poudre ou Wijewickreme *et al.* (1999) où les résultats sont exprimés sur la base de l'acide ascorbique à une concentration de 0,2mg.ml⁻¹. De plus, en fonction des études, le pouvoir réducteur est évalué à une concentration donnée ou sur une gamme de concentration. L'utilisation d'une concentration donnée pour tous les résultats peut masquer des différences entre échantillons notamment si la concentration choisie correspond à un pouvoir réducteur au niveau du plateau.

Le tableau 3.10 présente des valeurs de pouvoir réducteur de la littérature en fonction des conditions de réaction de Maillard.

Tableau 3.10 : Valeur de pouvoir réducteur issu de la littérature en fonction des conditions de réaction de Maillard.

auteurs	années	système	conditions de RM	pouvoir réducteur	unité
Wijewickreme <i>et al.</i>	1999	lysine + glucose/fructose /ribose	110-159°C pendant 43- 119min milieu liquide	15,35 (pour 1ml)	absorbance
Duh <i>et al.</i>	2001	orge	entre 327 - 341°C pendant 60s milieu sec	0,27 (concentration inconnue)	absorbance
Benjakul <i>et al.</i>	2005	protéines de plasma de porc + glucose/fructose/ galactose	100°C pendant 180min milieu liquide	0,1 pour 25 ml de PRM	absorbance
Gu <i>et al.</i>	2009	caséinate + glucose	102°C pendant 130 min milieu liquide	0,609 à 1mg/ml	absorbance
Chawla <i>et al.</i>	2009	concentrat de protéines de lait	0-100kGy irradiation gamma milieu liquide	0,5 pour irradiation de kGy	absorbance
Liu et kitts	2011	grain de café	210°C pendant 15min milieu sec	0,16	g CGA/g de poudre

Toutefois, on remarque que nos valeurs de pouvoir réducteur obtenu avec le caséinate et le Glucose sont différentes de celles obtenues par Gu *et al.* (2009) avec le même système. Nos valeurs sont inférieures pour les faibles concentrations ($< 5\text{mg.ml}^{-1}$) et supérieures pour des concentrations supérieures. La valeur d'absorbance correspondant au plateau atteint par le pouvoir réducteur dans l'étude de Gu *et al.* (2009) est de l'ordre de 0,7 alors que notre étude le plateau correspond à des valeurs d'absorbance de l'ordre de 6. Ces différences peuvent être dues aux conditions de réactions de Maillard ainsi qu'aux légères différences dans la réalisation du test du pouvoir réducteur.

L'activité piégeage du radical DPPH

Le test DPPH est un test antioxydant basé sur la capacité d'une substance à piéger un radical libre stable introduit dans le milieu (le DPPH^{*}). Ce test implique un transfert d'hydrogène. Même s'il ne représente aucunement ce qui se passe *in vivo*, ce test présente l'avantage d'être simple et rapide à mettre en œuvre, reproductible et fiable. De plus il est couramment utilisé dans littérature sur une grande variété de composés tels que des extraits végétaux, des composés peptidiques,... . La possibilité d'exprimer les résultats en équivalent Trolox[®] permet la comparaison avec un grand nombre d'échantillons différents et de témoins positifs.

L'activité antiradicalaire a été évaluée grâce au test au DPPH. Ce test a été effectué seulement sur les échantillons les plus actifs vis-à-vis du pouvoir réducteur, c'est-à-dire les échantillons de caséinate et d'hydrolysate de crevette glyqués avec le Xylose et le Glucose. Les échantillons natifs (sans chauffage) ont aussi été évalués et servent de témoins. Des effets doses ont été réalisés avec les différents échantillons. Les échantillons de caséinate glyqués avec le Xylose sont présentés mais l'échantillon étant très insoluble, seule l'activité de la partie soluble est évaluée entraînant une sous-estimation et des incohérences dans les données. Comme pour le pouvoir réducteur, l'activité de piégeage du radical DPPH des échantillons issus de la réaction de Maillard en présence de tampon phosphate est présenté en annexe 14.

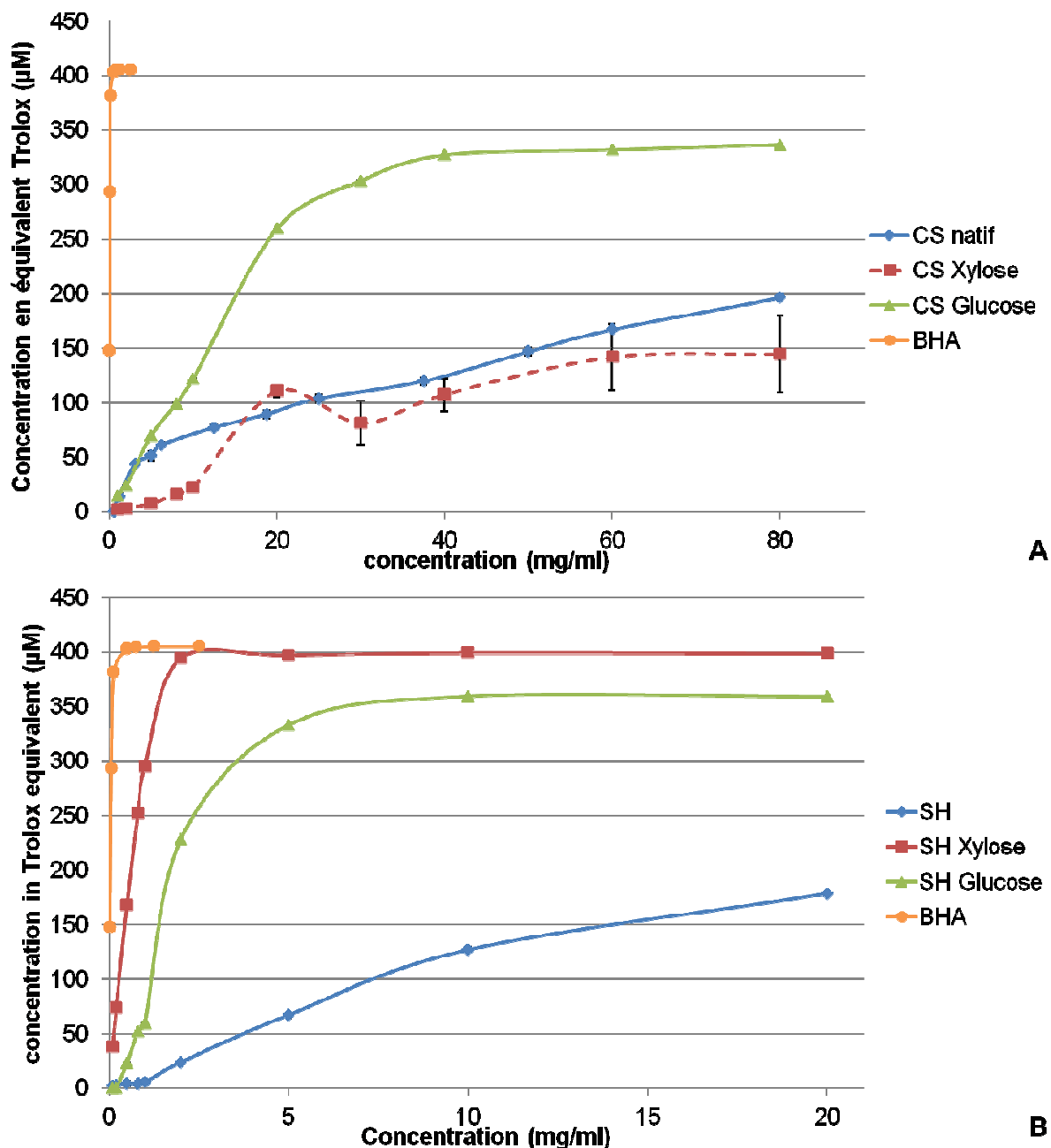


Figure 3.61 : Evaluation de l'activité piégeage du DPPH (Caséinate A et hydrolysate de crevette B) avant et après réaction de Maillard en eau distillée avec le Xylose et le Glucose. Contrôles positifs : BHA.

Comme pour le test du pouvoir réducteur, on observe trois groupes d'échantillons (figure 3.61).

Le premier groupe présente une augmentation très rapide de l'activité piégeage du DPPH suivie par un plateau atteint à partir de $0,5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour le BHA et de $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour l'échantillon SH-Xylose.

Pour le deuxième groupe, on observe une augmentation moins rapide de l'activité de piégeage du DPPH et le plateau est atteint d'une manière plus progressive à partir de 6,5mg.mL⁻¹ pour l'échantillon SH-Glucose et de 40mg.mL⁻¹ pour l'échantillon de CS-Glucose.

Enfin le troisième groupe, comprenant les échantillons natifs, correspond à une augmentation régulière mais qui suit une pente faible qui, on le suppose, tend vers un plateau qui n'est pas atteint dans les gammes de concentrations étudiées.

A partir de ces résultats, deux indicateurs ont été calculés: les concentrations (mg.mL⁻¹) nécessaires pour atteindre une activité de piégeage de 50% (AC₅₀), d'une part, et une valeur en µM équivalent Trolox®, d'autre part, pour les concentrations en échantillons de 20mg.ml⁻¹. Ces résultats sont synthétisés dans le tableau 3.11.

Tableau 3.11 : Etude comparée du piégeage du DPPH des échantillons avant et après réaction de Maillard. La concentration pour atteindre l'AC₅₀ est exprimée en mg/ml.

Echantillon	Test DPPH	
	AC 50 (mg/ml)	Valeur en µM équivalent Trolox pour une concentration de 20mg/ml
CS natif	>80	146,7
CS Xylose en ed	>80	144,8
CS Xylose en Tp	>80	154,6
CS Glucose en ed	17,5	336,1
CS glucose en Tp	18,4	324,4
SH natif	>20	178,5
SH Xylose en ed	0,42	398,7
SH Xylose en Tp	0,44	393,1
SH glucose en ed	1,16	359,2
SH Glucose en Tp	2,08	349,3
BHA	0,034	

Pour le test DPPH, l'AC₅₀ n'est pas atteinte dans le cas du caséinate de sodium natif même pour une concentration de 80mg.ml⁻¹. Après réaction de Maillard avec le Glucose, l'AC₅₀ est atteinte pour une concentration de 17,5mg.ml⁻¹ lors de la glycation en eau distillée et de

18,4mg.ml⁻¹ lors de la glycation en tampon phosphate. Toutefois la différence entre ces deux concentrations n'est pas significativement différente.

Dans le cas de l'hydrolysate de crevette natif, on remarque que dans la gamme étudiée, l'AC₅₀ n'est pas atteinte. Après glycation en eau distillée avec le Xylose et Glucose, l'AC₅₀ est atteinte pour des concentrations de 0,42mg.mL⁻¹ et 1,16 mg.mL⁻¹, respectivement. De plus la concentration nécessaire pour atteindre l'AC₅₀ avec l'hydrolysate de crevette glyqué avec Xylose est 2,7 fois supérieure à celle de l'hydrolysate de crevette glyqué avec le Glucose lorsque la réaction de Maillard se déroule en eau distillée.

Pour les valeurs d'activité de piégeage du DPPH à 20mg.ml⁻¹, on remarque que la glycation par les différents glucides dans le cas du caséinate de sodium ou de l'hydrolysate de crevette entraîne une augmentation d'un facteur 2 de cette valeur par rapport aux échantillons natifs. Néanmoins il n'y a pas de différence significative pour cette valeur après glycation de l'hydrolysate de crevette avec le Xylose ou le Glucose.

La capacité antiradicalaire semble augmenter avec la réactivité des glucides vis-à-vis de la réaction de Maillard. Néanmoins, pour les différents mélanges issus du caséinate de sodium ou de l'hydrolysate, celle-ci est inférieure à celle de la molécule de référence le BHA. La présence de tampon phosphate pendant la réaction de Maillard semble plutôt avoir un effet négatif voire pas d'effet du tout.

Il est difficile de comparer les résultats avec la littérature. En effet, bien que le test DPPH soit largement utilisé, le mode de calcul de l'activité antiradicalaire, quand il est explicité, et l'expression des résultats dépendent des auteurs. Ainsi l'activité antiradicalaire (%) peut être calculée d'au moins trois façons différentes en utilisant l'absorbance à 517nm des échantillons :

$$AAR (\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{échantillons}} - A_{\text{contrôle}}}{A_{\text{blanc}}} \right) * 100 \text{ (Gu } et al., 2009)$$

$$AAR (\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{blanc}}} \right) * 100 \text{ (Benjakul } et al., 2005)$$

$$AAR (\%) = \left(\frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \right) * 100 \text{ (Chawla } et al., 2009)$$

Néanmoins, quel que soit le mode de calcul, trois types d'informations peuvent être extraits, l'AC₅₀, l'activité antiradicalaire à une concentration en produits de la réaction de Maillard et l'effet de la concentration en produits de la réaction de Maillard sur l'activité antiradicalaire. Parmi ces méthodes de calculs, celle de Benjakul *et al.* (2005) se rapproche le plus de notre mode de calcul de l'activité antiradicalaire. En revanche celle de Gu *et al.* (2009) semble sous estimer l'activité antiradicalaire.

Dans les études où un effet dose de la concentration en produits de la réaction de Maillard sur l'activité piégeage du radical DPPH a été réalisée, on observe une augmentation de cette activité avec la concentration en produits de la réaction de Maillard. De plus, deux allures de courbes sont présentes. Dans un cas, comme dans notre étude l'activité DPPH augmente pour tendre vers un plateau. C'est le cas de l'étude de Gu *et al.* (2009) où un plateau d'activité antiradicalaire est atteint à partir d'une concentration en caséine-Glucose de 2mg.ml⁻¹. Toutefois ce plateau correspond à des valeurs d'AAR d'environ 38%.

Dans le second cas, l'activité antiradicalaire augmente linéairement avec la concentration en produits de la réaction de Maillard, c'est l'observation de Benjakul *et al.* (2005) où l'activité antiradicalaire des mélanges de protéine de plasma de porc-Fructose et protéine de plasma de porc -Galactose augmente linéairement jusqu'à des valeurs de 70% et 60% respectivement pour une concentration correspondant à de 20ml de produits de la réaction de Maillard.

Dans les cas des études utilisant une concentration fixe ou le calcul de l'AC₅₀, Jing et Kitts (2002) ont montré que la nature des glucides qui composent les produits de la réaction de Maillard détermine les propriétés antioxydantes qui en découlent. Ainsi ils montrent que les produits de la réaction de Maillard issus de la caséine + ribose présentent une faible capacité à piéger les radicaux DPPH (entre 3 et 7% d'inhibition) alors qu'aucune activité de piégeage du DPPH n'est détectée pour les produits de la réaction de Maillard issus de la caséine et du Glucose ou du fructose. Ils supposent que le caractère hydrophobe du radical DPPH n'interagit pas de manière suffisante avec les produits de la réaction de Maillard issus des mélanges caséine-glucide, plutôt hydrophiles, dans l'éthanol.

Toutefois, d'autres études montrent qu'une activité piégeage du DPPH peut être détectée de manière significative dans des mélanges protéine-glucides. Ainsi Chevalier *et al.* (2001) ont réalisé une réaction de Maillard entre la β -lactoglobuline (Blg) et différents glucides. Ils montrent qu'à une concentration de 5mg.ml⁻¹ de produits de la réaction de Maillard une activité DPPH peut

être détectée. Celle-ci est d'environ 80% pour les mélanges Blg-ribose, 60% pour le mélange Blg-arabinose et avoisine les 20% pour les mélanges Blg Glucose/galactose. Dans cette étude, l'AC₅₀ des composés a aussi été déterminée. Toutefois la gamme de concentration des produits de la réaction de Maillard utilisée, allant de 0 à 5 mg.ml⁻¹ n'était pas assez large pour calculer l'AC₅₀ de tous les composés, seuls les mélanges Blg-arabinose et Blg-ribose possèdent une AC₅₀ inférieure à 5mg.ml⁻¹.

D'une manière générale, il semble que l'augmentation de l'activité DPPH soit corrélée à l'avancée de la réaction de Maillard. Ainsi Benjakul *et al.* (2005) montrent que l'activité antiradicalaire de mélanges de protéine de plasma de porc (PPP) en présence de différents glucides augmente avec la durée de chauffage. Par exemple, l'activité antiradicalaire du mélange PPP-galactose est de 20% après 1h de chauffage à 100°C contre 70% après 5h de chauffage.

Chawla *et al.* (2009) montrent qu'en augmentant la dose d'irradiation γ , il y a une augmentation de la réaction de Maillard par diminution du nombre de groupements aminés libres et du taux de glucides réducteurs. Cette induction de la réaction de Maillard par l'augmentation de la dose de radiation entraîne aussi une augmentation de l'activité antiradicalaire mesurée.

Néanmoins les différences de mode de calcul ne nous permettent pas d'affirmer si nos produits de la réaction de Maillard en présence des différents glucides sont plus ou moins actifs que ceux de la littérature. Toutefois, nous montrons que la réaction de Maillard améliore l'activité antiradicalaire de l'hydrolysate de crevette et du caséinate de sodium. Cette amélioration est plus importante dans le cas de l'hydrolysate de crevette Maillardisé avec le Xylose. Dans ce cas, l'AC₅₀ calculée est faible (inférieur à 0,5mg/ml).

Le pouvoir chélateur

Il permet de mesurer la capacité d'une molécule à chélater différents ions métalliques. Dans notre cas, nous avons évalué la capacité à chélater le fer. En effet, le fer fait partie des métaux impliqués dans les réactions d'oxydation (effet pro-oxydant), sa chélation est donc susceptible de protéger un échantillon des réactions d'oxydation.

Les tests du pouvoir chélateur ont été réalisés sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour les tests au DPPH. De même, des effets doses ont été effectués pour tous les

échantillons. Les résultats sont exprimés en IC_{50} qui correspond à la concentration nécessaire pour avoir un pourcentage d'inhibition de 50%.

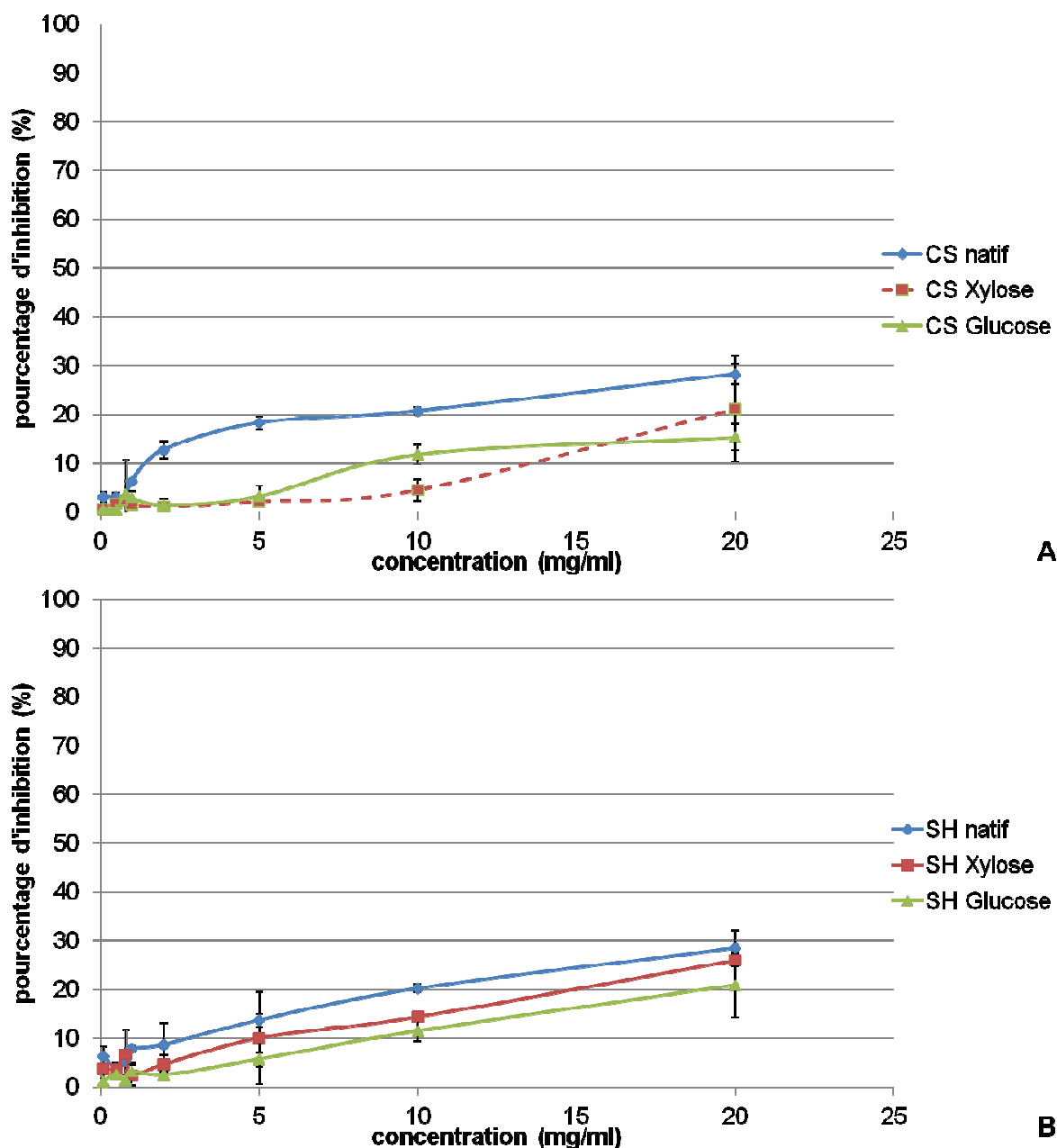


Figure 3.62 : Pouvoir chélateur (Caséinate A et hydrolysate de crevette B) avant et après réaction de Maillard en eau distillée avec le Xylose et le Glucose.

On observe que le pouvoir chélateur (figure 3.62) augmente linéairement avec la concentration en échantillon. Toutefois il n'y a pas d'impact significatif de la glycation sur le pouvoir chélateur des échantillons issus des mélanges de caséinate ou d'hydrolysate de crevette. Le pouvoir chélateur des différents échantillons est compris entre 15 et 30%.

Le test ORAC

Le test ORAC a été sous-traité auprès d'un laboratoire extérieur (*In vivo Labs*) pour toutes les sources protéiques utilisées pendant la thèse ainsi que pour les échantillons glyqués en eau distillée avec du Xylose et du Glucose.

Le test ORAC permet d'évaluer la capacité d'une substance à inhiber la dégradation oxydative d'une protéine fluorescente, la fluorescéine, provoquée sous l'action d'un composé générateur de radicaux peroxydes ROO•. Si un piègeur de radicaux peroxydes est ajouté au milieu réactionnel, la fluorescence persiste, proportionnellement à l'efficacité de l'échantillon testé. Le mécanisme mis en jeu repose ici sur un transfert d'atomes d'hydrogène (HAT) (Huang *et al.*, 2005).

Il permet une mesure globale du pouvoir antioxydant de substances pures ou en mélange comme dans les produits finis. Le test est réalisé en spectrofluorimétrie. Il consiste en une mesure de la protection exercée par une molécule donnée contre l'oxydation de la fluorescéine par un radical libre stable, l'AAPH. Il s'agit donc à proprement parler de la mesure d'un pouvoir antiradicalaire. Les résultats sont exprimés par rapport à la protection exercée par un antioxydant de référence, le Trolox qui est l'équivalent hydrosoluble de la vitamine E et ramenés par gramme du produit testé. L'avantage majeur du test ORAC est en effet de proposer une mesure standardisée et largement acceptée du pouvoir antioxydant, contrairement aux très nombreuses autres méthodes existantes.

Le tableau 3.12 présente la capacité antiradicalaire des échantillons analysés exprimée en $\mu\text{mol Te/kg}$. On observe que la réaction de Maillard augmente d'un facteur 1,4 la valeur ORAC comparativement au caséinate natif. L'effet de la RM est plus net dans le cas de l'hydrolysate de crevette, en effet après la glycation avec le Xylose la valeur ORAC augmente d'un facteur 1,7 par rapport à l'hydrolysate natif alors qu'en présence de Glucose celle-ci n'augmente que d'un facteur 1,1. Toutefois, les valeurs ORAC des échantillons glyqués restent très inférieures à celles des antioxydants de références (BHA et acide ascorbique).

Tableau 3.12 : valeurs ORAC obtenues pour le caséinate de sodium et l'hydrolysate de crevette avant ou après réaction de Maillard avec le Xylose, le Glucose.

	Valeur ORAC	Ratio
	En μmol équivalent Trolox/kg	Comparaison des sources protéiques Effet de la RM
CS natif	196 566	
CS Xylose		
CS Glucose	272 654	1,4
SH natif	352 179	1.8
SH Xylose	613 323	1,7
SH Glucose	378 025	1.1
Acide ascorbique	3 000 000	
BHA	15 000 000	

L'apport journalier, selon les nutritionnistes, est évalué entre 3000 et 5000 unités ORAC. Le tableau 3.13 présente les valeurs ORAC de quelques aliments et extraits végétaux ainsi que le positionnement de nos échantillons. La quantité nécessaire pour atteindre une valeur ORAC de 3000 a aussi été calculée.

