



HAL
open science

Conception d'un aliment fonctionnel céréaliier probiotique, enrichi en caroténoïdes et phytostérols : stabilité, bioaccessibilité et absorption intestinale des composés liposolubles

Magali Gies

► **To cite this version:**

Magali Gies. Conception d'un aliment fonctionnel céréaliier probiotique, enrichi en caroténoïdes et phytostérols : stabilité, bioaccessibilité et absorption intestinale des composés liposolubles. Alimentation et Nutrition. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTG063 . tel-03095829

HAL Id: tel-03095829

<https://theses.hal.science/tel-03095829>

Submitted on 4 Jan 2021

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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Science des Aliments et Nutrition

École doctorale GAIA – Filière APAB - Agroressources, Procédés, Aliments, Bioproduits
Unité de Recherche “Démarche intégrée pour l’obtention d’aliments de qualité”
UMR95 QualiSud (CIRAD Montpellier)

Conception d’un aliment fonctionnel céréaliier probiotique, enrichi en caroténoïdes et phytostérols : stabilité, bioaccessibilité et absorption intestinale des composés liposolubles

Présentée par Magali GIES
Le 29 Novembre 2019

Sous la direction de Claudie DHUIQUE-MAYER

Devant le jury composé de

Sylvie MARCHESSEAU, Professeur, Université *Montpellier*
Edmond ROCK, Directeur de Recherche, INRA *Clermont-Ferrand*
Patrick BOREL, Directeur de Recherche, INRA *Marseille*
Jean-Christophe MEILE, Chercheur, CIRAD *La Réunion*
Claudie DHUIQUE-MAYER, Chercheur HDR, CIRAD *Montpellier*

Présidente du Jury
Rapporteur
Examineur
Invité
Directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Difficile d'exprimer en quelques lignes tout ce qui nous traverse durant cette belle et douloureuse expérience, et de résumer ce que je souhaiterais dire à toutes les personnes qui m'ont aidée, soutenue, portée, supportée aussi... et qui ont participé, directement ou indirectement, au bon déroulement de ces 3 années de thèse. Je tiens à leur exprimer du fond du cœur toute ma reconnaissance et ma gratitude, pour leur présence, leur soutien, leur aide, leurs mots, et tout ce qui a pu contribuer à me faire tenir tout au long de ces travaux. Je m'excuse d'avance auprès de celles et ceux dont le nom n'apparaîtrait pas dans ces paragraphes, vous avez tous été précieux.

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements aux membres du jury, pour avoir accepté de juger ce travail. Merci aux rapporteurs, les Drs. Edmond ROCK et Frédéric CARLIN, d'avoir accepté de consacrer de votre temps à la critique constructive de ce travail de recherche. Merci également aux Pr. Sylvie MARCHESSEAU et au Dr. Patrick BOREL de faire partie de ce jury de thèse en tant qu'examineurs, mais aussi pour vos conseils et vos remarques constructives lors de nos discussions dans différents congrès ou rencontres scientifiques. Un merci particulier au Dr. Jean-Christophe MEILE, examinateur, pour son soutien et sa présence depuis de nombreuses années. Tu as toujours été de bon conseil, et ton amitié m'est précieuse.



J'adresse également mes remerciements à l'ED GAIA ainsi qu'à son Directeur Marc Bouvy et à l'Université de Montpellier de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma thèse sous sa tutelle. Je remercie également le CIRAD et tout particulièrement l'UMR QualiSud de m'avoir accueillie en son sein durant ces 3 ans, tout comme l'INTA de Buenos Aires qui m'a accueillie 3 mois. Merci beaucoup à Dominique PALLET et Thierry GOLI, respectivement Directeur et Directeur Adjoint de l'UMR QualiSud, de m'avoir toujours soutenue dans mes démarches. Un grand merci à l'École Internationale de Recherche Agreenium de m'avoir permis de participer à son programme doctoral et pour la délivrance de son Label d'Excellence. Merci Claude BERNHARD et Isabelle CAILLARD pour votre implication dans les conférences internationales et votre attitude amicale.



Mes remerciements vont également à la ComUE LR-Universités, aux organisateurs, aux formateurs et à tous les copains du Concours MT180. Merci Anne-Claire, Michel, Pascaline, Marc, Patrick... Nous avons passé de supers moments dans la bonne humeur, l'apprentissage, le théâtre, le stress et le rire !