Tableau 3.13 : valeur ORAC de quelques aliments et extraits végétaux ainsi que des composés de la réaction de Maillard (source USDA)

échantillons	Valeur ORAC en μmol Trolox/g	quantité nécessaire pour avoir 3000 unité ORAC	en g de
huile de girofle	107869	0,02	
Acide ascorbique	3000	1	poids sec
huile de thym	1596	1,8	
SH-Xylose	613,3	4,9	poids sec
SH natif	352,2	8,52	poids sec
CS-glucose	272,6	11	poids sec
CS natif	196,5	15,2	poids sec
baie de Goji	146	20,5	poids frais
pruneau	58	51,7	poids frais
ail	19	157,8	poids frais
fraises	15	200	poids frais
épinard	12	250	poids frais
bétraves	8,4	357,1	poids frais
avocat	8	375	poids frais
banane	2,1	1428,5	poids frais

Les hydrolysats de crevette maillardisés avec le Xylose présentent une forte valeur ORAC. On peut supposer que ces composés pourraient être utilisés comme complément alimentaire sous réserve qu'ils ne présentent pas de cytotoxicité. L'absorption de deux gélules (500mg) correspond à 1/10^{ème} de la valeur ORAC journalière recommandée.

Composition en acides aminés

L'hydrolysate de crevette natif possède une capacité antioxydante plus importante que le caséinate de sodium. Cette différence peut être due à la composition en acides aminés ainsi qu'à la taille des peptides qui compose l'hydrolysate. Le tableau 3.14 présente la composition en acides aminés de l'hydrolysate de crevette natif et du caséinate de sodium natif, utilisés dans cette étude.

Tableau 3.14 : répartition en acide aminé pour l'hydrolysate de crevette et le caséinate de sodium natif

	SH natif	CS natif
Acides aminés	en g/100g	en g/100g
cystine	0,44	0,34
acide aspartique	5,88	5,93
proline	3,49	9,47
méthionine	1,39	2,46
thréonine	2,44	3,6
sérine	2,44	4,62
acide glutamique	8,74	18,86
glycine	7,44	1,56
alanine	4,09	2,59
valine	2,88	5,49
isoleucine	2,69	4,34
leucine	4,25	7,75
tyrosine	1,95	4,68
phénylalanine	2,38	4,39
lysine	4,68	6,59
histidine	1,16	2,39
arginine	4,47	3,11

Globalement, on remarque que l'hydrolysate de crevette est riche en acide glutamique, glycine et acide aspartique. Dans le cas du caséinate de sodium, les acides aminés présents dans les plus grandes quantités sont l'acide glutamique, la proline, la leucine et la lysine.

Lorsque l'on compare les deux sources aminées on remarque que globalement la quantité en acides aminés est supérieure pour le caséinate de sodium que pour l'hydrolysate de crevette.

Deux acides aminés sont en quantité équivalente : la cystéine et l'acide aspartique et deux acides aminés sont en quantité plus importante dans l'hydrolysate de crevette : la glycine et l'alanine.

Toutefois, bien que cette répartition nous donne la composition en acides aminés de nos deux sources protéiques, elle ne nous renseigne pas sur les acides aminés libres dans le milieu particulièrement pour le caséinate de sodium qui est une protéine native. Ainsi, bien que le caséinate contienne une quantité plus importante d'acide aminé potentiellement antioxydant tels que la cystéine, la méthionine, la glycine ou la tyrosine, ceux-ci ne sont peut être pas libres et donc leur potentiel antioxydant est réduit.

On remarque que la glycation avec le Xylose et le Glucose possède un impact positif sur les capacités antioxydantes du caséinate et de l'hydrolysate de crevette, alors que la glycation avec les FOS et le Dextran possède un impact positif limité voire négatif. Ce faible impact des FOS et du Dextran sur l'amélioration des propriétés antioxydantes était attendu. En effet la réaction de Maillard est peu avancée avec ces deux glucides produisant ainsi peu de composés néoformés. Ces glucides ont été choisis pour leur impact potentiel sur les propriétés technofonctionnelles des sources protéiques. De plus peu d'études évaluent les propriétés antioxydantes qui peuvent découler de la glycation en présence de FOS ou de Dextran. Mesa *et al.* (2008) ont montré que la glycation de protéines de Soja avec des FOS entraîne une augmentation de l'activité antioxydante mesurée par le test ORAC et par le test des diènes conjugués. Ils montrent que cette activité antioxydante est principalement due aux produits de la caramélisation des FOS générés lors de la réaction de Maillard.

D'une manière générale, on remarque que les produits de la réaction de Maillard avec les glucides les plus réactifs lors de la réaction entraînent la production des composés présentant les activités antioxydantes les plus importantes. Une corrélation positive entre le taux de brunissement et l'activité antioxydante a été montrée par plusieurs études (Manzocco *et al.*, 2001 ; Jing et Kitts, 2002, Sumaya Martinez *et al.*, 2005). Toutefois cette corrélation peut être liée aux produits de la caramélisation des glucides lors du chauffage. En effet, Sumaya *et al.* (2005) ont montré qu'à partir d'une température de 75°C, le chauffage du ribose seul entraîne le développement de l'absorbance à 420nm. En même temps que l'apparition d'une absorbance à 420nm, une activité DPPH est détectée dans le milieu. Les auteurs supposent que c'est la production de composés issus de la caramélisation du ribose qui en est responsable. Ainsi l'augmentation de l'absorbance

et de l'activité antiradicalaire pour des composés issus de la réaction de Maillard entre le ribose et un hydrolysate de thon est due non seulement à la production de composés bruns et antiradicalaires par la réaction de Maillard mais aussi par les produits de la caramélisation du ribose. Cet effet a aussi été montré par Dong *et al.* (2012). Les auteurs ont évalué la capacité antioxydante d'un hydrolysate de Blg chauffé en présence de Glucose ainsi que celle de la Blg et du Glucose chauffé seul. Ils montrent ainsi que la capacité antiradicalaire du Glucose chauffé à 90°C seul après 18h de chauffage tend vers celle du BLG-Glucose. Ainsi ils supposent que pour la capacité de piégeage du DPPH, les produits de la caramélisation du Glucose jouent un rôle important. Le même effet est observé pour la capacité à réduire et à chélater le fer. Ainsi Dong *et al.* (2012) en concluent que les produits de la réaction de caramélisation du Glucose sont liés à l'augmentation de la capacité antioxydante globale des produits de la réaction de Maillard entre la Blg et le Glucose.

Toutefois, nous avons montrés que dans les conditions choisies pour la réaction de Maillard : milieu sec, 90mg.ml⁻¹ de glucide, chauffage pendant 48h à 50°C, il n'y avait pas de développement de coloration brune dans les échantillons (cf partie 4.2.1) et donc pas de caramélisation des différents glucides. L'activité antioxydante des différents mélanges après réaction de Maillard est donc seulement imputable à la production des nouveaux composés antioxydants lors de la réaction de Maillard.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux produits totaux de la réaction de Maillard. Or dans la partie 4.2, on montre qu'il y a un changement dans la répartition des poids moléculaires entre la source protéique native et la source protéique après glycation. On peut donc supposer que l'activité antioxydante est portée par une ou plusieurs fractions de poids moléculaires différentes. Ainsi d'après la littérature, il semble que les mécanismes de la capacité antioxydante varient en fonction du poids moléculaire de la fraction étudiée. Gu *et al.* (2009) ont montré qu'après fractionnement, selon leur poids moléculaire, des produits de la réaction de Maillard issus du caséinate et du Glucose, alors que pour le pouvoir réducteur il semble ne pas y avoir d'influence de la taille des produits de la réaction de Maillard, un effet marqué est observé pour la capacité à chélater le fer et dans l'activité de piégeage du DPPH. Les PRM issus du caséinate et du Glucose de poids moléculaire supérieur à 30kDa semblent être responsables de l'activité chélatrice alors que ceux de poids moléculaire inférieur à 30kDa semblent être liés à

l'activité DPPH. Lors de l'évaluation des mélanges totaux, c'est-à-dire sans fractionnement, les trois activités sont présentes et un effet dose est observé.

Synthèse :

La glycation avec les glucides les plus réactifs (Xylose et Glucose) s'accompagne du développement d'une capacité antioxydante.

Les composés issus de la glycation de l'hydrolysate de crevette présentent des capacités antioxydantes supérieures à celles des composés issus de la glycation du caséinate.

3.4.2 Influence du poids moléculaire de la source protéique

Nous avons démontré que l'hydrolysate de crevette possédait une capacité antioxydante supérieure à celle du caséinate de crevette. De plus plusieurs auteurs ont montré que l'hydrolyse enzymatique des protéines peut améliorer à la fois la solubilité des protéines (Klompong *et al.*, 2007 ; Nanilanon *et al.*, 2011) et leurs propriétés antioxydantes (Srinivas et Prakash, 2010). Il a donc été envisagé d'hydrolyser la protéine de référence afin de voir l'impact de la taille de la source protéique d'une part sur la réaction de Maillard et d'autre part sur les propriétés fonctionnelles et biologiques.

La glycation des hydrolysats de caséinate a été réalisée avec le Xylose et le Dextran pour deux raisons. La première est liée à la réactivité des glucides, en effet dans la partie 4.2.1, nous avons montré que dans les conditions de réaction de Maillard utilisée, le Xylose est le glucide le plus réactif et le Dextran le moins réactif. La seconde est liée aux propriétés fonctionnelles développées au cours de la réaction de Maillard. En effet, dans la partie 4.3.3.1, nous avons montré que dans le cas du caséinate de sodium c'est la glycation en présence de Dextran qui entraîne une amélioration des propriétés antioxydantes et dans le cas de l'hydrolysate de crevette, c'est la glycation en présence de Xylose qui entraîne une amélioration des propriétés fonctionnelles. Dans cette partie, l'impact de l'hydrolyse enzymatique du caséinate de sodium suivie ou non par une glycation sur les propriétés antioxydante est exploré.

Pouvoir réducteur

La figure 3.63 présente le pouvoir réducteur des hydrolysats de caséinate hydrolysés avant et après réaction de Maillard.

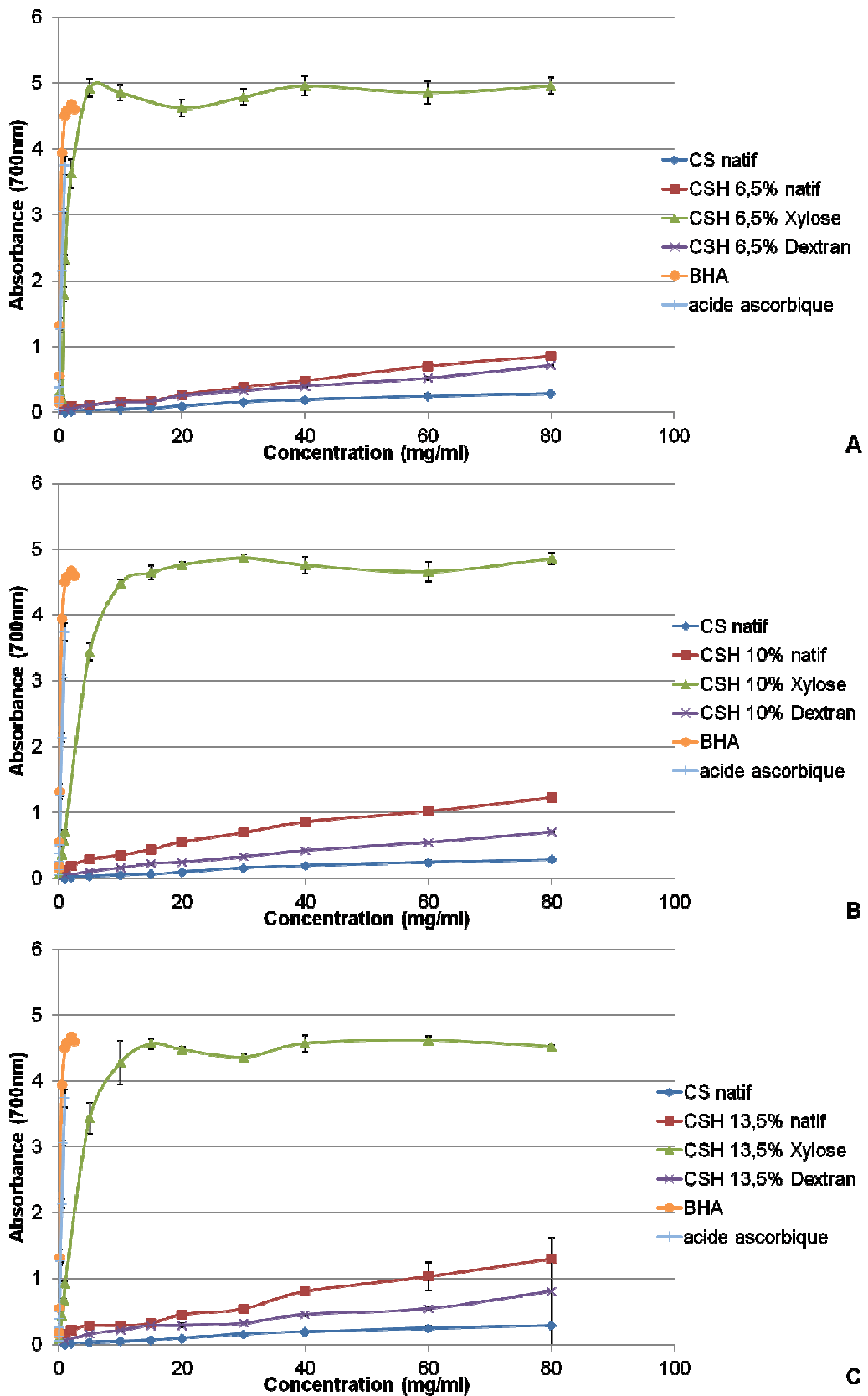


Figure 3.63 : Evaluation du pouvoir réducteur des échantillons de caséinate hydrolysé (DH = 6.5% A, DH = 10% B et DH = 13.5% C) avant et après réaction de Maillard en eau distillée avec le Xylose et le Dextran. Contrôles positifs : BHA et acide ascorbique.

Les trois groupes d'échantillons observés pour le caséinate et l'hydrolysate de crevette sont retrouvés avec les mêmes caractéristiques dans le cas des hydrolysats de caséinate glyqués avec le Xylose ou le Dextran.

Les contrôles positifs, acide ascorbique et BHA constituent le premier groupe. Les échantillons glyqués avec le Xylose le second et les hydrolysats de caséinate natif ou glyqués avec le Dextran le troisième.

Activité piégeage du radical DPPH

Comme dans la partie 3.3.1, seuls les composés natifs et les composés issus de la réaction de Maillard avec le Xylose ont été évalués pour leur capacité à piéger le radical DPPH (figure 3.64).

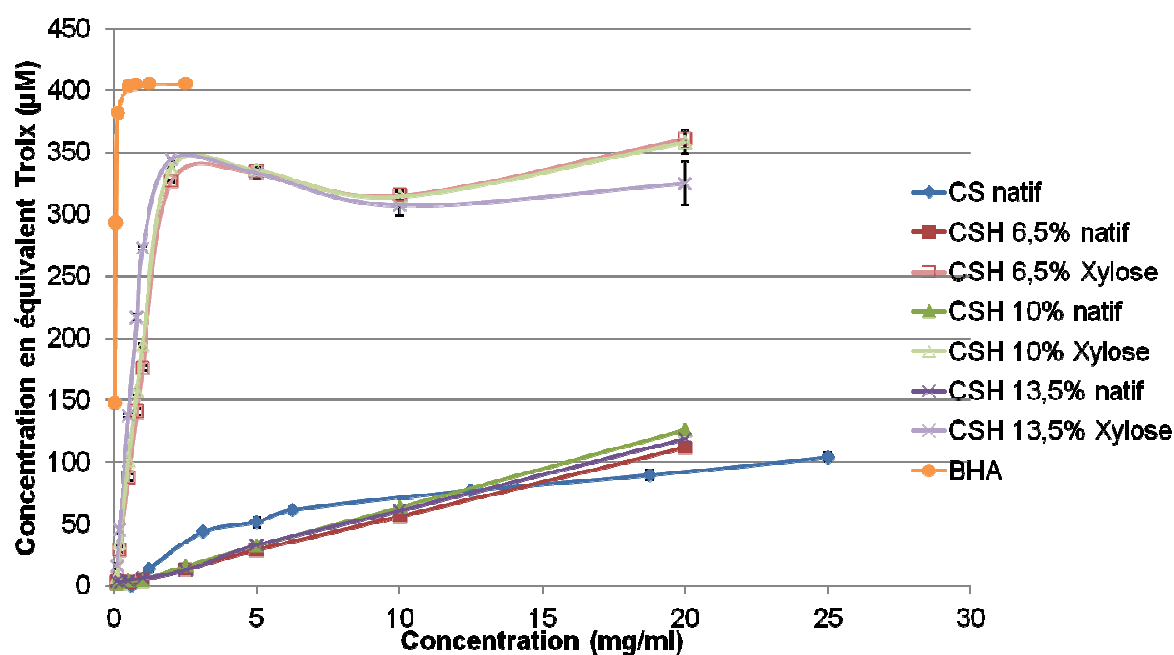


Figure 3.64 : Activité piégeage du radical DPPH pour les caséinate hydrolysés avant et après réaction de Maillard avec le Xylose en eau distillée. Contrôle : BHA

Les trois groupes d'échantillons observés pour le caséinate et l'hydrolysate de crevette sont retrouvés avec les mêmes caractéristiques dans le cas des hydrolysats de caséinate glyqués avec le Xylose ou le Dextran.

Lorsque l'on compare les échantillons de caséinate hydrolysé avec le caséinate natif, on remarque qu'il n'y a pas de différences significatives dans la capacité à piéger le radical DPPH.

Par contre, après glycation avec le Xylose des caséinates hydrolysés, on observe une augmentation rapide de la capacité à piéger le DPPH suivie par l'atteinte d'un plateau à partir d'une concentration de 2mg.ml⁻¹. A partir de ces courbes il ne semble pas y avoir de différences significatives entre les différents échantillons maillardisés.

Pouvoir chélateur

Le pouvoir chélateur du caséinate hydrolysé natif et après glycation avec le Xylose a été évalué. La figure 3.65 présente les courbes du pouvoir chélateur en fonction de la concentration en échantillons.

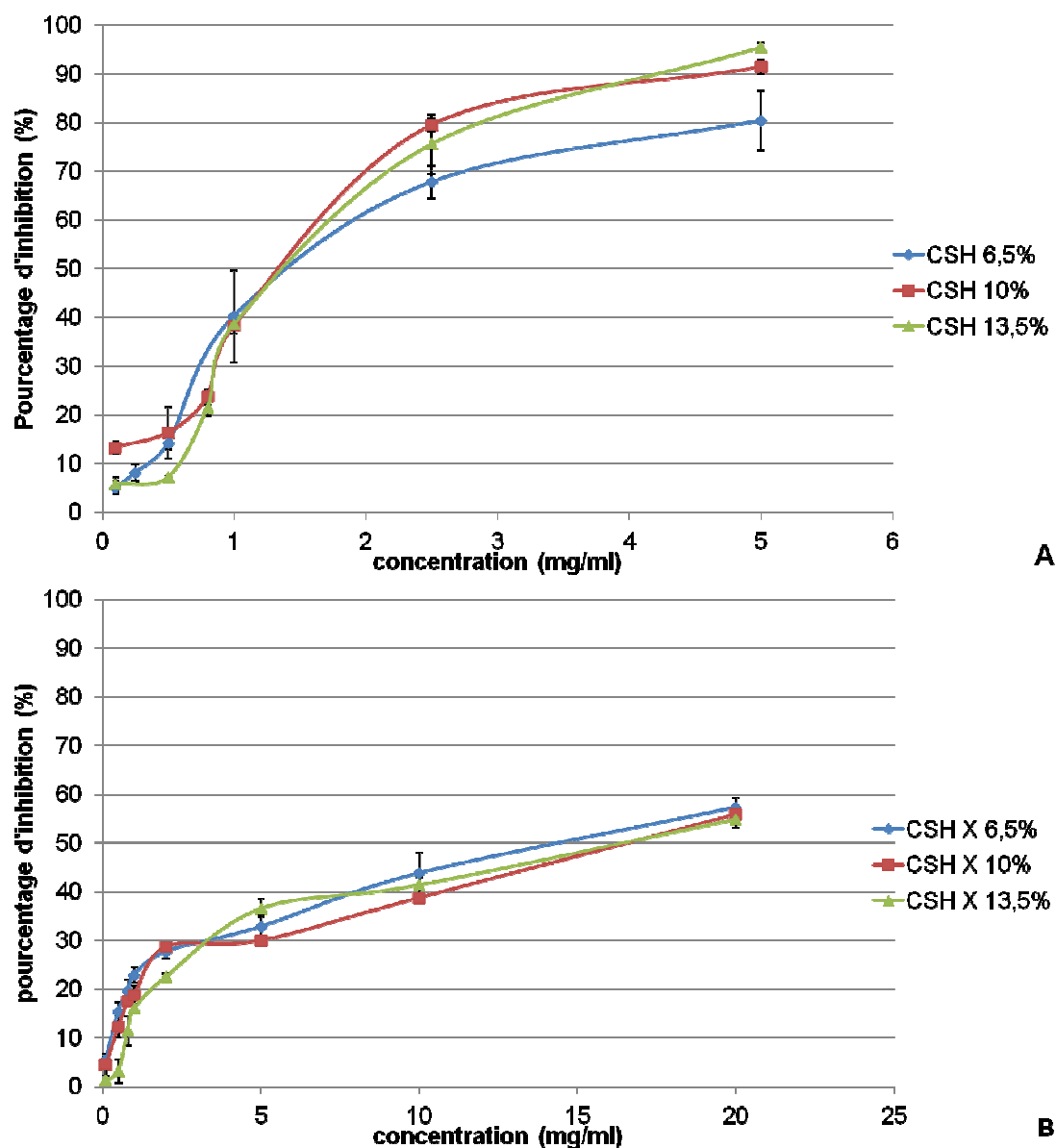


Figure 3.65 : Evolution du pouvoir chélateur des caséinate hydrolysés avant réaction de Maillard (A) et après réaction de Maillard avec le Xylose (B)

Deux allures de courbes sont observées. Le premier correspond aux échantillons de caséinates hydrolysés avant glycation, les courbes ont une allure sigmoïdales. Le pouvoir chélateur augmente progressivement avec la concentration pour ensuite ralentir et tendre vers une chélation de 100%. Le ralentissement apparaît à partir de $2,5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour les trois degrés d'hydrolyse.

Dans le cas des échantillons de caséinate hydrolysés après glycation, on observe une augmentation rapide du pouvoir chélateur entre 0 et $2,5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ suivi d'une augmentation plus progressive.

Il semble que dans ce cas, la réaction de Maillard a un impact négatif sur le pouvoir chélateur. En effet avant glycation, le pouvoir chélateur des hydrolysats de caséinate pour une concentration de $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ est compris entre 80 et 95%, alors qu'après réaction de Maillard avec le Xylose celui-ci est compris entre 30 et 40% à la même concentration.

Valeur ORAC

La figure 3.66 présente l'impact du degré d'hydrolyse avant ou après glycation avec le Xylose sur la valeur ORAC des échantillons. On remarque qu'avant glycation, la valeur ORAC augmente presque linéairement avec le degré d'hydrolyse. Ainsi, la valeur ORAC augmente proportionnellement avec l'hydrolyse du caséinate d'un facteur 1,5 pour un DH de 6,5% ; de 2,7 pour un DH de 10% et de 3,4 pour un DH de 13,5%.

Lorsque l'on compare les échantillons avant et après glycation, on remarque que l'augmentation de la valeur ORAC par glycation diminue avec le degré d'hydrolyse. Ainsi, la valeur ORAC augmente d'un facteur 1,7 lors de la glycation de CSH 6.5% avec le Xylose, d'un facteur 1,1 lors de la glycation CSH 10% avec le Xylose et une diminution de la valeur ORAC d'un facteur 0,9 est observé pour CSH 13.5% après glycation avec le Xylose.

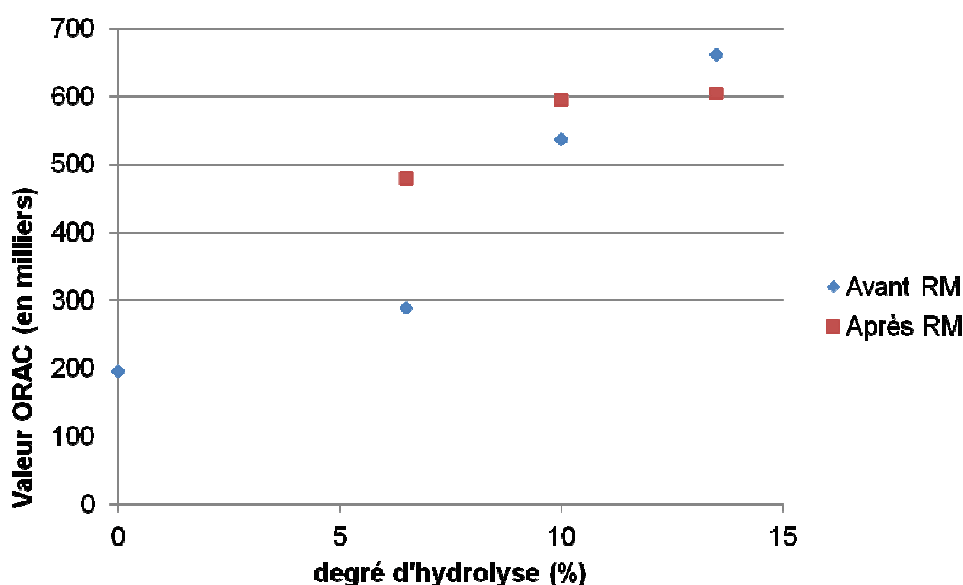


Figure 3.66 : Effet du DH sur la valeur ORAC des caséinates hydrolysé avant et après glycation avec le Xylose.

Le tableau 3.15 présente une synthèse des différents résultats observés pour les capacités antioxydantes des hydrolysats de caséinates avant et après glycation par le Xylose ou le Dextran.

Tableau 3.15 : Evaluation de la capacité antioxydante des solutions de caséinate hydrolysées par l'Alcalase® 2,4L avant ou après réaction de Maillard. Les degrés d'hydrolyse varient de 6,5 à 13,5%. Les sucres utilisés pour la glycation sont le Xylose et le Dextran.

Echantillon	Valeur ORAC μM équivalent Trolox /kg	fer réducteur Concentration (mg/ml) pour atteindre une DO =0,5	test DPPH		PV chélateur IC 50 (mg/ml)
			AC ₅₀ (mg/ml)	valeur à 20mg/ml (μM équivalent Trolox)	
CS natif	196566	NA	na	146,8	na
CSH 6,5% natif	289527	64,2	36,7	236,1	1,32
CSH 6,5% Xyl	480186	0,58	1,18	360,9	13,97
CSH 6,5% Dex		56,9			
CSH 10% natif	537579	62,8	30,9	281,5	1,42
CSH 10% Xyl	595483	0,69	1,11	357,9	16,5
CSH 10% Dex		51,95			
CSH 13,5% natif	661398	61,8	27,4	320,2	1,38
CSH 13,5% Xyl	605317	0,58	0,8	324,9	16,47
CSH 13,5% Dex		51,07			
Acide ascorbique	3 000 000	0,1			
BHA	15 000 000	0,04	0,034		

Lorsque l'on compare le pouvoir réducteur, le test DPPH et le pouvoir chélateur du caséinate natif et des trois hydrolysats de caséinate, on remarque que l'hydrolyse du caséinate de sodium suivie d'une glycation par le Xylose améliore les propriétés antiradicalaires. La meilleure activité de piégeage du radical DPPH ($AC_{50}=0,8$) est obtenue pour un DH de 13,5%.

Lorsque l'hydrolyse est suivie d'une glycation avec le Xylose, on observe une amélioration de la valeur ORAC, du pouvoir réducteur, de l'activité antiradicalaire (test DPPH) et du pouvoir chélateur du fer. On observe une diminution de la concentration d'un facteur 90 pour le pouvoir réducteur, d'un facteur 30 dans le test DPPH et d'un facteur 15 dans le cas du pouvoir chélateur. Cette diminution est moins marquée pour le test ORAC où dans le cas du caséinate hydrolysé avec un DH de 13,5% on observe une diminution de la valeur ORAC après glycation avec le Xylose.

Après glycation avec le Dextran, on observe une légère amélioration du pouvoir réducteur puisque la concentration nécessaire pour atteindre une valeur de pouvoir réducteur de 0,5 diminue d'un facteur 1,2 entre les caséinates hydrolysés natifs et les caséinates hydrolysés glyqués avec le Dextran.

La présence de tampon phosphate lors de la réaction de Maillard semble avoir soit un impact neutre soit un impact négatif sur le pouvoir réducteur selon les mélanges réactionnels.

L'effet bénéfique de l'hydrolyse enzymatique sur les propriétés antioxydantes a été démontré par différents auteurs sur différents substrats tels que la caséine (Srinivas et Prakash, 2010) ; des protéines muscle de poisson (Klompong *et al.*, 2007 ; Nalinanon *et al.*, 2011) ou de la gélatine de poisson (Yang *et al.*, 2008). Wu *et al.* (2003) justifient les variations de l'activité antioxydante par des changements de taille et de composition en acides aminés et peptides de petites tailles produits au cours de l'hydrolyse

Dans le cas des protéines de lait, Srinivas et Prakash (2010) ont montré que l'hydrolyse de l' α -caséine par la chymotrypsine avec l'atteinte d'un DH de 4.6%, libère des peptides ayant une activité antiradicalaire et chélatrice du zinc. Cette activité est liée aux peptides libérés par l'enzyme, en effet la chymotrypsine a été sélectionnée pour sa capacité à hydrolyser les liaisons peptidiques avec un acide aminé aromatique ou hydrophobe. La capacité à piéger le radical DPPH et à chélater le zinc a été évaluée. Pour ces deux tests, les AC_{50} ont été calculées et

comparées à un contrôle. Ainsi, la valeur d'AC₅₀ obtenue pour l'activité antiradicalaire est de 1,25mg.ml⁻¹. Cette valeur d'AC₅₀ est supérieure à celles obtenues dans notre étude pour les trois hydrolysats de caséinate de sodium. Toutefois, bien que le mode de calcul de l'activité piégeage du DPPH ne soit pas détaillé, on peut supposer que nos hydrolysats sont moins actifs car la concentration pour atteindre l'AC₅₀ est multipliée par 30. Cette différence d'activité peut être due à différents paramètres. Premièrement la taille des peptides, en effet la majorité des peptides bioactifs d'hydrolysats laitier identifiés contiennent entre 5 et 11 acides aminés soit un poids moléculaire compris entre 0,7 et 1,5kDa (Pihlanto, 2006). Deuxièmement l'enzyme utilisée lors de l'hydrolyse permet une spécificité plus ou moins importante des sites de coupures entraînant la libération potentielle d'acides aminés antioxydants. Enfin, des interactions entre peptides peuvent avoir lieu entraînant des différences dans les activités antiradicalaires.

Kim *et al.* (2007a) ont montré quant à eux que les caséinophosphopeptides (CPP), issus de l'hydrolyse du caséinate par l'Alcalase®, présentent une forte activité antioxydante et réductrice. Ces activités sont dépendantes du pH utilisés lors de la précipitation des CPP. Les CPP présentent une augmentation de la capacité à piéger les radicaux peroxydes ainsi que de la capacité à réduire le cuivre avec la diminution du pH utilisé lors de la précipitation. L'effet inverse c'est à dire une augmentation de la capacité à piéger les radicaux hydroxyles ainsi que de la chélation des métaux est observé avec l'augmentation du pH de précipitation. Ainsi, les conditions de fabrication des CPP ont un impact sur les activités et les mécanismes antioxydants des produits.

L'activité antioxydante dépend notamment des protéases et des conditions d'hydrolyse. Klompong *et al.* (2007) ont montré que l'hydrolyse des protéines de Selar (*Selaroides leptolepis*) avec deux enzymes différentes entraîne des changements dans les activités antiradicalaires. Ainsi dans le cas du piégeage du radical DPPH, un degré d'hydrolyse de 5% obtenu avec l'Alcalase montre une activité plus forte que les autres hydrolysats alors que dans le cas du pouvoir réducteur, une baisse d'activité est observée pour un degré d'hydrolyse de 25% obtenu avec la préparation enzymatique Flavourzyme. Néanmoins ils observent que quelle que soit l'enzyme utilisée pour l'hydrolyse des protéines de Selar, le pouvoir chélateur augmente avec le degré d'hydrolyse. Des résultats similaires ont été trouvés par Nalinanon *et al.* (2011) avec des hydrolysats de muscle de Brème (*Nemopterus hexodon*). Les auteurs observent une

augmentation de l'activité chélatrice du fer avec l'augmentation du DH. Le degré d'hydrolyse a un impact sur les activités antiradicalaires, les auteurs ont observé une augmentation suivie d'une diminution des activités piégeage des radicaux peroxydes (test ABTS) et du radical DPPH. Ainsi les hydrolysats ayant un DH de 20% présentent les plus fortes activités antiradicalaires par rapport aux hydrolysats de DH 10% et 30%. La différence entre les modes d'actions des différents hydrolysats peut être due à la répartition en taille et à la séquence en acides aminés des peptides produits.

Yang *et al.* (2008) ont étudié les hydrolysats de gélatine de Cobia (*Rachycentron canadum*) après une ou deux hydrolyses enzymatiques. Ils montrent que quelle que soit l'enzyme utilisée et la durée d'hydrolyse pour la seconde hydrolyse, il n'y a pas de différence significative entre les enzymes pour l'activité piégeage du radical DPPH des seconds hydrolysats. De plus, cette activité DPPH à 10mg.ml⁻¹ est proche de celle du premier hydrolysat de Cobia. Ils supposent que la première hydrolyse produit la majorité des composés ayant une activité antiradicalaire qui serait portée par les fractions inférieures à 6,5kDa. Dans le cas où les échantillons sont filtrés sur une membrane dont le seuil de coupure est à 3kDa, ils observent des différences significatives dans l'activité antiradicalaire. Ainsi pour le premier hydrolysat, une augmentation de 10% de l'activité antiradicalaire est observée après ultrafiltration. De plus, après filtration des seconds hydrolysats, une augmentation de l'activité DPPH comprise entre 20 et 40% est observée par rapport aux hydrolysats non filtrés. Une différence entre les enzymes utilisées est alors observable. L'hydrolyse par la papaine augmente l'activité piégeage du DPPH de 40% par rapport aux échantillons non filtrés alors que lors de l'hydrolyse par la bromélaïne cette augmentation n'est que de 20%. Les profils peptidiques des ultrafiltrats montrent que la majorité des peptides ont des poids moléculaires inférieurs à 700Da. Les auteurs supposent que c'est cette fraction qui joue un rôle majoritaire dans l'activité globale des hydrolysats.

Lorsque l'on applique une réaction de Maillard sur un hydrolysat protéique, les différences d'activités antioxydantes des hydrolysats glyqués vont être dépendantes à la fois du glucide utilisé et des acides aminés présents dans le milieu. Ainsi Hwang *et al.* (2011) ont mesuré l'activité antioxydante de différents mélanges d'acides aminés et de Glucose ou de fructose. Hwang *et al.* (2011) montrent que l'activité antiradicalaire mesurée à l'aide du test au DPPH est supérieure pour les produits de la réaction de Maillard issus des mélanges avec le fructose par rapport aux

mélanges issus du Glucose. Les produits de la réaction de Maillard issus des mélanges fructose alanine, tryptophane, asparagine tyrosine et cystéine possèdent des activités piégeage du DPPH supérieures aux autres mélanges. Toutefois le mélange cystéine-fructose ou cystéine-Glucose montre les plus hauts taux d'activité et ce même avant la réaction de Maillard. Cet effet avait déjà été rapporté par Maillard *et al.* (2007) où le mélange Glucose-cystéine présentait l'activité DPPH la plus élevée parmi les différents mélanges constitués de Glucose et d'acides aminés. Les auteurs suggèrent que cette activité de piégeage du DPPH serait liée aux groupements sulfhydryles de la cystéine. Dans notre cas, lorsque l'on regarde la composition en acides aminés totaux du caséinate natif du caséinate hydrolysé (DH 13.5%) après glycation avec le Xylose (cf tableau 3.16), on remarque que les échantillons possèdent une faible concentration en cystéine, et une forte concentration en acide glutamique, proline et en leucine.

Tableau 3.16 : répartition en acides aminés totaux du caséinate natif et de l'hydrolysate de caséinate (DH 13.5%) glyqués avec le Xylose.

	CS natif	CSH 13,5% Xylose
acides aminés	en g/100g	g/100g
cystine	0,34	0,19
acide aspartique	5,93	2,69
proline	9,47	5,16
méthionine	2,46	1,09
thréonine	3,6	1,76
sérine	4,62	2,16
acide glutamique	18,86	9,73
glycine	1,56	0,67
alanine	2,59	1,13
valine	5,49	2,8
isoleucine	4,34	2,17
leucine	7,75	3,99
tyrosine	4,68	2,04
phénylalanine	4,39	2,24
lysine	6,59	0,54
histidine	2,39	0,53
arginine	3,11	0,77

On remarque que quelle que soit la concentration en acides aminés du caséinate de sodium natif, celle-ci diminue d'environ un facteur 2 après la réaction de Maillard. Lors de l'évaluation des groupements aminés libres des caséinates hydrolysés (partie 3.2.2.2) avant et après réaction de Maillard, une diminution d'un facteur 2 des groupements aminés libres après réaction de Maillard a été mesurée pour l'échantillon CSH 13.5% Xylose (RM en eau distillée).

La longueur de la chaîne peptidique joue également un rôle important dans l'apparition de propriétés antioxydantes. Cet effet a été montré dans l'étude de Kim et Lee (2009a) impliquant une réaction de Maillard entre le Glucose et la glycine, la diglycine ou la triglycine. Les auteurs ont mesuré la capacité antioxydante à l'aide de différents tests. Les PRM issus du modèle Glucose-diglycine montrent les plus fortes activités chélatrices du fer et du DPPH; le modèle Glucose-glycine présente les plus faibles activités pour tous les tests. Le modèle Glucose-triglycine montre quant à lui des activités proches du modèle Glucose-diglycine. Il en ressort que l'activité antioxydante est à la fois liée à la taille de la chaîne peptidique et à la stabilité thermique des liaisons peptidiques. En effet au cours du chauffage, il y a une hydrolyse partielle des peptides dans les modèles contenant de la diglycine et de la triglycine. Cet impact de la taille des peptides lors de la réaction de Maillard a été évalué par Su *et al.* (2011) sur un hydrolysât de cacahuète. Ces auteurs ont réalisé une réaction de Maillard entre l'hydrolysât de cacahuète et le Glucose ainsi qu'entre les différentes fractions de cet hydrolysât et le Glucose. Les fractions peptidiques qui possèdent les plus fortes valeurs ORAC : 880 μmol équivalent Trolox/g et 772 μmol équivalent Trolox/g sont les fractions de poids moléculaire compris entre 1 et 3kDa (IV) et inférieurs à 1kDa (V) respectivement. Après réaction de Maillard avec le Glucose on observe une augmentation de la valeur ORAC est ce quelle que soit la fraction peptidique. Les fractions qui consomment le plus de Glucose lors de la réaction de Maillard sont les fractions IV et V. La fraction V est celle qui montre la plus grande augmentation de la valeur ORAC après glycation (25 %).

Synthèse :

L'hydrolyse enzymatique du caséinate de sodium par l'Alcalase libère des peptides dotés de capacités antioxydantes, notamment des peptides ayant la capacité de chélater le fer. La chromatographie d'exclusion de taille a montré que plus cette hydrolyse est poussée, plus il y a un enrichissement du milieu en peptides de poids moléculaire inférieur à 1kDa, on peut donc supposer que c'est cette fraction qui possède une partie de l'activité antioxydante, néanmoins cette hypothèse n'a pas été vérifiée.

L'impact de la glycation sur la capacité antioxydante, est, comme pour les protéines natives, plus marqué en présence de Xylose qu'en présence de Dextran. Toutefois, la capacité à chélater le fer diminue avec la glycation. On peut donc supposer que la glycation modifie les sites de fixation du fer dans les peptides notamment par les liaisons entre les glucides et les acides aminés.

3.4.3 Influence de la concentration en glucide

Lors de la réaction de Maillard nous avons montré que la concentration en Xylose utilisée ($90\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) était un facteur limitant de la réaction. L'augmentation de cette concentration entraîne une glycation plus importante. Or les produits de la réaction de Maillard issus des différents mélanges avec le Xylose ont montré les capacités antioxydantes les plus importantes, on peut donc supposer qu'une augmentation de la glycation de l'hydrolysate de crevette en présence de Xylose pourrait entraîner une augmentation de la capacité antioxydante des hydrolysats glyqués. Ainsi l'effet de la concentration en Xylose lors de la réaction de Maillard avec un hydrolysate de crevette sur la capacité antioxydante a été évalué.

Fer réducteur

La figure 3.67 présente l'impact de la concentration en hydrolysate de crevette avant et après glycation en eau distillée avec trois concentrations en glucides sur le pouvoir réducteur. L'impact de la glycation en présence de tampon phosphate sur le pouvoir réducteur est présenté en annexe 15.

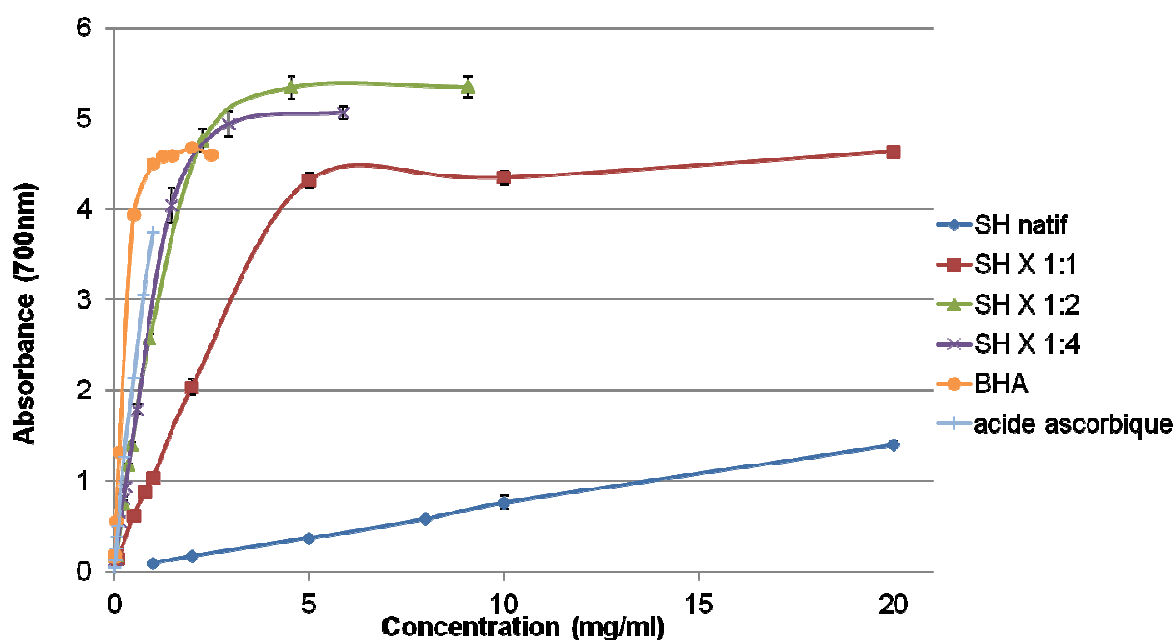


Figure 3.67 : Evaluation du pouvoir réducteur des échantillons de d'hydrolysate de crevette avant et après réaction de Maillard en eau distillée avec trois concentrations en Xylose. Contrôles positifs : BHA et acide ascorbique.

On remarque que l'augmentation de la concentration en Xylose d'un facteur 2 (SH X 1 :2) ou d'un facteur 4 (SH X 1 :4) entraîne une augmentation plus rapide du pouvoir réducteur par

rapport à celle de l'échantillon SH X 1 :1. Les pentes à l'origine de ces deux échantillons sont du même ordre de grandeur que celle de l'acide ascorbique.

Activité piégeage du DPPH

La figure 3.68 présente l'évolution de l'activité piégeage du DPPH en fonction de la concentration en PRM pour l'hydrolysate de crevette glyqué avec trois concentrations de Xylose différentes. L'impact de la présence de tampon phosphate lors de la RM sur l'évolution de l'activité piégeage du DPPH est présenté en annexe 16.

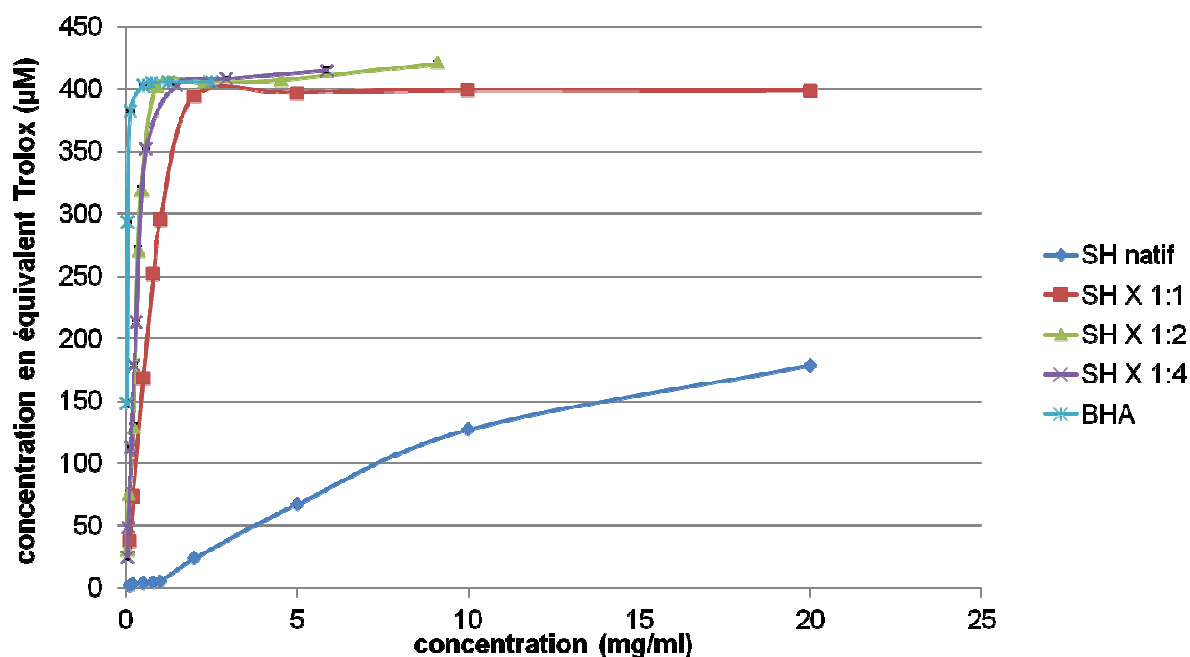


Figure 3.68 : Evolution de l'activité piégeage du radical DPPH pour l'hydrolysate de crevette natifs ou glyqués en eau distillée avec trois concentrations en Xylose

On remarque que les échantillons SH X 1 :1 ; SH X 1 :2 et SH X 1 :4 présente une augmentation rapide de l'activité antiradicalaire suivi d'un plateau d'activité. Leur comportement est similaire à celui du BHA.

Tableau 3.17 : synthèse des résultats de la capacité antioxydante pour l'hydrolysate de crevette avant ou après réaction de Maillard avec différentes concentrations en Xylose Les réactions de glycation ont été conduites en eau distillée ou dans du tampon phosphate. Contrôles positifs: acide ascorbique et BHA.

Echantillon	fer réducteur Concentration (mg/ml) pour atteindre une DO =0,5	test DPPH	
		AC 50 (mg/ml)	valeur à 20 mg/ml ($\mu\text{mol Te}$)
SH natif	6,87	>20	178,5
SHX 1:1	0,25	0,41	398,7
SHX 1:2	0,15	0,31	419,3
SHX 1:4	0,13	0,3	414,9
Acide ascorbique	0,1		
BHA	0,04	0,034	

Lorsque l'on compare les concentrations pour obtenir un pouvoir réducteur de 0,5 ou l'AC₅₀ dans le cas du test DPPH, on remarque que plus la concentration en Xylose est importante lors de la réaction de Maillard, plus l'échantillon est réactif (tableau 3.17).

Néanmoins, doubler (SHX 1:2) ou quadrupler (SHX 1:4) la concentration initiale en Xylose ne semble pas avoir d'impact significatif sur le pouvoir réducteur et le test DPPH mesuré à l'issue des réactions de glycation. Augmenter la concentration en Xylose d'un facteur 2 revient à diminuer d'un facteur 1,5 la concentration nécessaire pour obtenir un pouvoir réducteur de 0,5 ou atteindre l'AC₅₀ dans le test DPPH.

Tout comme pour les autres conditions de réaction de Maillard, on n'observe pas d'impact marqué du tampon phosphate sur le pouvoir réducteur lorsque l'on augmente la concentration en Xylose lors de la réaction.

Peu d'études ont exploré l'impact de la concentration en glucide lors de la réaction de Maillard sur les propriétés antioxydante des PRM.

Toutefois Sumaya *et al* (2005) ont montré que l'activité piégeage du DPPH augmente avec la concentration en glucide pour atteindre ensuite un plateau, lors de la réaction de Maillard entre des protéines de thon et le ribose en milieu liquide. Ce plateau est atteint à 30mg.ml⁻¹ de ribose. Cette concentration semble être liée au brunissement. De plus Benjakul *et al.* (2005) qui ont

réalisée une réaction de Maillard en milieu liquide entre des protéines de plasma de porc et trois glucides montrent que l'augmentation de la concentration en glucide d'un facteur 2 entraîne une augmentation du pouvoir réducteur et de l'activité piégeage du radical DPPH des produits de la réaction de Maillard.

Dans notre étude où la réaction de Maillard se déroule en milieu sec, on observe bien une augmentation du pouvoir réducteur et de l'activité piégeage du DPPH avec l'augmentation de la concentration en glucide lors de la réaction de Maillard. Il semble, néanmoins, qu'il faille une concentration de $180\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ en Xylose pour observer cet effet de plateau dans l'activité de piégeage du DPPH ainsi que pour le pouvoir réducteur

Ainsi, l'augmentation de la concentration en Xylose lors de la réaction de Maillard améliore la capacité antioxydante des produits de la réaction de Maillard. Toutefois, l'augmentation de la capacité antioxydante semble atteindre un plateau à partir d'une concentration de $180\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (ratio 1 : 2) Cet effet est peut être corrélé au taux de glycation. En effet lors de la détermination de la mobilisation des fonctions aminées libres, un ralentissement a été observé à partir de $180\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

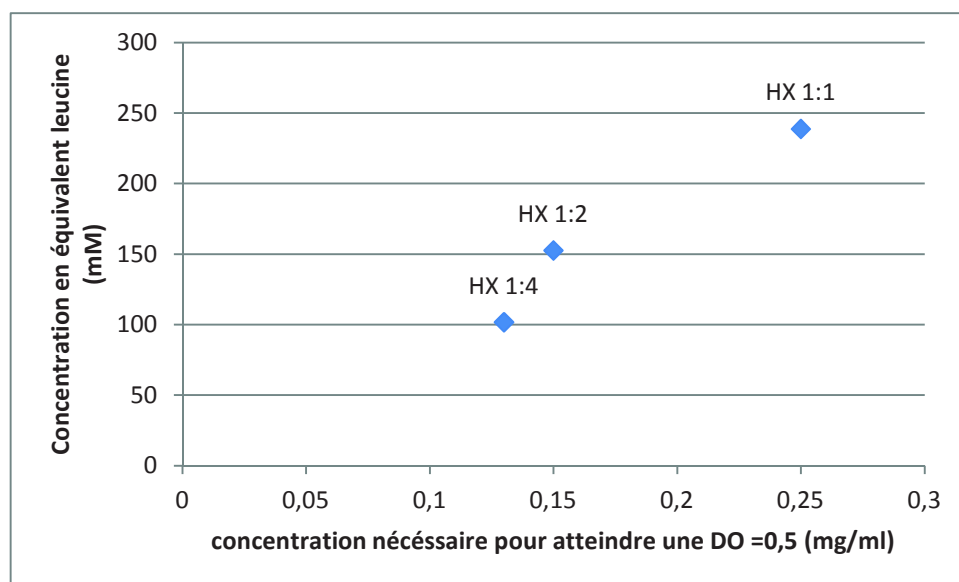


Figure 3.69 : Impact du nombre de fonctions aminées libres sur le pouvoir réducteur

On peut supposer qu'à partir d'une certaine concentration en glucides (figure 3.69), dans nos conditions, le maximum de composés ayant un caractère antioxydant a été produit. Cette concentration serait corrélée avec la mobilisation des fonctions aminées libres.

Pouvoir Chélateur

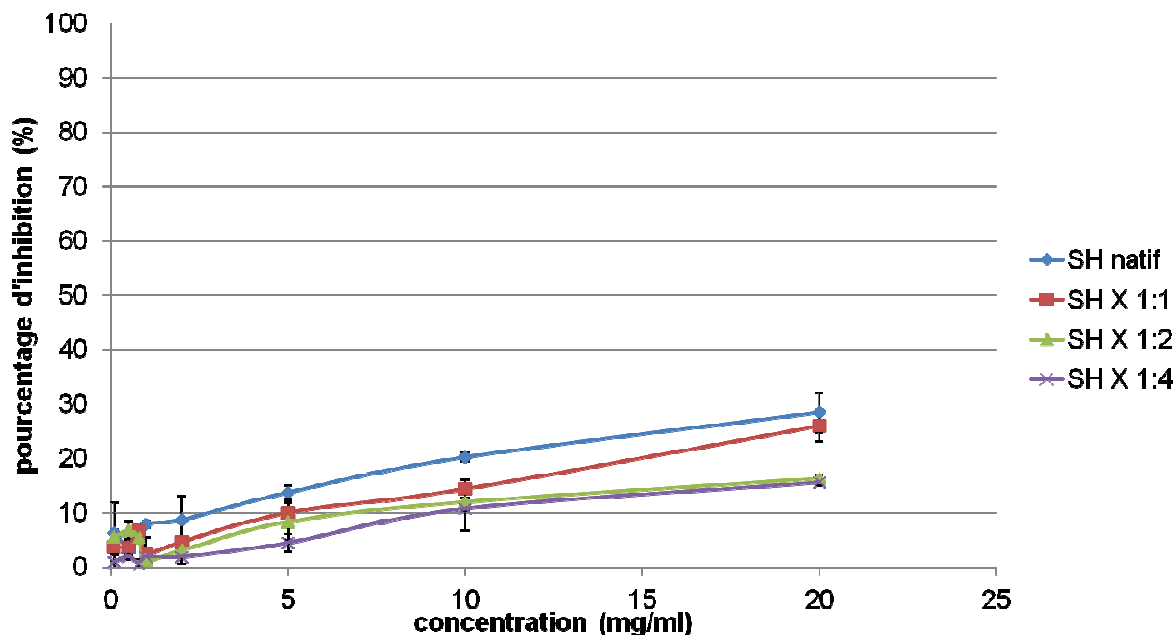


Figure 3.70 : pouvoir chélateur de l'hydrolysate de crevette natif ou après glycation avec trois concentration en Xylose différentes.

Le pouvoir chélateur des différents échantillons augmente linéairement avec la concentration (figure 3.70). Toutefois on remarque que la glycation de l'hydrolysate de crevette avec différentes concentrations en Xylose n'a pas d'impact significatif sur le pouvoir chélateur. Le pouvoir de ces échantillons est faible et est compris entre 15 et 30% pour une concentration en échantillons de 20mg/ml.

Synthèse :

La capacité antioxydante augmente avec l'augmentation de la concentration en Xylose utilisée lors de la réaction de Maillard.

Toutefois, la corrélation entre le pouvoir réducteur et la concentration en fonctions aminées libres n'est pas linéaire mais logarithmique. Ce qui traduit une concentration limite en glucide pour laquelle le maximum de composés ayant un caractère antioxydant a été produit.

3.4.4 Conclusion

La réaction de Maillard permet la création de composés ayant des propriétés réductrices et antiradicalaires. Ces activités semblent être plus importantes lorsque la source protéique est un hydrolysats plutôt qu'une protéine native. De plus en fonction du glucide, les capacités antiradicalaires et réductrices sont différentes, il semble que plus le glucide est réactif vis-à-vis de la réaction de Maillard, plus les produits de la réaction de Maillard présentent des capacités antioxydantes élevées. Ainsi l'utilisation de Xylose ou de Glucose lors de la glycation promeut l'apparition de substances ayant des capacités antiradicalaire et réductrices.

Toutefois, il existe une concentration limite en glucides lors de la réaction de Maillard au-delà de laquelle on n'observe plus d'amélioration des capacités antioxydantes. Dans notre étude, il semble que pour l'hydrolysats de crevette cette concentration soit de 180mg.ml⁻¹ de Xylose.

L'hydrolyse enzymatique des protéines libère des peptides ayant des capacités antioxydantes supérieures à celles des protéines natives. Cette hypothèse a été vérifiée pour le caséinate de sodium où les hydrolysats présentent en plus d'une amélioration des capacités réductrice et DPPH ainsi que l'apparition d'une capacité chélatrice du fer. On peut émettre l'hypothèse que ces améliorations sont portées par les peptides de poids moléculaires inférieurs à 1kDa.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la capacité antioxydante globale des produits de la réaction de Maillard. Il serait intéressant de mesurer la contribution des différentes fractions moléculaires dans cette capacité antioxydante globale. En effet en fonction de la fraction moléculaire et de la composition en acides aminés des peptides, les modes d'actions de l'activité antioxydantes sont différentes. De plus toutes les fractions peptidiques ne sont pas responsables de l'activité antioxydantes. Le fractionnement des produits pourrait permettre de trancher sur la répartition de l'activité antioxydante et de ces modes d'actions en fonction de la fraction étudiée.

4 Conclusion générale et perspectives

La thèse avait pour but de produire de nouveaux actifs bifonctionnels (émulsifiant et antioxydant) à partir de protéines natives ou hydrolysées, modifiées par réaction de Maillard en conditions contrôlées. Pour aboutir à la modification des propriétés émulsifiantes et antioxydantes, les protéines ont subi une réaction de Maillard avec différents glucides.

La première étape de la thèse a été de mettre en place des conditions de RM qui permettaient la glycation entre les sources protéiques et les différents glucides même y compris ceux qui sont faiblement réactifs.

En réalisant la RM en milieu sec, à 50°C pendant 48 heures sous une humidité relative de 62%, nous avons réussi à glyquer à la fois le caséinate de sodium et l'hydrolysate de crevette avec tous les glucides sélectionnés. L'ordre de réactivité des glucides, lors de ces réactions de Maillard en milieu sec est le même qu'en milieu liquide : Xylose > Glucose > FOS > Dextran. En revanche, la glycation, en milieu sec est plus poussée qu'en milieu liquide, c'est-à-dire que la mobilisation des fonctions aminées libres est plus importante. Ces conditions de glycation ont donc permis de modifier significativement le caséinate de sodium et l'hydrolysate de crevette.

Deux autres facteurs vis-à-vis de la RM ont été explorés pendant la thèse : l'impact du poids moléculaire de la source protéique et la mise en évidence d'un facteur limitant.

Nous avons donc réalisé une RM avec des hydrolysats de caséinate possédant trois degrés d'hydrolyse différents. Nous avons montré que dans les conditions utilisées, plus le degré d'hydrolyse est important, et donc plus la source protéique est riche en peptides de faible poids moléculaire, plus la réaction de Maillard est importante.

Par ailleurs, nous avons étudié l'impact du ratio glucide / fonctions aminées libres et identifié la concentration en Xylose nécessaire pour atteindre le plus fort taux de glycation.

De plus, on remarque que la glycation des protéines avec les différents glucides a entraîné la production de nombreux composés de nature différente ainsi qu'une modification de la répartition des poids moléculaires dont les conséquences sont des modifications des propriétés fonctionnelles et biologiques.

La seconde étape de la thèse était la caractérisation des propriétés des composés néoformés lors de la RM, notamment les propriétés émulsifiantes et antioxydantes.

Dans le cas du caséinate de sodium, la solubilité des PRM est, à l'exception des PRM issus du Xylose, supérieure à celle du caséinate de sodium natif. L'hydrolyse enzymatique du caséinate de sodium entraîne elle aussi une augmentation significative de la solubilité par rapport au caséinate de sodium natif. La solubilité élevée (supérieure à 90%) des hydrolysats de caséinate de sodium et de crevette n'est pas affectée par la glycation.

L'étude des propriétés émulsifiantes des différents composés a permis de mettre en exergue deux couples protéines/glucides qui entraîne une amélioration de la stabilité des émulsions comparativement à la protéine native. Il s'agit des couples : caséinate-Dextran et hydrolysat de crevette-Xylose. Cette amélioration de la stabilité des émulsions a été observée à pH 7 pour les deux couples et à pH 4,5 pour le couple caséinate-Dextran.

La glycation des différentes sources protéiques entraîne aussi l'apparition de propriétés antioxydantes. Cette apparition est corrélée avec la réactivité du glucide, plus celui-ci est réactif lors de la réaction de Maillard, plus les propriétés antioxydantes mesurées sont importantes. De plus l'hydrolyse enzymatique seule, dans le cas du caséinate de sodium, développe des propriétés antioxydantes par rapport aux protéines natives. Le couple caséinate-Dextran ne présente pas de propriétés antioxydantes importantes. En revanche, le couple hydrolysat de crevette-Xylose possède des propriétés antioxydantes *in vitro* importantes.

La réaction de Maillard entre l'hydrolysat de crevette et le Xylose a donc permis la production de composés dotés à la fois de bonnes propriétés émulsifiantes et antioxydantes.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes limités à l'étude des propriétés émulsifiantes et aux propriétés antioxydantes *in vitro*. L'étude d'autres propriétés telles que les propriétés moussantes, antimicrobiennes ou l'évaluation des propriétés antioxydantes *in vivo* des composés issus de la RM pourraient être menées afin d'élargir le champ des applications industrielles possibles de ces composés.

De plus, les résultats montrent qu'il existe des relations structure-fonction qui dépendent du milieu réactionnel mis en œuvre. Il serait donc judicieux de caractériser les structures moléculaires des produits formés, d'affiner la caractérisation des émulsions par une analyse structurale et d'explorer les phénomènes d'adsorptions aux interfaces.

Dans notre étude nous avons toujours considéré les produits de la réaction de Maillard dans leur ensemble. Or il serait intéressant de les fractionner selon leur poids moléculaires et de mesurer les différentes propriétés des fractions et ainsi d'attribuer les propriétés à une ou plusieurs fractions. De plus, que ce soit pour les propriétés fonctionnelles ou pour les propriétés antioxydantes, des mécanismes de synergie ou de compétition peuvent intervenir entre les différents composés. Le rôle de chaque fraction et les relations entre elles peuvent apporter des explications sur le comportement des produits dans leur ensemble.

Bien qu'au cours de cette thèse nous ayons identifié un couple protéine-glucide qui par RM en conditions contrôlées produit des composés bifonctionnels, d'autres études sont nécessaires avant de songer à des applications industrielles.

Du fait de l'utilisation de la réaction de Maillard, il est nécessaire de vérifier l'innocuité des composés produits. La connaissance des concentrations qui ne présentent pas de risques pour la santé permettra de déterminer la catégorie à laquelle ces composés peuvent appartenir : additif, ingrédient ; mais aussi le champ d'application industrielle : cosmétique, nutraceutique, alimentation humaine ou animale.

Lors de notre étude nous ne nous sommes pas penchés sur la réglementation pour ces différentes applications. Il sera donc nécessaire, en fonction du domaine d'application, de vérifier que les composés sont bien conformes à la réglementation en vigueur.

Afin de mieux caractériser le produit pour les applications en cosmétique et dans le domaine alimentaire, des tests et évaluations sensorielles devront aussi être mis en place. En effet, les composés issus de la réaction de Maillard entre l'hydrolysate de crevette et le Xylose possèdent nombreux composés volatils odorants et une forte coloration brune qui peut limiter leur utilisation.

5 Annexes

Annexe 1 : Fiche technique du Dextran

Product Information

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Tel: (800) 521-8996 (314) 771-9785 Fax: (800) 825-5052 (314) 771-5257
Email: techservice@sigma-aldrich.com sigma-aldrich.com

DEXTRAN

Product Number D9260, D4626, D4133, D1662, D4751, D3759, D1390, D1537, D4876, D5251, D1037, D5376, and D5501

Cas #: 9004-54-0

Product Description

Structure: Dextran is a polymer of anhydroglucose. It is composed of approximately 95% alpha-D-(1-6) linkages. The remaining alpha(1-3) linkages account for the branching of dextran.^{1,2,3} Conflicting data on the branch lengths implies that the average branch length is less than three glucose units.^{4,5} However, other methods indicate branches of greater than 50 glucose units exist.^{6,7} Native dextran has been found to have a molecular weight (MW) in the range of 9 million to 500 million.^{8,9,10} Lower MW dextrans will exhibit slightly less branching⁴ and have a more narrow range of MW distribution.¹¹ Dextrans with MW greater than 10,000 behave as if they are highly branched. As the MW increases, dextran molecules attain greater symmetry.^{7,12,13} Dextrans with MW of 2,000 to 10,000 dextran molecules exhibit the properties of an expandable coil.¹² At MWs below 2,000 dextran is more rod-like.¹⁴ The MW of dextran is measured by one or more of the following methods: low angle laser light scattering¹⁵, size exclusion chromatography¹⁶, copper-complexation¹⁷ and anthrone reagent colorimetric reducing-end sugar determination and viscosity¹².

Specific Rotation: $[\alpha] = +199^\circ$ ¹¹

Sigma dextrans are derived from *Leuconostoc mesenteroides*, strain B 512. Various MWs are produced by limited hydrolysis and fractionation. Our supplier's exact methods are held proprietary. Fractionation can be accomplished by size exclusion chromatography¹⁶ or ethanol fractionation in which the largest MW dextrans precipitate first.¹⁹

Preparation Instructions

With the exception of the highest MW dextran, D5501 (MW range = 5 million to 40 million), dextrans are very water soluble. Sigma tests the solubility of dextrans at concentrations generally exceeding 30 mg/ml in water. Dextrans are also freely soluble in DMSO, formamide, ethylene glycol, and glycerol.¹¹ Neutral-aqueous

dextran solutions can be sterilized by autoclaving at 110-115°C for 30 to 45 minutes.¹¹ Dextran can be hydrolyzed by strong acids at high temperatures. The terminal reducing end group of dextran can be oxidized in alkaline solutions.¹¹

Procedure

As a high MW, inert, water-soluble polymer, dextran has been used in a wide variety of bio-medical applications.

Applications for Unmodified Dextrans

Plasma Extenders

Dextran solutions have been used as plasma extenders.²⁰ Solutions of 10% dextran 40,000 MW exerts a slightly higher colloidal osmotic pressure than plasma proteins. A 10% Dextran (MW 40,000) solution in 0.9% sodium chloride or 5% glucose has reported to be used as a short-term plasma extender for post-operative thrombo-embolic disorders. After infusion, approximately 70% dextran (MW 40,000) is excreted in the urine unchanged after 24 hours. A small amount is eliminated in the feces. The remaining dextran is slowly metabolized to glucose. A 6% solution of dextran MW 70,000 exerts a colloidal osmotic pressure similar to that of plasma proteins. Dextrans with MW greater than 50,000 tend to slowly diffuse across the capillary wall and are slowly metabolized to glucose. Approximately 50% of infused dextran MW 70,000 is excreted unchanged in the urine in 24 hours.²⁰

Centrifugation / Cell and Organelle Separation

Colloidal solutions containing dextran MW 250,000 have been used to isolate aggregated platelets²¹ leukocytes²² and lymphocytes²³ in blood by centrifugation. Dextran MW 40,000 has been used for the isolation of intact nuclei.²⁴

Protein Precipitation

Dextrans have been used to enhance the precipitation and sensitivity of antibody-antigen complexes in immuno-diffusion applications. Dextran MW 80,000 was infused into an immunoelectrophoresis gel at a maximum of 80 mg/ml.²⁵ Dextrans MW 250,000 and 2,000,000 have also been used in similar applications.²⁶

Inhibition of Platelet Aggregation

At lower concentrations Dextrans MW 10,000-40,000 have been used to inhibit platelet aggregation.²⁷

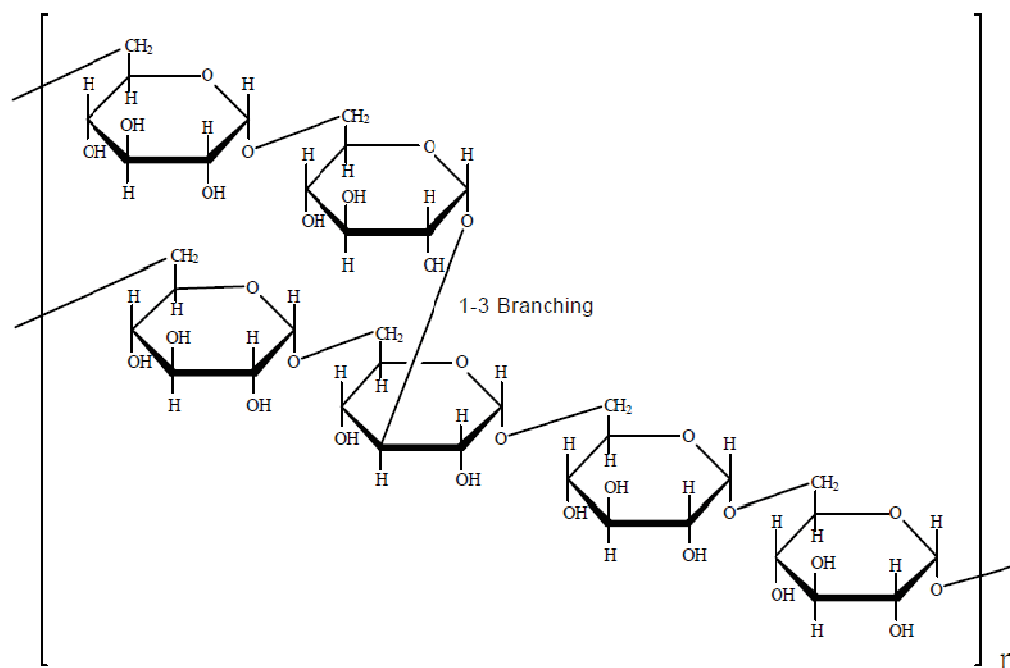
Related Products

Sigma offers several related products including dextran sulfate, DEAE-dextran, biotin-dextran, FITC-dextran, BCECF-dextran, DTAF-dextran, EITC-Dextran, RITC-dextran, TRITC-dextran, dextran-coated charcoal, iron dextran, ¹⁴C-labeled dextrans, dextranase, dextran sucrose, Dextropep centrifugation media, and soluble reactive dye-dextran complexes. Dextran-based chromatography resins include Sephadex, Sephacryl, Superdex, PDX resins and sulfated dextran beads.

References

1. Rankin, J.C. and Jeanes, A., *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 4435 (1954).
2. Dimler, R.J. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 6568 (1955).
3. Van Cleve, J.W. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 4435 (1956).
4. Lindberg, B. and Svensson, S., *Acta. Chem. Scand.*, 22, 1907 (1968).
5. Larm, O. et al., *Carbohydr. Res.* 20, 39 (1971).
6. Bovey, F.A., *J. Polym. Sci.*, 35, 187 (1959).
7. Senti, R.F. et al., *J. Polym. Sci.*, 17, 527 (1955).
8. Arond, L.H. and Frank, H.P., *J. Phys. Chem.*, 58, 953 (1954).
9. Elias, H.G., *Makromol. Chem.*, 33, 186 (1959).
10. Antonini, E. et al., *Biopolymers*, 2, 27 (1964).
11. Supplier's data.
12. Granath, K.A., *J. Colloid Sci.*, 13, 308 (1958).
13. Wales, M. et al., *J. Polym. Sci.*, 66, 101 (1979).
14. Gekko, K., *Am. Chem. Soc. Symposium Series*, 150, 415 (1981).
15. Allen, P.W., *Techniques of Polymer Characterization*, Butterworths Scientific Publications, p. 131 (1959).
16. Granath, K.A. and Flodin, P., *Makromol. Chem.*, 48, 160 (1961).
17. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 50, 81 (1953).
18. Jermyn, M.A., *Anal. Biochem.*, 68, 332 (1975).
19. Ingelman, B. and Halling, M.S., *Ark. Kemi.*, 1, 61 (1949).
20. *Martindale: The Extra Pharmacopoeia*, J.E.F. Reynolds, 30 ed., pp. 650-651 (1993).
21. Minor, A.H. and Burnett, L., *N.Y. State J. Med.*, 53, 547 (1953).
22. Boyum, A., *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, 21, Suppl. 97, 31 (1968).
23. Harris, R. and Ukaejiofo, E.O., *Brit. J. Haematol.*, 18, 229 (1970).
24. Honda, S.I. et al., *J. Exp. Botany*, 17, 460 (1966).
25. Helsing, K., *Biochem. J.*, 114, 141 (1969).
26. Ceska, M., *Biochem. J.*, 111, 607 (1969).
27. Gelin, L.E. and Ingelman, B., *Acta Chir. Scand.*, 122, 294 (1961).

rbg 3/21/01

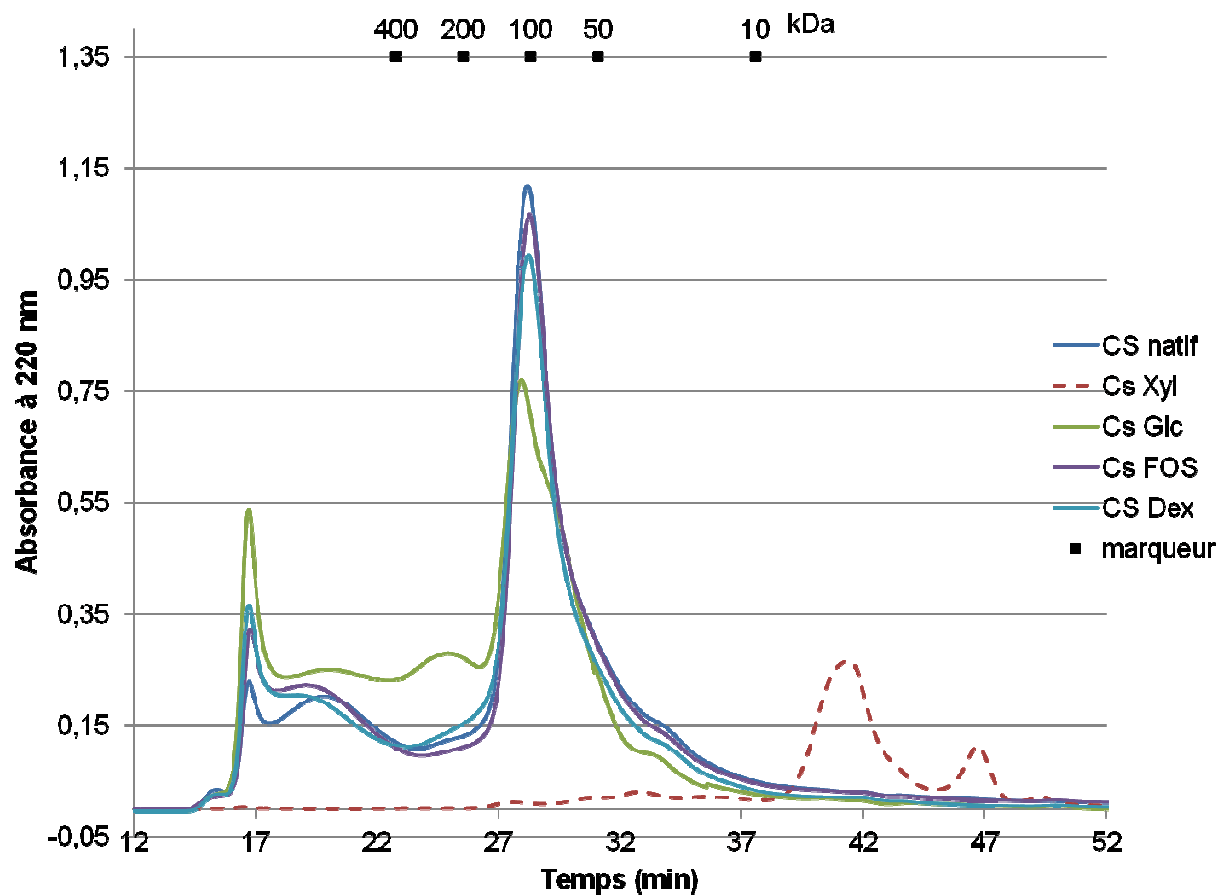


Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.
Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

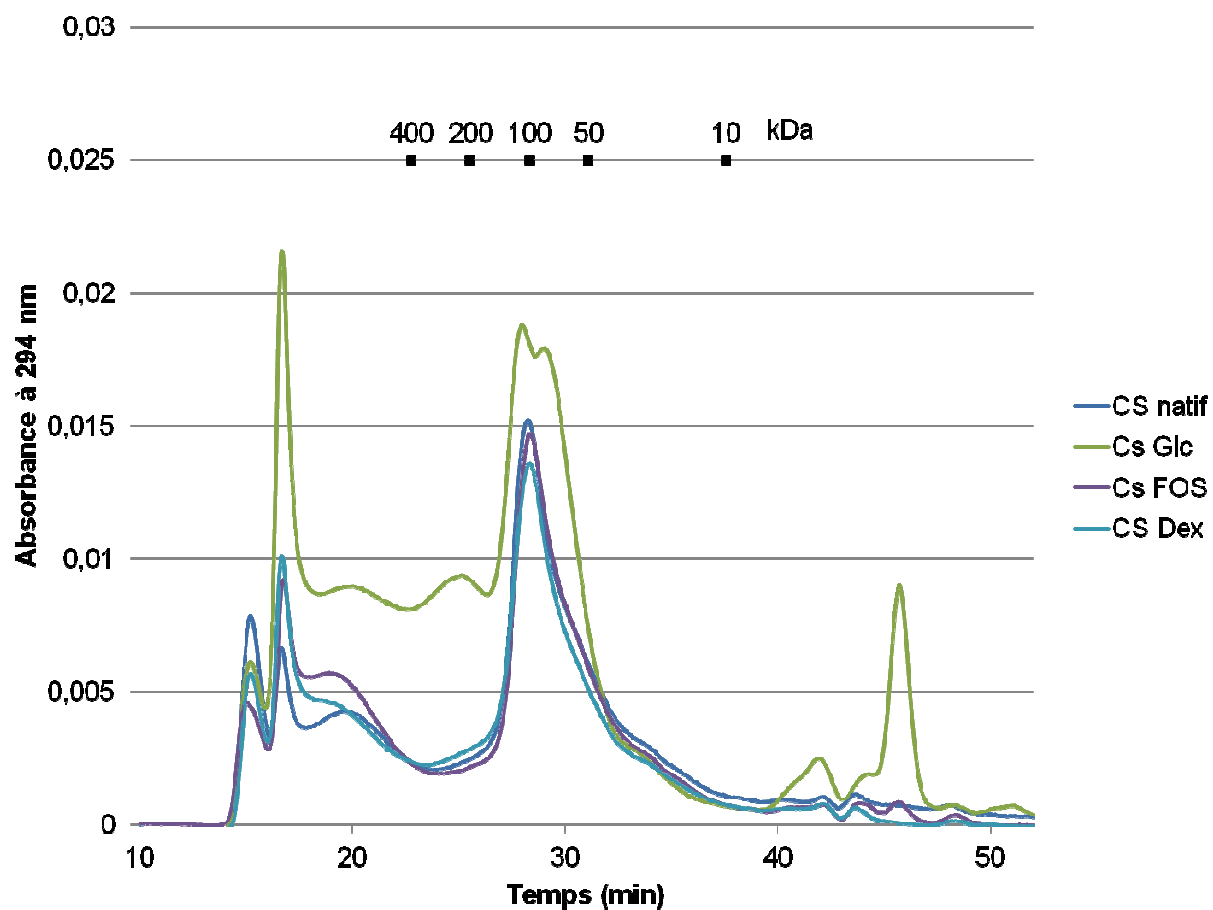
Annexe 2 : Tableau d'absorbance à 420nm des glucides avant et après chauffage dans les conditions de réaction de Maillard en absence de protéines.

	Xylose	Glucose	FOS	Dextran
sans RM	0,220 ± 0,03	0,225 ± 0,01	0,210 ± 0,03	0,215 ± 0,01
après RM ed	0,229 ± 0,07	0,222 ± 0,04	0,215 ± 0,04	0,218 ± 0,03
après RM Tp	0,224 ± 0,02	0,230 ± 0,05	0,217 ± 0,02	0,215 ± 0,02

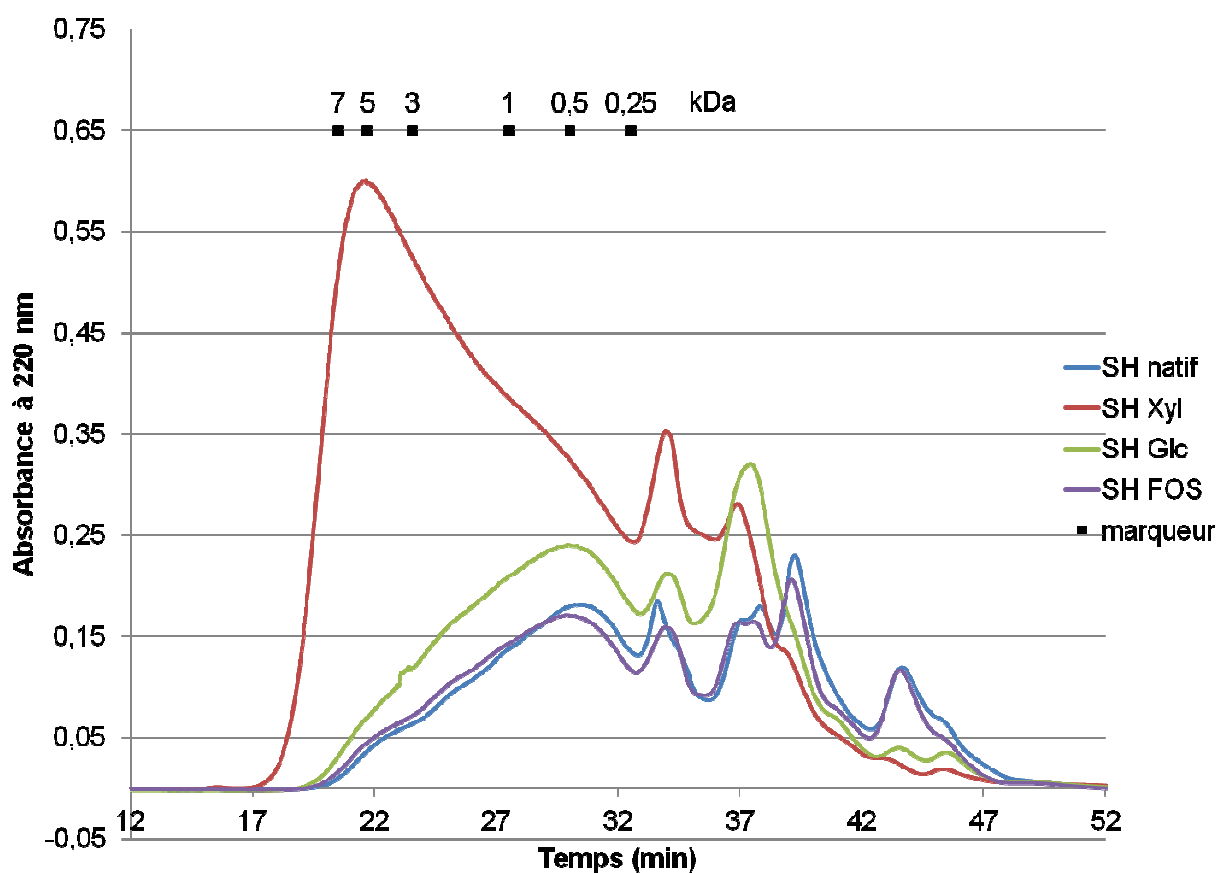
Annexe 3 : Effet de la présence de tampon phosphate lors de la réaction de Maillard sur les profils chromatographiques, extraits à 220nm, du caséinate de sodium seul et du caséinate de sodium incubé respectivement en présence de Xylose, Glucose, FOS et de Dextran. Colonne Superdex 200 10/300GL, élution par le tampon phosphate 50mM (pH 7) + NaCl 0.15M, débit de 0,5ml.min⁻¹.



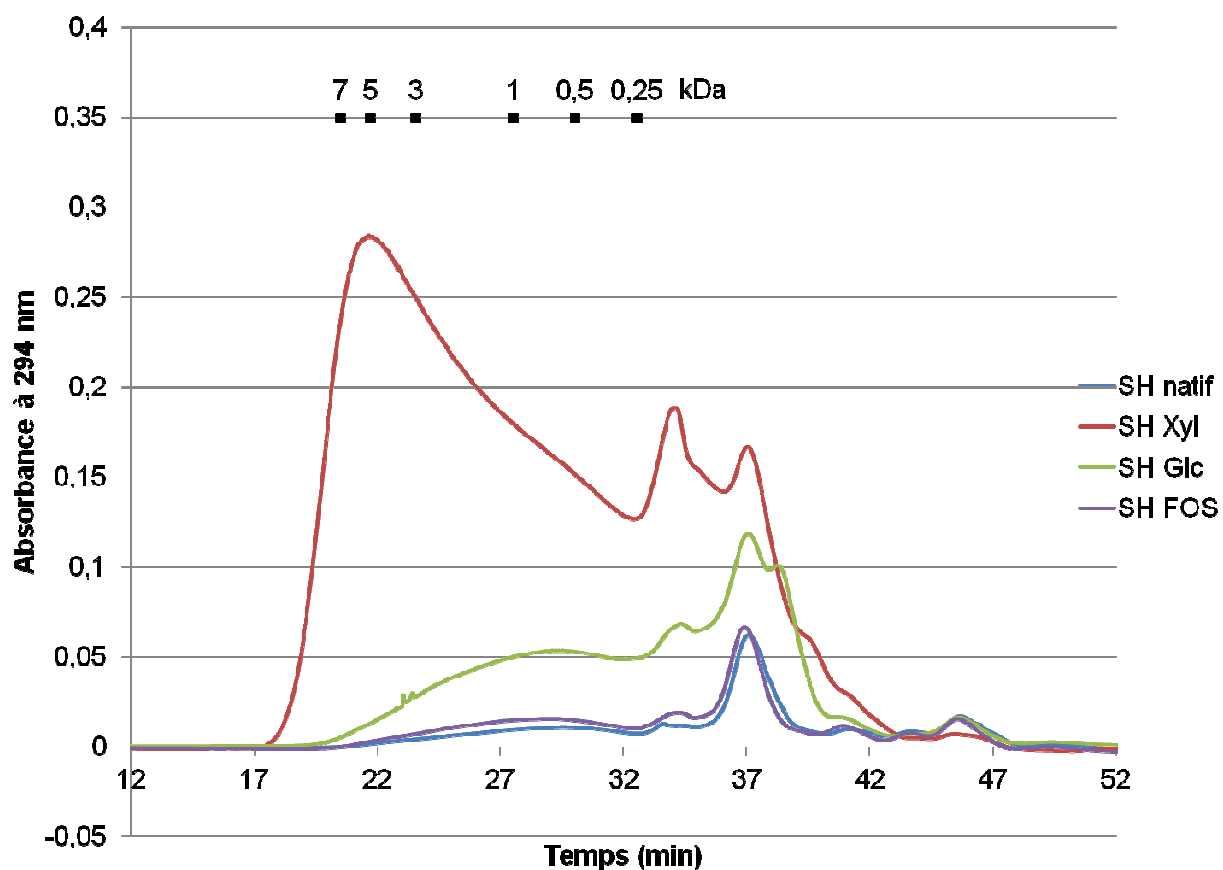
Annexe 4 Effet de la présence de tampon phosphate lors de la réaction de Maillard sur les profils chromatographiques, extraits à 294nm, du caséinate de sodium seul et du caséinate de sodium incubé respectivement en présence de Xylose, Glucose, FOS et de. Colonne Superdex 200 10/300GL, élution par le tampon phosphate 50mM (pH 7) + NaCl 0.15M, débit de 0,5ml.min⁻¹.



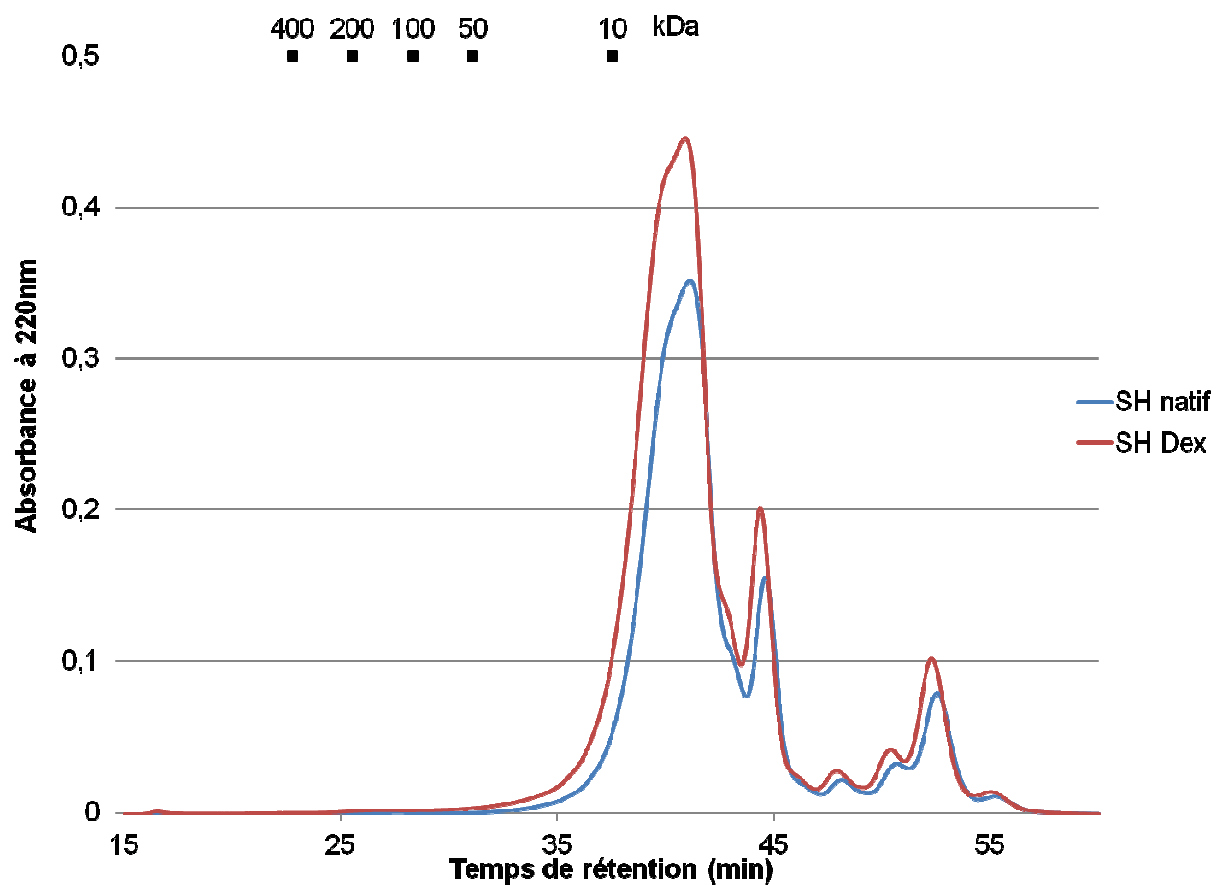
Annexe 5 : Effet de la présence de tampon phosphate lors de la réaction de Maillard sur les profils chromatographiques, extraits à 220nm, d'un hydrolysât de crevette natif et d'un hydrolysât de crevette incubé respectivement en présence de Xylose, Glucose et de FOS. Colonne Superdex peptide HR 10/300GL, élution par un mélange 30 :70 d'acétonitrile et d'eau + TFA (0,01%), débit de 0,5ml.min⁻¹



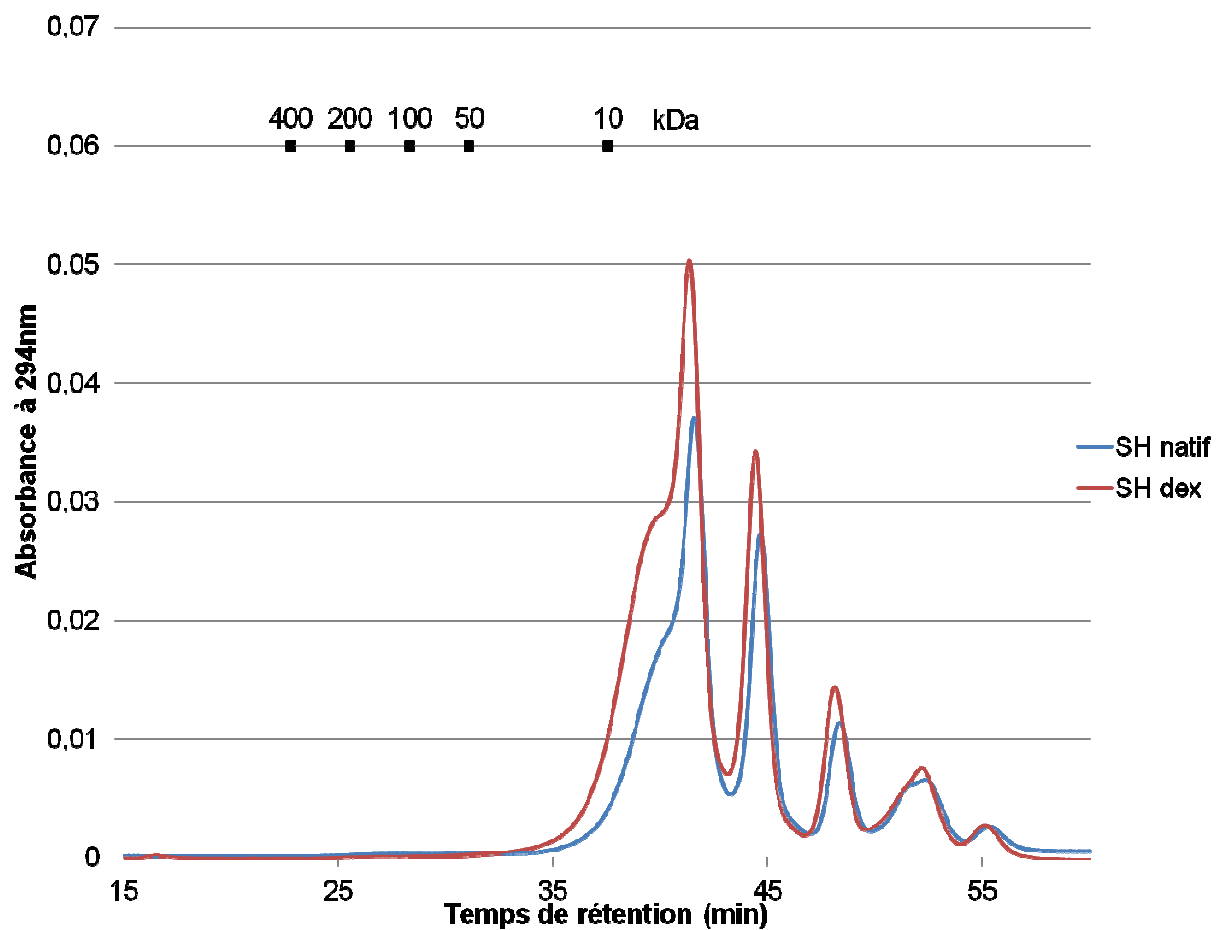
Annexe 6 : Effet de la présence de tampon phosphate lors de la réaction de Maillard sur les profils chromatographiques, extrait à 294nm, d'un hydrolysât de crevette et d'un hydrolysât de crevette incubé respectivement en présence de Xylose, Glucose et de. Colonne Superdex peptide HR 10/300GL, élution au par un mélange 30 :70 d'acétonitrile et d'eau + TFA (0,01%), débit de 0,5ml.min⁻¹



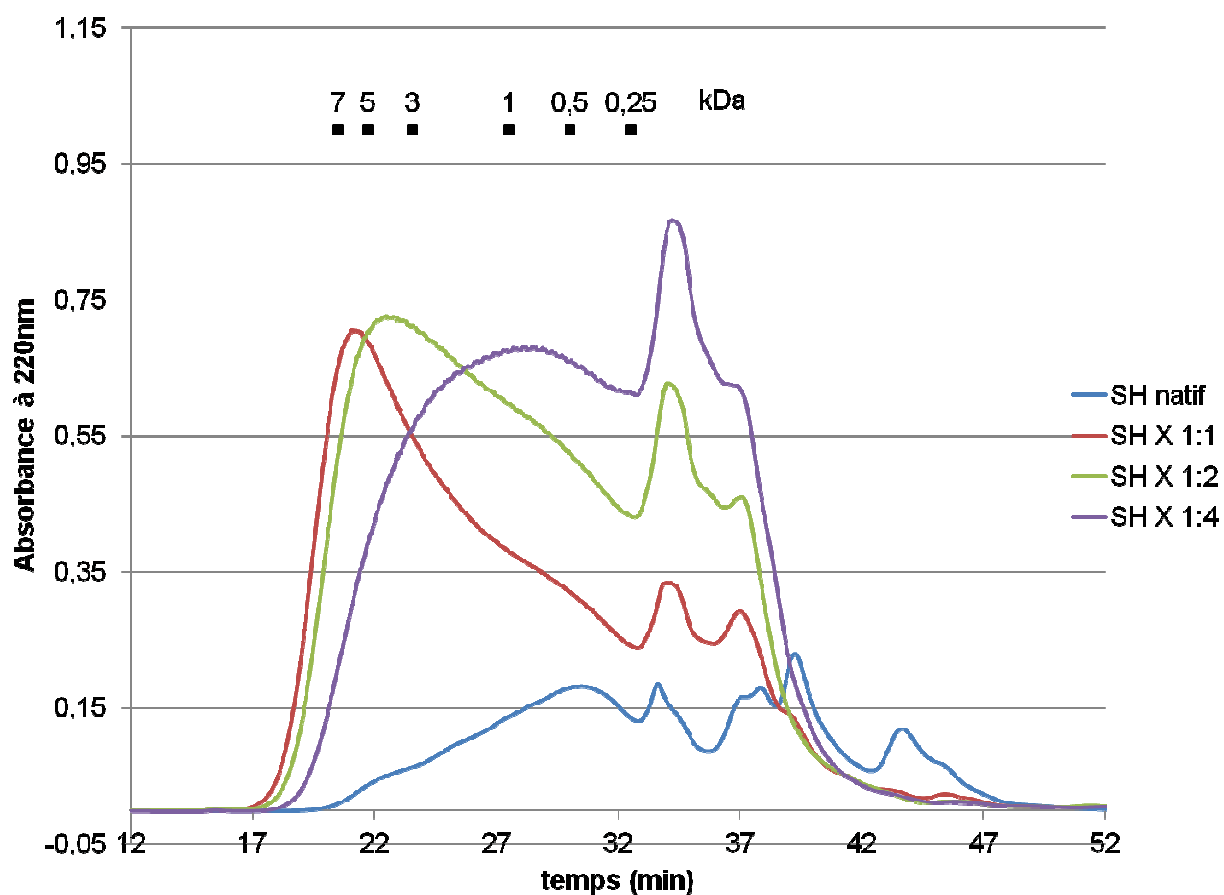
Annexe 7 : Effet de la présence de tampon phosphate lors de la réaction de Maillard sur les profils chromatographiques, extrait à 220nm, d'un hydrolysate de crevette et d'un hydrolysate de crevette incubé en présence de Dextran. Colonne Superdex 200 10/300GL, élution par le tampon phosphate 50mM + NaCl 0.15M, débit de 0,5ml.min⁻¹.



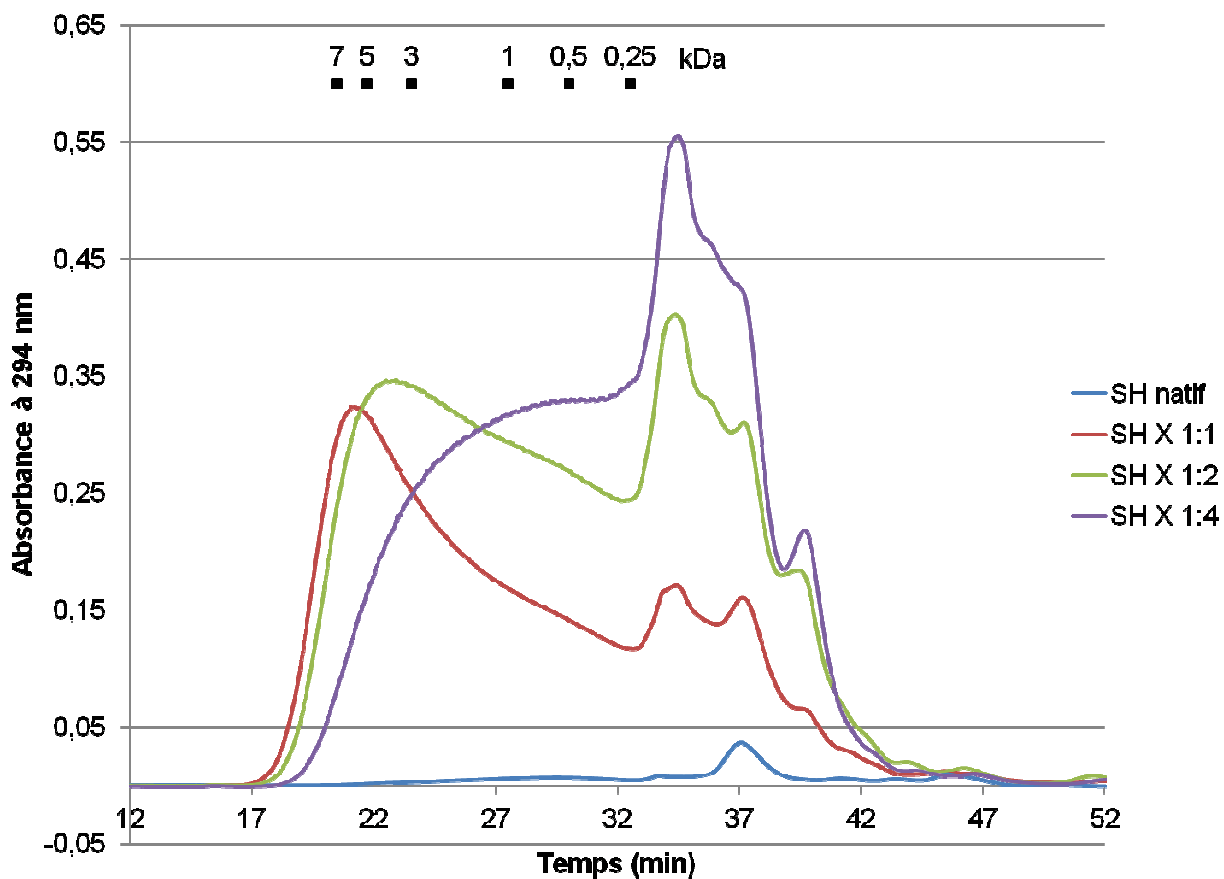
Annexe 8 : Effet de la présence de tampon phosphate lors de la réaction de Maillard sur les profils chromatographiques, extrait à 220nm, d'un hydrolysate de crevette et d'un hydrolysate de crevette incubé en présence de Dextran. Colonne Superdex 200 10/300GL, élution par le tampon phosphate 50mM + NaCl 0.15M, débit de 0,5ml.min⁻¹.



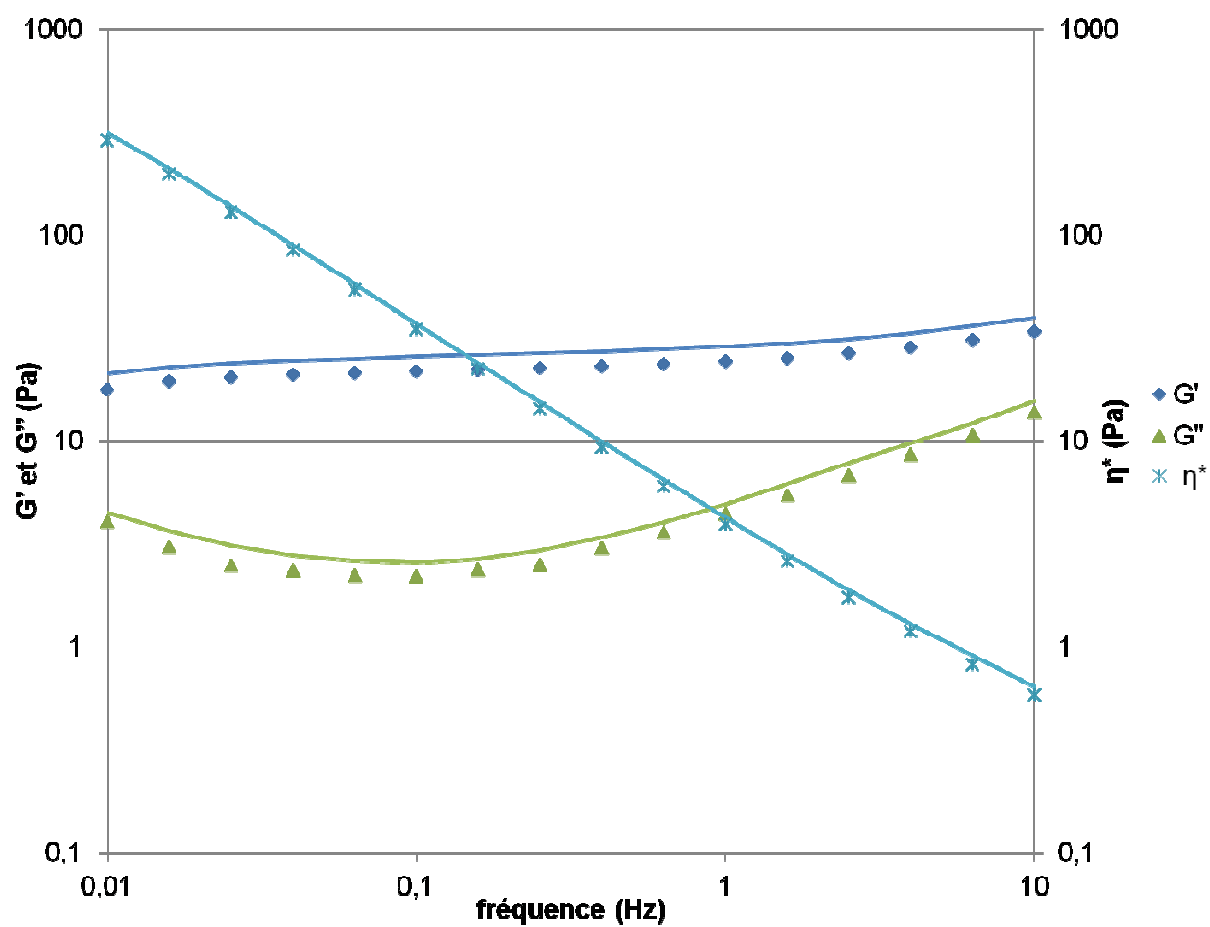
Annexe 9 : Effet de la présence de tampon phosphate lors de la réaction de Maillard sur les profils chromatographiques, extraits à 220nm des hydrolysats de crevette maillardisés en tampon phosphate avec différentes concentration en Xylose. Colonne Superdex peptide HR 10/300GL, élution par un mélange 30 :70 d'acétonitrile et d'eau + TFA (0,01%), débit de 0,5ml.min⁻¹.



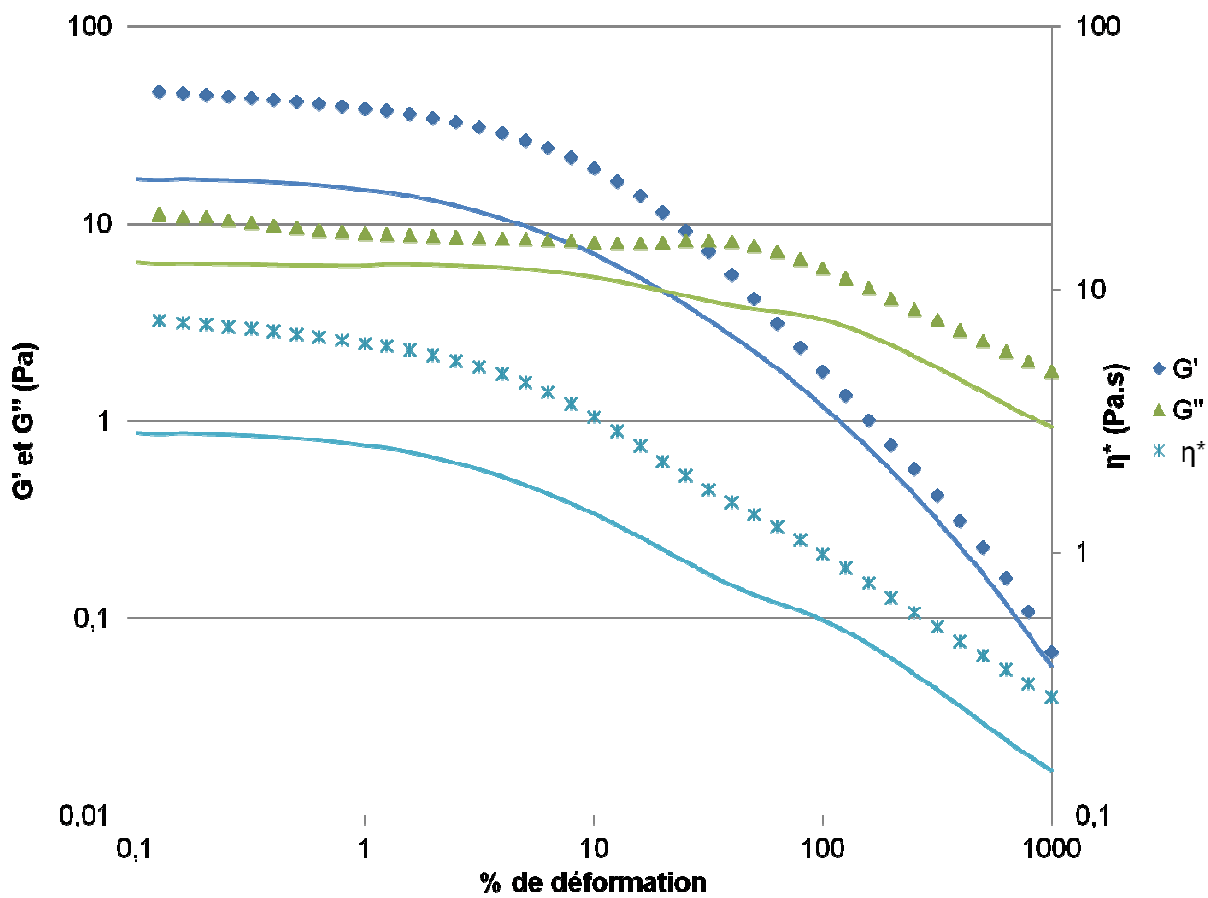
Annexe 10 : Effet de la présence de tampon phosphate lors de la réaction de Maillard sur les profils chromatographiques, extraits à 294 nm des hydrolysats de crevette maillardisés en tampon phosphate avec différentes concentration en Xylose. Colonne Superdex peptide HR 10/300GL, élution par un mélange 30 :70 d'acétonitrile et d'eau + TFA (0,01%), débit de 0,5ml.min⁻¹.



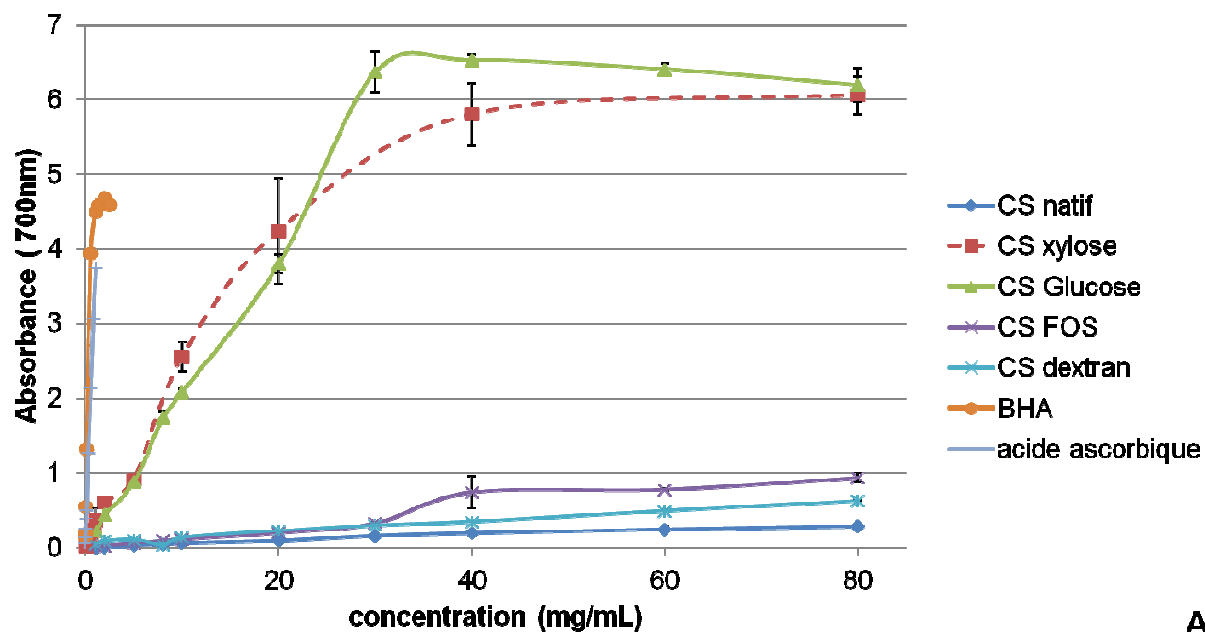
Annexe 11 : Balayage en fréquence d'une émulsion contenant du caséinate de sodium natif (traits pleins) ou du caséinate de sodium glyqué avec du Dextran (symboles)



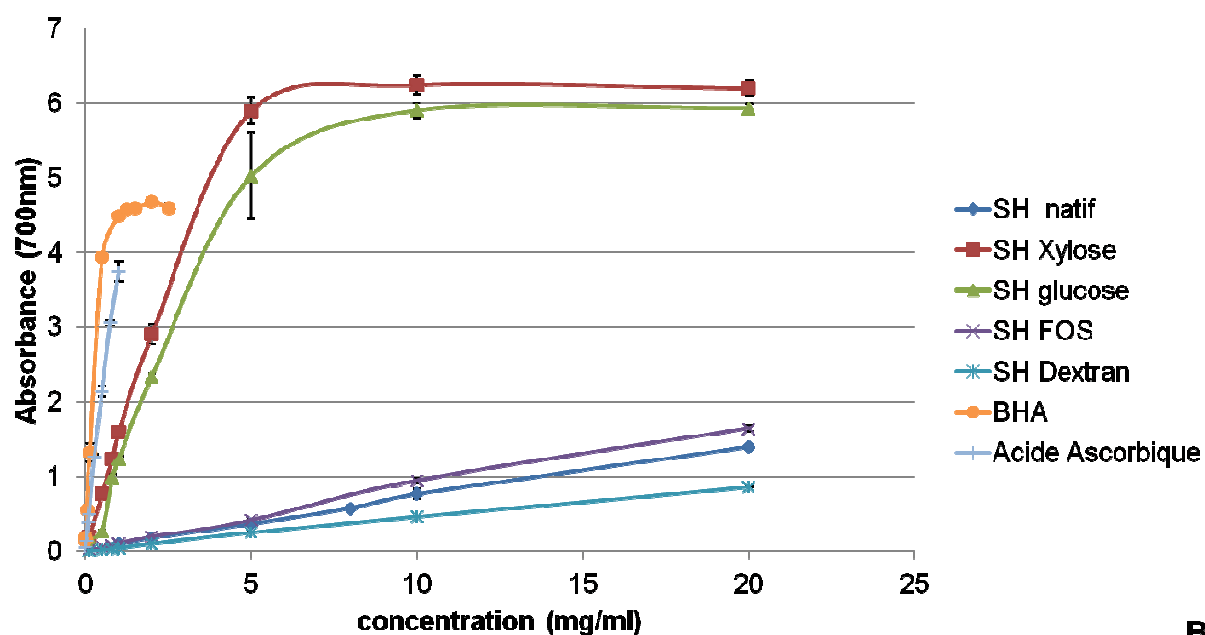
Annexe 12 : : Balayage en déformation d'une émulsion contenant du caséinate de sodium natif (traits pleins) ou de l'hydrolysate de crevette glyqué avec du Xylose (symboles).



Annexe 13 : Impact de la présence de tampon phosphate lors de la réaction de Maillard sur le pouvoir réducteur des échantillons (Caséinate A et hydrolysats de crevette B) avant et après du Caséinate (A) et de l'hydrolysats de crevette (B) avant et après incubation avec le Xylose, le Glucose, le FOS et le Dextran. Contrôles positifs : BHA et acide ascorbique.

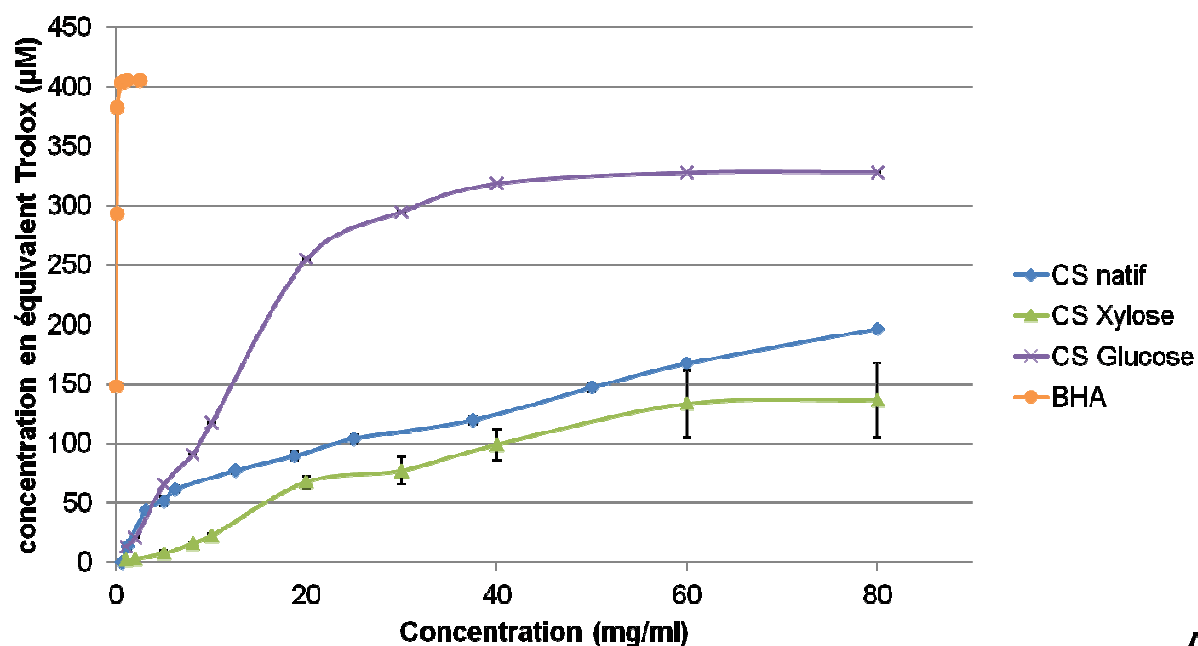


A

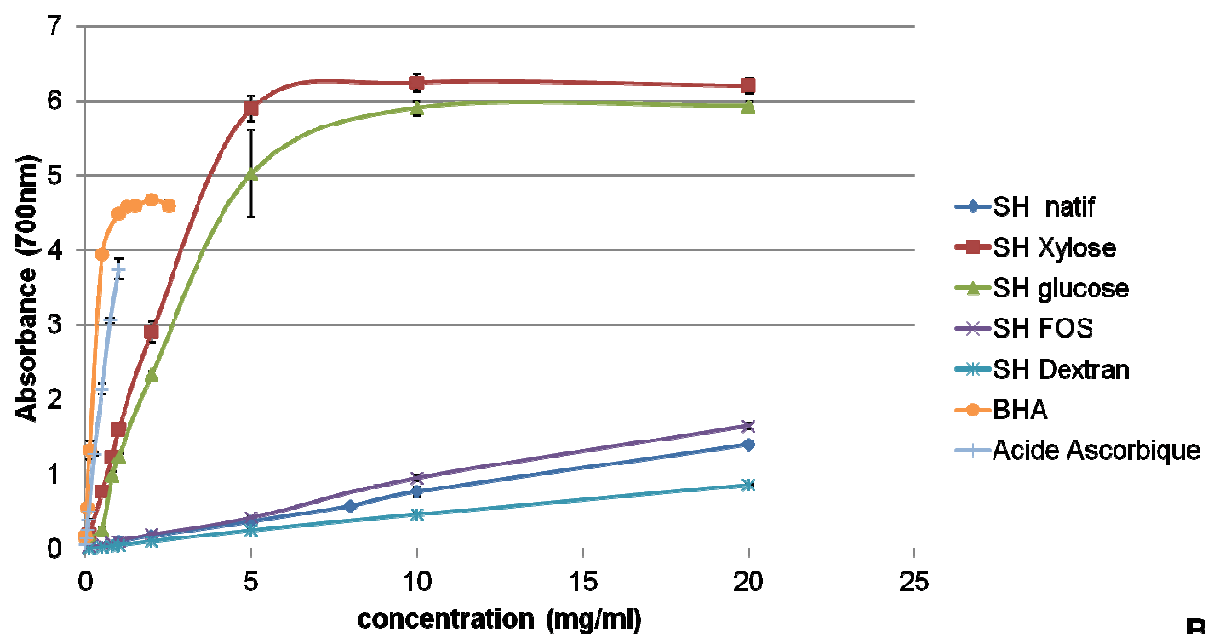


B

Annexe 14 : Impact de la présence de tampon phosphate lors de la réaction de Maillard sur l'activité piégeage du DPPH du Caséinate (A) et de l'hydrolysat de crevette (B) avant et après incubation avec le Xylose et le Glucose. Contrôles positifs : BHA.

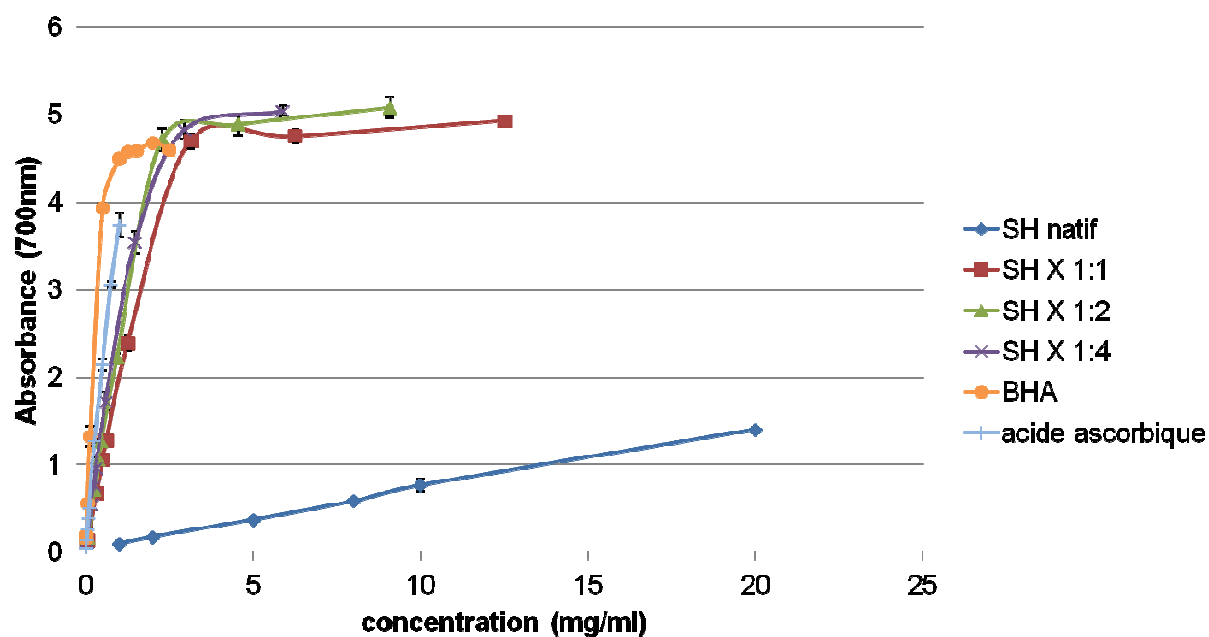


A

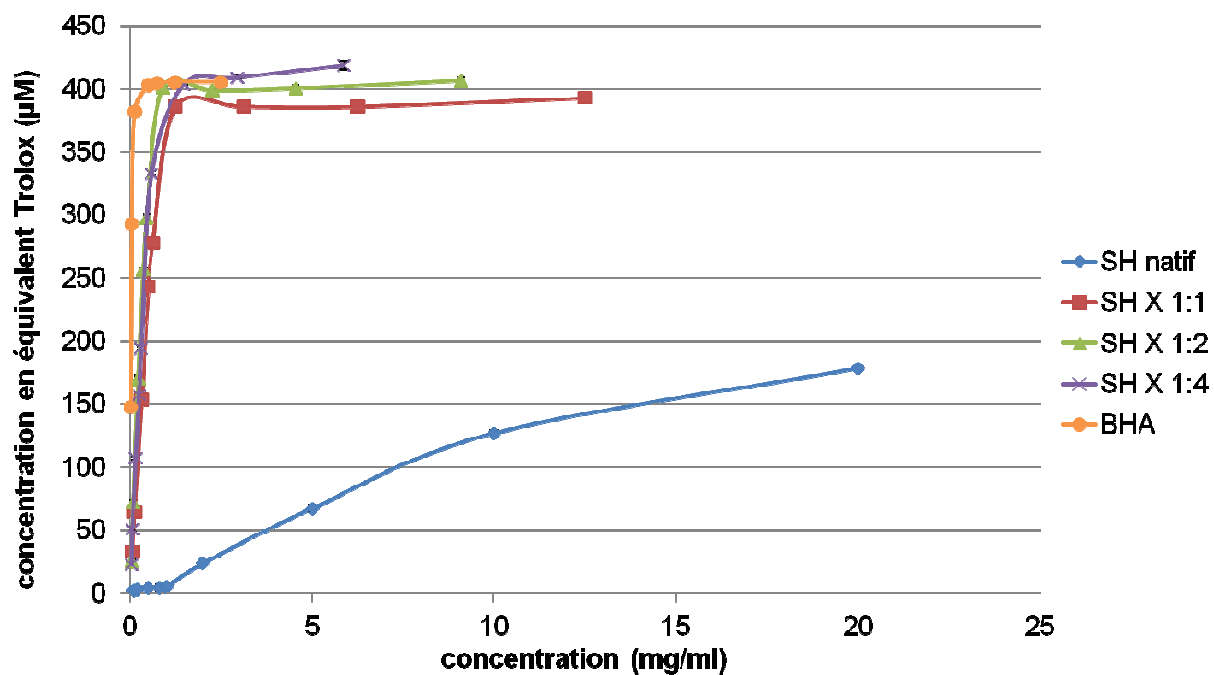


B

Annexe 15 : Impact de la présence de tampon phosphate lors de la réaction de Maillard sur le pouvoir réducteur des échantillons de d'hydrolysate de crevette avant et après incubation avec trois concentrations en Xylose. Contrôles positifs : BHA et acide ascorbique.



Annexe 16 : Impact de la présence de tampon phosphate lors de la réaction de Maillard sur l'activité piégeage du radical DPPH pour l'hydrolysat de crevette natif ou incubé avec trois concentrations en Xylose.



6 Références

- Acevedo N., Schebor C. and Buera M.P. 2006. Water-solids interactions, matrix structural properties and the rate of non-enzymatic browning. *Journal of food engineering*. 77. 1108 – 1115.
- Adler-Nissen J. 1976. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 24 (6). 1090-1093.
- Adler-Nissen J. 1977. Enzymatic hydrolysis of food proteins. *Process Biochemistry*. 12. 18-23.
- Adler Nissen J., eriksen S. and Olsen H.S. 1983. Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*. 32. 411-423
- Ajandouz E. H., Puigserver A. 1999. Nonenzymatic browning reaction of essential amino acids: effect of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 47. 1786- 1793
- Ajandoux E.H., Dessaux V., Tazi S. and Puigserver A. 2008. Effects of temperature and pH on the kinetics of caramelisation, protein cross-linking and Maillard reactions in aqueous model systems. *Food Chemistry*. 107. 1244-1252
- Alaiz M., Hidalgo F. et Zamora R. 1997 Comparative antioxidant activity of Maillard and oxidized lipid-damaged Bovine Serum Albumine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 45. 3250-3254.
- Albrecht R. 1994. Aspects nutritionnels de la protection antiradicalaire. *Médecine et nutrition*, 30(1):19-24
- Al-Hakkak J. And Kavale S. 2002. Improvement of emulsification properties of sodium caséinate by conjugating to pectin through the Maillard reaction. *International Congress series*. 1245. 491-499.
- Alemán A., Giménez B., Montero P. and Gómez-Guillén M.C. 2011a. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT – Food Science and Technology*. 44. 407-413.
- Alemán A., Pérez-Santín E., Bordenave-Juchereau S., Arnaudin I., Gómez-Guillén M.C. and Montero P. 2011b. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food research international*. 44. 1044-1051.
- Álvarez C., García V., Rendueles M. and Díaz M. 2012. Functional properties of isolated porcine blood proteins modified by Maillard's reaction. *Food hydrocolloids*. 28. 267- 274.
- Ames J.M. 1988. The Maillard browning reaction : an update. *Chemistry and industry*. 5. 558-561
- Ames J.M., Bailey R.G., Mann J. 1999. Analysis of furanone, pyranone, and nex heterocyclic colored compounds from sugar-glycine model Maillard systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 47. 438-443.
- Ames J.M., Guy R.C.E., Kipping G.J. 2001. Effect of pH and temperature on the formation of volatile compounds in cysteine/reducing sugar/starch mixture during extrusion cooking. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 49. 1885-1894.

- Aminlari M., Ramezani R. And Jadidi F. 2005. Effect of dextran-based conjugation with dextran on the functional properties of lysozyme and casein. *Journal of the science of food and agriculture*. 85. 2617 – 2624.
- Aoki T., Hiidome Y., Sugimoto Y., Ibrahim H.R. and Kato Y. 2001. Modification of ovalbumin with oligogalacturonic acids through the Maillard reaction. *Food Research International*. 34. 127 – 132.
- Arribas-Lorenzo G. And Morales F.J. 2009. Effect of pyridoxamine on acrylamide formation in a Glucose/asparagines model system. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57 (3). 901-909.
- Ashoor S. H., Zent J. B. 1984. Maillard browning of common amino acids and sugars. *Journal of Food Science* .49. 1206-1207
- Batista I., Ramos C., Coutinho J., Bandarra N.M. and Nunes M.L. 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*. 45. 18-24.
- Baynes J.W. 2001. The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Experimental gerontology*. 36. 1527 – 1537.
- Bell L.N. 1997. Maillard reaction as influenced by buffer type and concentration. *Food Chemistry*. 59(1). 143-147.
- Bell L.N., Touma D.E., White K.L, Chen Y.H. 1998. Glycine loss and Maillard browning as related to the glass transition in a model food system. *Journal of food science*. 63(4). 625-628
- Bell L.N. and Wetzal C.R. 1995. Aspartame degradation in solution as impacted by buffer type and concentration. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 43. 2608-2612.
- Bell L.N. Touma D.E., White K.L. and Chen Y.H. 1998a. Glycine loss and Maillard browning as related to the glass transition in a model food system. *Journal of food science*. 63(4). 625-628.
- Bell L.N., White K.L. and Chen Y.H. 1998b. Maillard reaction in glassy low-moisture solids as affected by buffer type and concentration. *Journal of food science*. 63(5). 1-4.
- Benjakul S. Lertittikul W. and Bauer F. 2005. Antioxydant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-sugar model system. *Food Chemistry*. 93 189-196
- Benjakul S and Morrissey M.T. 1997. Protein hydrolysate from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45. 3423 – 3430.
- Bihel S. and Birlouez-Aragon I. 1998. Inhibition of tryptophane oxidation in the presence of Iron-vitamine C by bovine Lactoferrin. *International Dairy Journal*. 8. 637-641.
- Birlouez-Aragon I. 2008. La réaction de Maillard dans les aliments : quels enjeux pour la santé humaine ? *Cahier de Nutrition et de diététique*. 43 (6). 289 -295.
- Bos M.A. and Van Vliet T. 2001. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants : a review. *Advances in colloid and interface science*. 91. 437 – 471.
- Brand-Williams W. Cuvelier M.E. and Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxydant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*.28. 25-30.

- Brands C.M.J., Van Boekel M.A.J.S. 2002. Kinetic modeling of reactions in heated monosaccharide-casein systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50. 6725-6739.
- Brochette P. 1999. Élaboration et étude des émulsions. *Les techniques de l'ingénieur*. J2150.
- Buera P., Chirife J., Resnik S. L., Wetzeler G. 1987. Nonenzymatic browning in liquid model systems of high water activity ; kinetics of color changes due to Maillard reaction between different single sugars and glycine in comparison with caramelization browning. *Food Chemistry*. 52. 1063-1067
- Byun H.G., Lee J.K., Park H.G., Jeon J.K. and Kim S.K. 2009. Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer, *Brachionus rotundiformis*. *Process Biochemistry*. 44. 842-846
- Cämmerer B., Jalyschko W., Kroh L. W. 2002. Intact carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. *J Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50. 2083-2087.
- Canselier J.P. and Poux M. 2004. Procédés d'émulsification - Mécanismes de formation des émulsions. *Les techniques de l'ingénieur*. J2152.
- Cervato G., Cazzola R. and Cestaro B. 1999. Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 50. 291-296.
- Chalamaiah M., Narsing Rao G., Rao D.G. and Jyothirmayi T. 2010. Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. *Food chemistry*. 120. 652 – 657.
- Chanamai, R., & McClements, D. J. 2000. Creaming stability of flocculated monodisperse oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 225 (1). 214–218.
- Chang H.L, Chen Y.C and Tan F.J. 2011. Antioxidative properties of chitosan-Glucose Maillard reaction product and its effect on pork qualities during refrigerated storage. *Food Chemistry*. 124. 589 – 596.
- Chawla S.P., Chander R. and Sharma A. 2009. Antioxidant properties of Maillard reaction products obtained by gamma-irradiation of whey proteins. *Food chemistry*. 116. 122 – 128.
- Chen J., Vogel R., Werner S., Heinrich G., Clausse D. and Dutschk. 2011. Influence of the particle type on the rheological behavior of Pickering emulsions. *Colloids and surface A: Physicochemical and engineering aspects*. 382. 238-245.
- Chériot S., Billaud C., Pöchtrager S., Wagner K.H. and Nicolas J. 2009. A comparison study between antioxidant and mutagenic properties of cysteine Glucose-derived Maillard reaction products and neoformed products from heated cysteine and hydroxymethylfurfural. *Food chemistry*. 114. 132-138.
- Chevalier, F., Chobert, J.-M., Popineau, Y., Nicolas, M. G., and Haertlé, T. 2001a. Improvement of functional properties of β -lactoglobulin glycosylated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *International Dairy Journal*. 11(3). 145-152.
- Chevalier F., Chobert J.M., Genot C. and Haertlé T. 2001b. Scavenging of free radical, antimicrobial, and cytotoxic activities of the Maillard reaction products of β -lactoglobuline glycosylated with several sugars. *Journal of agricultural and food chemistry*. 49. 5031 – 5038.
- Chobert J.M., Gaudin J.C., Dalgalarondo M; and Haertlé T. 2006. Impact of Maillard type glycosylation on properties of betalactoglobulin. *Biotechnology Advances*. 24. 629 – 632.

- Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H. and Catignani G.L. 1983. Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *Journal of dairy science*. 66 (6). 1219-1227.
- Corzo-Martinez M.; Moreno F.J., Villamiel M; and Harte F.M. 2010. Characterisation and improvement of rheological properties of sodium caseinate glycated with galactose, lactose and dextran. *Food Hydrocolloids*. 24. 88 – 97.
- Culver C.A. and Swaisgood H.E. 1989. Changes in the digestibility of dried casein and Glucose mixtures occurring during storage at different temperature and water activities. *Journal of Dairy science*. 72. 2916 – 2920.
- Darewicz M. and Dziuba J. 2001. The effect of glycosylation on emulsifying and structural properties of bovine β -casein. *Nahrung*. 45. 15-20.
- Davies C.G. and Labuza T.P. 1997. The Maillard reaction: application to confectionery products. *Confectionery Science*. 35-66
- Decourcelle N., Sabourin C., Dauer G. and Guérard F. 2010. Effect of the Maillard reaction with Xylose on the emulsifying properties of a shrimp hydrolysate (*pandalus borealis*). *Food research international*. 43. 2155-2160.
- Del Castillo M.D., Ferrigno A., Acampa I., Borrelli R.C., Olano A., Martinez-Rodriguez A. and Fogliano. 2007. In vitro release of angiotensin-converting enzyme inhibitors, peroxy-radical scavengers and antibacterial compounds by enzymatic hydrolysis of glycated glute. *Journal of cereal Science*. 45. 327 – 334.
- De Vleeschouwer K., Van der Plancken I., Van Loey A., Hendrickx M.E. 2009a. Role of precursors on the kinetics of acrylamide formation and elimination under low moisture conditions using a multiresponse approach – part I: effect of the type of sugar. *Food chemistry*. 114. 116-126.
- De Vleeschouwer K., Van der Plancken I., Van Loey A., Hendrickx M.E. 2009b. Role of precursors on the kinetics of acrylamide formation and elimination under low moisture conditions using a multiresponse approach – part II: competitive reactions. *Food Chemistry*. 114. 535-546
- Dickinson E. 1998. Structure, stability and rheology of flocculated emulsions. *Current opinion in colloid & interface science*. 3. 633-638.
- Dickinson E. and Golding M. 1997. Rheology of Sodium Caseinate Stabilized Oil-in-Water Emulsions *Journal of Colloid and Interface Science*. 191. 166-176.
- Dickinson E. and Golding M. 1998. Influence of calcium ions on creaming and rheology of emulsions containing sodium caseinate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 144. 167–177
- Dong S., Panya A., Zeng M., Chen B., McClements D.J. and Decker E.A. 2012. Characteristics and antioxidant activity of hydrolyzed β -lactoglobulin–Glucose Maillard reaction products. *Food research international*. 46. 55-61.
- Drusch S., Berg S., Scampicchio M., Serfert Y., Somoza V., Mannino S. and Schwarz K. 2009. Role of glycated caseinate in stabilisation of microencapsulated lipophilic functional ingredients. *Food hydrocolloids*. 23. 942-948.
- Dufossé L., Pintéa A. 2005. Third International Congress on Pigments in Food. *Food research international*. 38 (8-9). 831-832.

- Duh P., Yen G.C., Yen W.J. and Chang L.W. 2001. Antioxidant Effects of Water Extracts from Barley (*Hordeum vulgare* L.) Prepared under Different Roasting Temperatures. *Journal of agricultural and food chemistry*. 49. 1455-1463.
- Dunlap C.A. and Côté G.L. 2005. B-lactoglobulin-dextran conjugates: effect of polysaccharide size on emulsion stability. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53. 419-423.
- Einarsson H., Snygg G.B. and Eriksson C. 1983. Inhibition of bacterial growth by Maillard reaction products. *Journal of agricultural and food chemistry*. 31. 1043 – 1047.
- Einarsson, H. 1987. The effect pH and temperature on the antibacterialeffect of Maillard reaction products. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 20. 51–55.
- Einhorn-Stoll U., Ulbtich M., Sever S. and Kunzek H. 2005. Formation of milk protein-pectin conjugates with improved emulsifying properties by controlled dry heating. *Food hydrocolloids*. 19. 329 – 340.
- Erçelebi E.A. and Ibanoglu E. 2009. Characterization of Phase Separation Behavior, Emulsion Stability, Rheology, and Microstructure of Egg White–Polysaccharide Mixtures. *Journal of food science*. 74 (6). 506-512.
- Faure H., Fayol V., Galabert C., Grolier P., Le Moël G., Steghens J.P., Van Kappel A. and Nabet F. 1999. Les caroténoïdes: I. Métabolisme et physiologie. *Annales de Biologie Clinique*. 57. 169-183.
- Favier A. 2003. Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes de maladie et potentiel thérapeutique. *Actualité Chimique*, Novembre-décembre 2003. 108-115.
- Fechner A., Knoth A., Scherze I. and Muschiolik G. 2007. Stability and release properties of double-emulsions stabilized by caseinate-dextran conjugates. *Food hydrocolloids*. 21. 943-952.
- Friedman. 1996. Food browning and its prevention: an overview. *Journal of agricultural and food chemistry*. 44 (3). 631 – 653.
- Gbogouri G.A., Linder M., Fanni J. and Parmentier M. 2004. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *Journal of food science*. 69 (8). 615-622.
- Georgescu L.P. and Leonte M. 1998. Inhibition des radicaux Maillard par les composés olyphénoliques. *Industrie alimentaire et agriculture*. Volume 115.
- Gibson R.S., Perlas L ; and Hotz C. 2006. Improving the bioavailability of nutrients in plant foods at the household level. *Proceedings of the nutrition society*. 65. 160 – 168.
- Giménez B., Alemán A., Montero P. and Gómez-Guillén M.C. 2009. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food chemistry*. 114. 976-983.
- Gökmen V and Şenyuva H. 2007. Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food chemistry*. 103. 196 – 203.
- Gu F., Kim J.M., Hayat K., Xia S., Feng B; and Zhang X. 2009. Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein–Glucose model system. *Food Chemistry*. 117. 48-54.

- Gu F.L, Kim J.M, Abbas S., Zhang X.M. Xia S.Q. and Chen Z.X. 2010. Structure and antioxidant activity of high molecular weight Maillard reaction products from casein-Glucose. *Food Chemistry*. 120. 505 – 511.
- Guan J.J., Qui A.Y., Liu X.Y., Hua Y.F. and Ma Y.H. 2006. Microwave improvement of soy protein isolate-saccharide graft reactions. *Food Chemistry*. 97. 577-585
- Guan Y., Lin H., Han Z., Wang J., u S., Zeng X., Liu Y., Xu C. And Sun W. 2010. Effects of pulsed electric field treatment on a bovine serum albumin–dextran model system, a means of promoting the Maillard reaction. *Food chemistry*. 123. 275 – 280.
- Guérard F., Dufossé L., de La Broise D. et Binet A. .2001. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna wastes using Alcalase. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, 11. 1051-1059.
- Guérard F., Guimas L. and Binet A. 2002. Production of tuna waste hydrolysate by a commercial neutral protease preparation. *Journal of molecular Catalysis B: enzymatic*. 19 – 20. 489 – 498.
- Guérard F., Sumaya-Martinez M.T., Laroque D., Chabeaud A. and Dufossé L. 2007. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process biochemistry*. 42. 1486-1491.
- Guo M.R., Fox P.F., Flynn A. and Kindstedt. 1995. Heat-induced Modifications of the Functional Properties of Sodium Caseinate. *International Dairy Journal*. 6. 473-483.
- Halldórsdóttir S.M., Hamaguchi P.Y., Sveinsdóttir H., Kristinsson H.G., Bergsson A.B. and Thorkelsson G. Properties of hydrolysed saithe protein isolates prepared via pH shift process with and without dewatering. *LWT- Food science and Technology*. 44. 1999-2004
- Hassan A.B., Osman G.A. and Babiker E.E. 2007. Effect of chymotrypsin digestion followed by polysaccharide conjugation or transglutaminase treatment on functional properties of millet proteins. *Food chemistry*. 102. 257-262.
- Harnedy, P.A., and FitzGerald, R.J. 2011. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review, *Journal of Functional Foods*. doi:10.1016/j.jff.2011.09.001
- He H., Chen X., Sun C., Zhang Y. and Gao P. 2006. Preparation and functional evaluation of oligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus sp.* SM98011. *Bioresource Technology*. 97. 385-390
- Hidalgo F. J., Alaiz M. et Zamora R. 1999. Effect of pH and temperature on comparative nonenzymatic browning of proteins produced by oxidized lipids and carbohydrates. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 47(2). 742-747.
- Hiller B. and Lorenzen P.C. 2010. Functional properties of milk proteins as affected by Maillard reaction induced oligomerisation. *Food Research International*. Volume 43 (4). 1155-1166
- Hofmann T. 1998. 4-alkylidene-2-imino-5-[4-alkylidene-5-oxo-1,3-imidazol-2-ynyl]aza- methylidene-1,3-imidazolidine-A novel colored substructure in melanoidins formed by Maillard reactions of bound arginine with glyoxal and furan-2-carboxaldehyde. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 46. 3896-3901.
- Hodge J. E. 1953. Dehydrated foods : chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1(15). 928-943.

- Huang D., Boxin O. and Prior R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 53. 1841-1856.
- Hwang I.G., Kim H.Y., Woo K.S., Lee J; and Jeong H.S. 2011. Biological activities of Maillard reaction products (MRPs) in a sugar-amino acid model system. *Food chemistry*. 126. 221 – 227.
- Hwang I.G., Kim H.Y., Lee S.H., Woo K.S., Ban J.O., Hong J.T., Yu K.W., Lee J. and Jeong H.S. 2012. Isolation and identification of an antiproliferative substance from fructose-tyrosine Maillard reaction products. *Food chemistry*. 130. 547 – 551.
- Iwan M., Vissers Y.M., Fiedorowicz E., Kostyra H., Kostyra E., Savelkoul H.F.J. and Wichers H.J. 2011. Impact of Maillard Reaction on Immunoreactivity and Allergenicity of the Hazelnut Allergen Car a 11. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 59. 7163 – 7171.
- Jamdar S.N., Rajalakshmi V., Pednekar M.D., Juan F., Yardi V. and Sharma A. 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food chemistry*. 121. 178-184.
- Jiménez-Castaño L., Villamiel M. Martín Álvarez J., Olano A. and Lopez-Fandiño R. 2005. Effect of the dry-heating conditions on the glycosylation of β -lactoglobulin with dextran through the Maillard reaction. *Food Hydrocolloids*. 19. 831 – 837.
- Jiménez-Castaño L., Villamiel M. and Lopez-Fandiño R. 2007. Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. *Food Hydrocolloids*. 21. 433 – 443.
- Jing H; and Kitts D.D. 2000. Comparison of antioxidative and cytotoxic properties of Glucose-lysine and fructose-lysine Maillard reaction products. *Food research international*. 33. 509 – 516.
- Jing H; and Kitts D.D. 2002. Chemical and Biochemical properties of casein-sugar Maillard reaction products. *Food and chemical Toxicology*. 40. 1007 – 1015.
- Jing H; and Kitts D.D. 2004. Chemical characterization of different casein-sugars Maillard reaction products. *Food and chemical Toxicology*. 42. 1833 – 1844.
- Jomova K. and Vlako M. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 283 (1-2). 65-87.
- Kabalnov A.S., Pertzov A.V. and Shchukin E.D. 1987. Ostwald ripening in emulsions: I. Direct observations of Ostwald ripening in emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 118 (2). 590-597.
- Kagami K., Onda K., Oka K. and Hirano T. 2008. Suppression of blood lipid concentrations by volatile Maillard reaction products. *Nutrition*. 24. 1159 – 1166.
- Kato A. 2002. Industrial applications of Maillard-type protein-polysaccharide conjugates. *Food science and technology research*. 8(3). 193-199.
- Kato H., kim S.B., hayase F. and Chuyen N.V. 1985. Desmutagenicity of melanoïdins against mutagenic pyrolysate. *Agricultural and biological chemistry*. 49(10). 3093 – 3095.
- Kato A., Sasaki Y., Furuta R., and Kobayashi K. 1990. Functional protein-polysaccharide conjugate prepared by controlled dry-heating of ovalbumin -dextran mixture. *Agricultural and biological chemistry*. 54. 107-112.

- Kawai K., Hagiwara T., Takai R., Suzuki T. 2005. The rate of non-enzymatic browning reaction in model freeze dried food system in the glassy state. *Innovative Food Science and Emerging Technology*. 6. 346-350.
- Kikugawa K., Kazuyuki H., Kato T. and Yanagawa H. 2000. Effect of food reductones on the generation of the pirazine cation radical and on the formation of the mutagens in the reaction of Glucose, glycine and creatinine. *Mutation Research*. 465. 183 – 190.
- Kim S.Y., Je J.Y. and Kim S.K. 2007a. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 18. 31-38.
- Kim G.N., Jang H.D. and Kim C.I. 2007b. Antioxidant capacity of caseinophosphopeptides prepared from sodium caseinate using Alcalase. *Food Chemistry*. 104. 1359-1365.
- Kim S.K., Kim Y.T., Byun H.G., Nam K.S., Joo D.S. and Shahidi F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska Pollack skin. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 49. 1984-1989.
- Kim JS and Lee Y.S. 2009a. Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from aqueous Glucose/glycine, diglycine, and triglycine model systems as a function of heating time. *Food chemistry*. 116. 227-232.
- Kim J.S. and Lee Y.S. 2009b. Study of Maillard reaction products derived from aqueous model systems with different peptide chain lengths. *Food chemistry*. 116. 846 – 853.
- Kitts D.D. 2005. Antioxydant properties of casein-phosphopeptides. *Trends in Food Science & Technology*. 16. 549-554.
- Klompong V., benjakul S., Kantachote D. and shahidi F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and the enzyme type. *Food chemistry*. 102. 1317 – 1327.
- Kristinsson H. G. et Rasco B. A. 2000. Biochemical and functional properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48(3). 657-666.
- Langley-Evans S.C. 2000. Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 51. 181-188.
- Langner E., Nunes F.M., Pozarowski P., Kandefler-Szerszen M., Pierzynowski S.G. and Rzeski W. 2011 Antiproliferative Activity of Melanoidins Isolated from Heated Potato Fiber (Potex) in Glioma Cell Culture Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59. 2708 – 2716.
- Lan X., Liu P., Xia S., Jia C., Mukunzi D., Zhang X., Xia W., Tian H. and Xiao Z. 2010. Temperature effect on the non-volatile compounds of Maillard reaction products derived from Xylose–soybean peptide system: Further insights into thermal degradation and cross-linking. *Food chemistry*. 120. 967 – 972.
- Laroque D., Inisan C., Berger C., Vouland E., Dufossé L. and Guerard F. 2008. Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of the sugar reactivity. *Food Chemistry*. 111. 1032 – 1042 .

- Lawal O.S. 2004. Functionality of African locust bean (*Parkia biglobossa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food chemistry*. 86. 345-355.
- Le T.T, Bhandari B. and Deeth H.C. 2011. Chemical and physical changes in Milk protein concentrate (MPC80) powder during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59. 5465-5473.
- Lee S.M., Jo Y.J and Kim Y.S. 2010. Investigation of the aroma-active compounds formed in the Maillard reaction between glutathione and reducing sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58. 3116 – 3124.
- Lee S.W, Shimizu M., Kaminogawa S., Yamauchi K. 1987. Emulsifying properties of a mixture of peptides derived from the enzymatic hydrolysates of bovine caseins. *Agricultural and biological Chemistry*. 51(6). 1535-1540.
- Le Neindre B. Tensions superficielles et interfaciales. *Techniques de l'ingénieur - K475 – 1993*.
- Lertittikul W., Benjakul S. and Tanaka M. 2007. Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-Glucose model system as influenced by pH. *Food Chemistry*. 100. 669 – 677.
- Li C.P., Enomoto H., Hayashi Y., Zhao H. and Aoki T. 2010. Recent advances in phosphorylation of food proteins: a review. *LWT – Food Science and Technology*. 43. 1295 – 1300
- Li C.P, Hayashi Y., Enomoto H., Hu F. Sawano Y., Tanokura M. and Aoki T. 2009a. Phosphorylation of proteins by dry-heating in the presence of pyrophosphate and some characteristics of introduced phosphate groups. *Food chemistry*. 114. 1036 – 1041.
- Li C.P, Ibrahim H.R., Sujimoto Y. Hatta H. and Aoki T. 2004. Improvement of functional properties of egg white protein through phosphorylation by dry-heating in the presence of pyrophosphate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52. 5752 – 5758.
- Li Y., Lu F., Luo c., Chen Z., Mao J., Shoemaker C., Zhong F. 2009b. Functional properties of the Maillard reaction products of rice protein with sugar. *Food chemistry*. 117 (1). 69 – 74.
- Lindmark-Månsson H. and Åkesson B. 2000. Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*. 84. suppl. 1. S103-110.
- Liu, Y., & Kitts, D.D., Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews, *Food Research International* (2011), doi:10.1016/j.foodres.2010.12.037
- Liu Y., Zhao G., Zhao M., Ren J. and Yang B. 2012. Improvement of functional properties of peanut protein isolate by conjugation with dextran through Maillard reaction. *Food chemistry*. 131. 901-906.
- Lu C.Y., Hao Z.G., Paine R. and Ho C.T. 2005. Effect of water content on volatile generation and peptide degradation in the Maillard reaction of glycine, diglycine and triglycine. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 53 (16). 6443 – 6447.
- MacDonalds-Wicks L.K., Wood L.G and Garg M.L. 2006. Methodology for the determination of biological antioxydant activity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86 (13). 2045-2056
- Maillard L.C. 1912. Action des acides amines sur les suvres : formation des mélanoidines par voie méthodique. *Compte rendu de l'Académie des Sciences*. 154. 66-68.

- Maillard M.N., Billaud C., Chow Y.N., Ordonaud C. and Nicolas J. 2007. Free radical scavenging, inhibition of polyphenoxidase activity and copper chelating properties of model Maillard systems. *LWT*. 40. 1434-1444.
- Manoj P., Fillery-Travis A.J., Watson A.D., Hibbert D.J. and Robins M.M. 1998. Characterization of a depletion-flocculated polydisperse emulsion. II Steady-state rheological investigations. *Journal of colloid and interface science*. 207. 293-293.
- Manoj P., Fillery-Travis A.J., Watson A.D., Hibbert D.J. and Robins M.M. 2000. Characterization of a polydisperse depletion-flocculated emulsion. III Oscillatory rheological measurements. *Journal of colloid and interface science*. 228. 200-206.
- Manzocco L., Calligaris S., Mastrocola D., Nicoli M.C. and Lericci C.R. 2001. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food science and technology*. 11. 340-346
- Martins S.I.F.S, Jonguen W.M.F and Van Boeke MA. 2001. A review of Maillard reaction in food and implication to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology*. 11. 364-373.
- Martins S.I.F.S., and Van Boekel M.A.J.S. 2005. Kinetics of the Glucose/glycine Maillard reaction pathways: influences of pH and reactant initial concentrations. *Food chemistry*. 92. 437 – 448.
- Matemu A.O , Kayahara H., Murasawa H. And Nakamura S. 2008. Importance of size and charge of carbohydrate chains in the preparation of functional glycoproteins with excellent emulsifying properties from tofu whey. *Food chemistry*. 114 (4). 1328-1334
- McClements D.J. 2004. Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid and interface science*. 9. 305-313.
- Medrano A., Abirached C., Panizzolo L., Moyna P. and Añón M.C. 2009. The effect of glycation on foam and structural properties of β -lactoglobulin. *Food chemistry*. 113. 127 – 133.
- Medrano A., Abiracheb C., Moyna P., Panizzolo L. and Añón M.C. 2012. The effect of glycation on oil–water emulsion properties of β -lactoglobulin. *LWT - Food Science and Technology*. 45 (2). 253-260.
- Mendis E., Rajapakse N., Byun H.G. and Kim S.K. 2005. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life sciences*. 77. 2166-2178
- Mesa M., Silván J.M., Olza J., Gil A. and Del Castillo M.D. 2008. Antioxidant properties of soy protein–fructooligosaccharide glycation systems and its hydrolyzates. *Food research international*. 41. 606-615.
- Miralles B., Martinez-Rodriguez A., Santiago A. van de Lagemaat J. and Heras A. 2007. The occurrence of a Maillard-type protein-polysaccharide reaction between β -lactoglobulin and chitosan. *Food Chemistry*. 100. 1071-1075.
- Moates G.K., Watson A.D. and Robins M.M. 2001. Creaming and oscillation rheology of weakly flocculated concentrated emulsions. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*. 190. 167-178.
- Monnier V.M., Sell D.R., Wu X; and Rutter K. 2002. The prospects of health and longevity from the inhibition of the Maillard reaction in vivo. *International Congress Series*. 1245. 9 -19.

- Moon J.K. and Shibamoto T. 2011. Formation of carcinogenic 4(5)-Methylimidazole in Maillard reaction systems. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. 59. 615 - 618.
- Morales F.J., Fernández-Fraguas C. and Jiménez-Pérez S. 2005. Iron-binding ability of melanoidins from food and model systems. *Food chemistry*. 90. 821-827.
- Morales F.J. and Jiménez-Pérez. 2001. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food chemistry*. 72(1). 119-125.
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Domínguez J.M., Sineiro J., Domínguez H., Núñez M.J. and Parajó J.C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72. 145-171.
- Moure A., Domínguez H. and Parajó J.C. 2006. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process biochemistry*. 41. 447 -456.
- Mu T.H, Tan S.S., Chen J.W. and Xue Y.L. 2009. Effect of pH and NaCl/CaCl₂ on the solubility and emulsifying properties of sweet potato protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 89. 337-342.
- Mu M., Pan X., Yao P. and Jiang M. 2006. Acidic solution properties of β -casein-graft-dextran copolymer prepared through Maillard reaction. *Journal of colloid and interface science*. 301. 98-106.
- Nackta F., Chobert J.M., Burova T., Leonil J. et Haertle F. 1998. Induction of new physicochemical and functional properties by the glycosylation of whey protein. *Journal of protein chemistry*. 17. 495 – 503.
- Nakamura S., Suzuki Y., Ishikawa E., Yakushi T., Jing H., Miyamoto T. and Hashizume K. 2008. Reduction of *in vitro* allergenicity of buckwheat Fag e 1 through the Maillard-type glycosylation with polysaccharides. *Food chemistry*. 109. 538 – 545.
- Nalinanon S., Benjakul S., Kishimura H. and Shahidi. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food chemistry*. 124. 1354 – 1362.
- Nazeer R.A., Sampath Kumar N.S. and Jaiganesh R. 2012. *In vitro* and *in vivo* studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the croaker (*Otolithes ruber*) muscle protein hydrolysate. *Peptides*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.03.028>
- Neiryck N., Van der Meeren P., Gorbe S.B., Dierckx S. and Dewettinck K. 2004. Improved emulsion stabilizing properties of whey protein isolate by conjugation with pectins. *Food hydrocolloids*. 18. 949-957.
- Ngo D.H., Qian Z.J., Ryu B.M., Park J.W. and Kim S.K. 2010. *In vitro* antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *Journal of functional foods*. 2. 107-117.
- Okada Y. and Okada M. 1998. Scavenging effect of water soluble proteins in broad beans on free radicals and activr oxygen species. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 46. 401-406
- Oliver C.M., Melton L.D. and Stanley R.A. 2006. Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*. 46. 337 – 350.

- O'regan J. and Mulvihill D.. 2010. Sodium caseinate–maltodextrin conjugate hydrolysates: Preparation, characterisation and some functional properties. *Food chemistry*. 123. 21 – 31.
- Osmond D.W.J., Vincent B. and Waite F.A. 1975. Steric stabilization: a reappraisal of current theory. *Colloid and polymer science*. 253. 676 – 682.
- Oyaizu M. 1986. Antioxydant activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 35. 771-775.
- Pacheco-Aguilar R., Mazorra-Manzano M.A. and Ramírez-Suárez J.C. 2008. Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food chemistry*. 109. 782 – 789.
- Pan G.G., Melton L.D. 2007. Nonenzymatic browning of lactose and caséinate during dry heating at different relative humidities. *Journal of agricultural and food chemistry*. 55 (24). 10036-10042.
- Pearce K.N. and Kinsella J.E. 1978. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. . *Journal of Agricultural and food Chemistry*. 26 (3). 716 – 723.
- Peña-Ramoz E.A., Xiong Y.L. and Arteaga G.E. 2004. Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84. 1908-1918.
- Pihlanto A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*. 16. 1306-1314.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O., 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16. 233-239.
- Pintéa A., Rugină D.O., Pop R., bunea A. and Socaciu C. 2011. Xanthophylls protect against induced oxidation in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Journal of food composition and analysis*. 24 (6). 830-836.
- Prior R.L., Wu X. and Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxydant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and food Chemistry*. 53 (10). 4290-4302.
- Qin L., Zhu B.W., Zhou D.Y., Wu H.T., Tan H., Yang J.F., Li D.M., Dong X.P. and Murata Y. 2011. Preparation and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from purple sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad. *LWT – Food Science and Technology*. 44. 1113-118.
- Rajapakse N., Mendis E., Jung W.K., Je J.Y. and Kim S.K. 2005. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*. 38. 175-182.
- Ramonaitytė D.T., Keršienė M., Adams A., Tehrani K.A. and De Kimpe R. 2009. The interaction of metal ions with Maillard reaction products in a lactose–glycine model system. *Food research international*. 42. 331 – 336.
- Rangsansarid J., Cheetangdee N., Kinoshita N. and Fukuda K. 2008. Bovine serum Albumin-sugar conjugates through the Maillard reaction: effects on interfacial behavior and emulsifying ability. *Journal of Oleo science*. 57 (10). 539-547.
- Rawel .M., Kroll J; and Kulling S. 2007. Effect of non-protein components on the degradability of proteins. *Biotechnology advances*. 25. 611 – 613.

- Ren J., Zhao M., Shi J., Wang J., Jiang Y., Cui C., Kakuda Y. and Xue S.J. 2008. Optimization of antioxidant peptide production from grass carp sarcoplasmic protein using response surface methodology. *LWT – Food science and Technology*. 41. 1624-1632
- Rendelman J.A. and Inglett G.E. 1990. The influence of Cu²⁺ in the Maillard reaction. *Carbohydrate Research*. 201. 311-326
- Rietjens I.M.C.M., Boersma M.G., De Haan L., Spenkelink B., Awad H.M., Cnubben N.H.P., Van Zanden J.J., Van der Woude H. Alink G.M. and Koeman J.H. 2002. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidant vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 11. 321-333.
- Rizzi G.P. 2004. Role of phosphate and carboxylate ions in Maillard browning. *Journal of Agricultural and food Chemistry*. 52. 953-957.
- Robert L., Labat-Robert J. and Robert A.M. 2010. The Maillard reaction. From nutritional problem to preventive medicine. *Pathologie Biologie*. 58. 200 – 206.
- Robert L., Robert A.M. and Labat-Robert J. 2011a. The Maillard reaction – Illicite (bio)chemistry in tissues and food. *Pathologie Biologie*. Doi:10.1016/j.patbio.2011.04.007.
- Robert L., Robert A.M. and Labat-Robert J. 2011b. The Maillard reaction. From nutritional problems to preventive medicine. *Pathologie Biologie*. 58. 200 – 206.
- Robins M.M. 2000. Emulsions - -creaming phenomena. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 5: 265 – 272.
- Rodriguez Patino J.M, Carrera Sanchez C., and Rodriguez Niño M.R. 2008. Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations. *Advances in colloid and interface science*. 140. 95-113.
- Rufian-Henares J.A. and De la Cueva S.P. 2009. Antimicrobial activity of Coffee mélanoidines _ A study of their metal-chelating properties. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57 (2). 432 – 438.
- Rufián-Henares J.A. and Morale F.J. 2006. A new application of a commercial microliter plate-based assay for assessing the antimicrobial activity of maillard reaction products. *Food research international*. 39. 33 – 39.
- Rufián-Henares J.A. and Morale F.J. 2007. Functional properties of melanoidins: in vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food research international*. 40. 995 – 1002.
- Rufián-Henares J.A. and Morale F.J. 2008. Antimicrobial activity of melanoidins against *Escherichia coli* is mediated by a membrane-damage mechanism. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56. 2357 – 2362.
- Saeki H. 1997. Preparation of neoglycoprotein from carp myofibrillar protein by Maillard reaction with Glucose: biochemical properties and emulsifying properties. *Journal of agricultural and food chemistry*. 45 (3). 680-684.
- Salager, J. L. (2000). "Emulsion properties and related know-how to attain them." *Drugs and Pharmaceutical Science Series*. 105(3). 73-125.
- Sampath Kumar N.S., Nazeer R.A. and Jaiganesh R. 2011. Purification and biochemical characterization of antioxidant peptide from horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) viscera protein. *Peptides*. 32. 1496-1501.

- Sandwick R., Johanson M. and Breuer E. 2005. Maillard reactions of ribose 5-phosphate and amino acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1043. 85-96.
- Sathivel S., Yin H., Bechtel P.J. and King J.M. 2009. Physical and nutritional properties of catfish roe spray dried protein powder and its application in an emulsion system. *Journal of food engineering*. 95. 76-81.
- Scaman C., Nakai S. and Aminlari M. 2006. Effect of pH, temperature and sodium bisulfite or cysteine on the level of Maillard-based conjugation of lysozyme with dextran, galactomannan and mannan. *Food chemistry*. 99. 368 – 380.
- Shepard R., Robertson A., and Ofman D. 2000. Dairy glycoconjugate emulsifiers : Casein-maltodextrins. *Food Hydrocolloids*. 14. 281-286.
- Semenova M.G., Antipova A.S. and Belyakova L.E. 2002. Food protein interactions in sugar solutions. *Current Opinion in colloid and interface science*. 7. 438-444.
- Sinha R., Radha C., Prakash J. and Kaul P. 2007. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food chemistry*. 101. 1484-1491.
- Šližytė R, Mozuraitytė R., Martínez-Alvarez O., Falch E., Fouchereau-Peron M. and Rustad T. 2009. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. *Process Biochemistry*. 44. 668-677.
- Srinivas S. and Prakash V. 2010. Bioactive Peptides from Bovine Milk α -Casein: Isolation, Characterization and Multifunctional properties. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 16. 7-15
- Su G., Zheng L., Cui C., Yang B., Ren J. and Zhao M. 2011. Characterization of antioxidant activity and volatile compounds of Maillard reaction products derived from different peptide fractions of peanut hydrolysate. *Food research international*. 44. 3250-3258.
- Suetsuna K., Ukeda H. and Ochi H. 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 11. 128-131.
- Sumaya-Martinez M.T., Thomas S., Linard B., Binet A. and Guerard F. 2005. Effect of Maillard reaction conditions on browning and antiradical activity of sugar-tuna stomach hydrolysate model system. *Food Research International*. 38. 1045-1050.
- Sun Y., Hayakawa S., Puangmanee S. and Izumori. 2006. Chemical properties and antioxidative activity of glycated α -lactalbumin with a rare sugar, D-allose, by Maillard reaction. *Food chemistry* 95. 509-517.
- Suyama K., Yoshioka M., Akagawa M., Murayama Y., Horii H., Takata M., Yokoyama T. and Mohri S. 2007. Prion inactivation by the Maillard reaction. *Biochemical and biophysical Research Communication*. 356. 245 – 248.
- Tadros T. 2004. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Advances in colloid and interface science*. 108 – 109. 227 – 258.
- Ter Haar R., Schols H.A. and Gruppen H. 2011. Effect of saccharide structure and size on the degree of substitution and product dispersity of α -Lactalbumin glycated via the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50. 9378 – 9385.
- Tessier F.J. 2010. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathologie biologique*. 58. 214 – 219.

- Thiansilakul Y., Benjakul S. and Shahidi F. 2007. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruads*). Food chemistry. 103. 1385-1394.
- Tressl R., Wondrak G. T., Krüger R.-P., Rewicki D. 1998. New melanoidin-like Maillard polymers from 2-deoxypentoses. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46: 104-110
- Tsakili E., Lagouri V. and Doxastakis G. 1999. Evaluation of the antioxidant of lupin seed flour and derivatives (*Lupinus albus*ssp. Graecus). Food Chemistry. 65. 71-75.
- Usui M., Shimizu T., Goto Y., Saito A. and Kato A. 2004. Effective reduction of antigenicity of hen egg lysozyme by site-specific glycosylation. FEBS Letters. 557 (1-3). 169 – 173.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M. and Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 39. 44-84.
- Van Aken G.A., Blijdenstein T.B.J. and Hotrum N.E. 2003. Colloidal destabilisation mechanisms in protein-stabilised emulsions. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 8. 371 – 379.
- Van Boekel M. A. J.S. 2001. Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review. Nahrung/Food. 45 (3). 150-159.
- Van de Lagemaat J., Silvan J.M., Moreno F.J., Olano A. and del Castillo M.D. 2007. Food research international. 40. 153 -160.
- Villaño D., Fernández-Pachón M.S., Troncoso A.M and García-Parrilla M.C. 2005. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. Analytica chimica acta. 538. 391-398.
- Vincent B. 1974. The effect of adsorbed polymers on dispersion stability. Advances in Colloid and Interface Science. 4. 193-277
- Wang Y., Juliani R., Simon J. E. and Ho C.T. 2008. Amino acid-dependent formation pathways of 2-acetylfuran and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanone in the Maillard reaction. Food chemistry. 115 (1). 233 – 237.
- Wang H.Y., Qian H. Yao W.R. 2011. Melanoidins produced by the Maillard reaction: structure and biological activity. Food chemistry. 128. 573-584.
- Watkins N., Neglia-Fischer C., Dyer D., Suzanne R., Thorpe R. and Baynes J. 1987. Effect of phosphate on the kinetics and specificity of glycation of protein. Journal of Biological Chemistry. 262 (15). 7207-7212.
- Wijewickreme A. N., Krejpcio Z. et Kitts D. D. 1999. Hydroxyl scavenging activity of Glucose, fructose, and ribose-lysine model Maillard products. Journal of Food Science. 64(3). 457 - 461.
- Wilde P., Mackie A., Husband F., Gunning P. and Morris V. 2004. Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. Advances in Colloids and Interface Science. 1008-109. 63-71
- White K.L., Bell L.N. 1999. Glucose loss and Maillard browning in solids as affected by porosity and collapse. Journal of food science. 64. 1010-1014.

- Wong B.T., Day L. and Augustin M.A.. 2011. Deamidated wheat protein-dextran Maillard conjugates: Effect of size and location of polysaccharide conjugated on steric stabilization of emulsions at acidic pH. *Food hydrocolloids*. 25. 1424 - 1432
- Wooster T.J and Augustin M.A. 2006. β -Lactoglobulin-dextran Maillard conjugates: Their effect on interfacial thickness and emulsion stability. *Journal of Colloids and Interface Science*. 303. 564-572
- Wooster T.J and Augustin M.A. 2007a. The emulsion flocculation stability of protein-carbohydrate diblock copolymers. *Journal of colloid and interface science*. 313. 665 – 675.
- Woster T.J. and Augustin M.A. 2007b. Rheology of whey-protein-dextran conjugate film at the air/water interface. *Food hydrocolloids*. 21. 1072-1080.
- Wu H.C, Shiau C.Y, Chen H.M. and Chiou T.K. 2003. Antioxydant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combinaison. *Journal of Food and Drug Analysis*. 11(2). 148-153.
- Yang J.I., Ho H.Y., Chu Y.J. and Chow C.J. 2008. Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food chemistry*. 110. 128-136.
- Yaylayan V. A. 1990. In search of alternative mechanisms for the Maillard reaction. *Trends in Food Science and Technology*. 1. 20-22.
- Yaylayan V.A. 1997. Classification of the Maillard reaction: a conceptual approach. *Trends in food science and technology*. 8. 13-18.
- Yaylayan V. A., Kaminsky E. (1998). Isolation and structural analysis of Maillard polymers: caramel and melanoidin formation in glycine/Glucose model system. *Food Chemistry*. 63. 25-31
- Xu C., Yang X. Yu S., Qi J., Guo R., Sun W., Yao Y and Zhao M. 2010. The effect of glycosylation with dextran chain differing lengths on the thermal aggregation of β -conglycinin and glycinin. *Food research international*. 43. 2270 – 2276.
- Zhang T., Li Y., Miao M. and Jiang B. 2011. Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium L.*) protein hydrolysates. *Food chemistry*. 128. 28-33.
- Zhang, J.-B., Wu, N.-N., Yang, X.-Q., He, X.-T., Wang, L.-J. 2012. Improvement of emulsifying properties of Maillard reaction products from β -conglycinin and dextran using controlled enzymatic hydrolysis, *Food Hydrocolloids*, doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.01.006.
- Zhao H., Dong J., Lu J., Chen J., Li Y., Shan L., Lin Y., Fan W. and Gu G. 2006. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in Barley (*Hordeum vulgare L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54. 7277-7286
- Zhao L., Wang Z. and Xu S.Y. 2007. Preparation of casein phosphorylated peptides and casein non-phosphorylated peptides using alcalase. *European Food Research and Technology* 225. 579-584.

Ouvrages :

- Cheftel J.L., Cuq J.L and Lorient D. 1985. Protéines alimentaires. Biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle, Modifications chimiques. Paris. Lavoisier. 309 p.
- Davidek T. and Davidek J. 2004. Chemistry of the Maillard reaction in Food. In Chemical and functional properties of food saccharides. (Ed. P. Tomasik) CRC Press. 291-314.
- Dufossé L. 2004. Pigments in Food more than colrs... Quimper. Université de Bretagne Occidentale. 414p
- McClements D.J. 1999. Food emulsions. Principles, practice and techniques. CRC press. 378p.

Thèses:

- Allouche Joachim. 2003. Développement de nouvelles méthodes pour l'élaboration d'émulsions multiples eau/huile/eau. Doctorat de Génie des procédés. Institut national polytechnique de Lorraine. 174p
- Chabeaud Aurélie. 2008, Production de peptides de lieu noir dotés d'une capacité antioxydante par hydrolyse enzymatique en réacteur discontinu et fractionnement sur membrane. Doctorat de génie des procédés. Université de Bretagne Sud et université de Bretagne Occidentale. 243p.
- Laroque D., (thèse UBO), 12 décembre 2008, « Mise au point d'un ingrédient antioxydant issu de la réaction contrôlée entre un hydrolysats protéique et un sucre ».
- Monteux Cécile. 2004. Adsorption et rhéologie interfaciale de complexes polyélectrolytes/tensioactifs. Doctorat de physique des liquides. Université Paris VI. 247p.
- Rodriguez Rojas, Maria Patricia, 2007, Emulsification en cuve agitée : Rôle du protocole opératoire sur l'inversion de phase catastrophique. Doctorat de génie des procédés et de l'environnement. Institut national polytechnique de Toulouse. 191p
- Sumaya Martinez Maria Teresa. 2004. « Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes : Etude de l'activité antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glycation ». Doctorat de biologie. Université de Bretagne occidentale. 188p

Norme:

CODEX STAN 192-1995 - NORME GÉNÉRALE CODEX POUR LES ADDITIFS ALIMENTAIRES (p149).

Site web:

<http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e00.htm> The state of world Fisheries and Aquaculture 2010 (rapport FAO)

<http://www.oracvalues.com/>

USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2 - May 2010. Nutrient Data Laboratory, Agriculture Research Service, US Department of Agriculture.

Etude et optimisation des propriétés technofonctionnelles et biologiques de co-produits marins ayant subi une hydrolyse enzymatique suivie d'une glycation

Résumé :

Pour répondre aux attentes des consommateurs, l'industrie agro-alimentaire mise sur l'innovation qui reste le vecteur principal de croissance et de différenciation des entreprises. Celles-ci sont en permanence à la recherche de nouveaux ingrédients. Elles visent ainsi la production d'aliments innovants dotés de structures complexes, dont les émulsions font partie. Ces dernières sont d'ailleurs largement répandues dans le domaine de l'agro-alimentaire. Cependant, au cours de leur fabrication ou de leur stockage, ces émulsions sont soumises à des phénomènes concomitants de déstabilisation et d'oxydation, palliés par la présence d'additifs le plus souvent d'origine chimique. Or, les consommateurs recherchent désormais des produits alimentaires contenant des substances naturelles, voire exempts d'additifs (clean label). La recherche de nouveaux ingrédients d'origine naturelle est donc un défi majeur pour les industriels de l'agro-alimentaire, et suscite un intérêt croissant. Les pistes explorées sont nombreuses, et parmi celles-ci, la réaction de glycation ou réaction de Maillard (RM) appliquée à des protéines ou des mélanges peptidiques. En effet, la RM peut s'avérer potentiellement intéressante pour renforcer la capacité antioxydante et/ou les propriétés technofonctionnelles, dont les propriétés émulsifiantes, de substrats protéiques.

Dans ce contexte, nous avons cherché à optimiser les propriétés émulsifiantes et antioxydantes de deux substrats protéiques par la RM en conditions contrôlées et en présence de différents glucides. Du caséinate de sodium et un hydrolysate de coproduits de crevette ont été choisis. Le premier substrat est utilisé comme protéine de référence, car il est couramment employé dans l'industrie comme agent émulsifiant, et le second est étudié dans l'optique d'une valorisation des co-produits de la pêche. En effet, l'hydrolyse enzymatique constitue une approche d'un intérêt stratégique majeur pour réhabiliter la fraction protéique des coproduits marins.

Nous avons réalisé des RM entre l'hydrolysate de crevette et trois concentrations différentes de xylose. Nous avons ainsi montré que l'augmentation de la concentration en xylose entraîne une diminution logarithmique du nombre de fonctions aminées restantes après RM. Ceci indique que la concentration en xylose initialement utilisée était limitante. Des analyses chromatographiques montrent que l'utilisation de concentrations plus importantes en xylose semble privilégier l'apparition de composés aromatiques de faible poids moléculaire (< 250 Da). Par ailleurs, l'augmentation de la concentration en xylose lors de la RM avec l'hydrolysate de crevette modifie les propriétés rhéologiques des émulsions à 0,5 % et pH 7. Enfin, la capacité antioxydante des hydrolysats de crevette issus de la RM augmente lorsque la concentration en xylose utilisée est croissante dans le milieu réactionnel.

En conclusion, notre étude a permis de produire, à partir de deux substrats protéiques modifiés par RM en conditions contrôlées à 50°C, des ingrédients potentiellement bifonctionnels, montrant à la fois des propriétés émulsifiantes et antioxydantes.