Je souhaite sincèrement remercier du fond du cœur le Dr. Claudie DHUIQUE-MAYER, ma Directrice de thèse. Merci pour ta confiance, ton implication, ton dynamisme, ton aide et ta patience. Tu m'as beaucoup appris, et malgré quelques prises de tête, nos échanges ont toujours su être constructifs. Ta bonne humeur mais aussi ton pessimisme (raaah !), tes "papillonnages à mon bureau pour te dégourdir les jambes et me poser une question en même temps", ont été primordiaux à notre bonne entente et notre collaboration ! Tes petites attentions ont beaucoup compté (surtout quand tu me donnais des trucs à manger... mais aussi quand tu me demandais de dormir parce-que j'avais une sale tête). Merci pour tout, ma maman de thèse !



Toute ma gratitude envers Sylvie LORTAL, chercheur et encadrante. Merci pour ta disponibilité et ton amitié. Malgré la distance géographique, tu as su m'aiguiller plus d'une fois et apporter ton expertise en microbiologie et en protéines laitières. Sans cela, cet aliment ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui !

Toute ma reconnaissance envers Adrien SERVENT, Technicien au laboratoire (ou Ingénieur agronome, ça dépend). Sans toi, ma thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui. Tu m'as apporté tellement, tant d'un point de vue scientifique que psychologique. Tu as su être présent à chaque moment difficile pour me remonter le moral, mais aussi pour te moquer allègrement de mes (piètres) compétences en mathématiques. Grâce à toi, j'ai appris, entre autres, que "Rien est impossible !". Merci.



Je remercie chaleureusement Marie-Pierre OBEDE, Secrétaire de Direction, Jocelyne MERIENNE, Assistante de l'équipe, et Karine ALARY, Technicienne. Merci Marie-Pierre pour ton aide précieuse pour l'édition de ce mémoire, ta relecture ultra efficace à la vitesse de l'éclair et tes encouragements toujours souriants. Merci Joce pour tes piques gratuites, tes blagues un peu (beaucoup ?) sales mais géniales, tes coups de téléphone en speed et tes coups de gueule hormonaux, tes mails de Mômman, ta présence, ta réactivité et ton énergie !



Merci Karine pour ta douceur, ta gentillesse, ta bienveillance sans limite, ton aide pour comprendre la fluo (ahah !), et notre ligue contre Adrien concernant les rangements des labos (il n'aura jamais gain de cause).

Un énorme merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler, de près ou de loin : Renaud (oui je suis partie, et même revenue !), Manu, Didier, Isa, Nelly, Christophe (Monsieur Banane), Nathalie, Joël (vraiment désolée pour les 4 fermenteurs... mais ton chat noir s'en va !), Léa, Christian Mestres, Christian Mertz ...

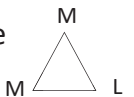


Merci à l'équipe de l'ITA-INTA et à Adriana DESCALZO pour son accueil, ainsi qu'aux membres de l'équipe : Sergio, Luciana, Sebastian, Carolina, Rafael, Trinidad, Silvina et tous les autres... Merci pour votre gentillesse et les nombreux apéros.

Un super merci aux copains Biovaliens, qui ont apporté bonne humeur et joie de vivre, dreadlocks et petit chien. Merci Laure-Anne (du Chââteau), Nico le zadiste (No pain, no gain – No break, no steak !), Rémi le polak. Vous êtes top, continuez à porter votre sourire, et à venir enquiquiner les doctorants du bureau 348. Franchement sans vous, ça nous aurait manqué !



Un merci géant à mes copains de galère, Lucie et Moez. On aura commencé ensemble, et on terminera ensemble ! Tous les mots du monde ne suffiraient pas à décrire nos galères, nos discussions interminables et nos fous-rires.



Je souhaite remercier les filles du bureau pour leur amitié et leur soutien. Sivmey, Sophie, Imane, bon courage pour la suite de vos thèses ! Vous allez gérer. Merci à Aurélie pour tes encouragements et tes potins, maman stagiaire courageuse, ma p'tite secrétaire ! Merci aux anciennes aussi, Auriane (tu m'as manqué !), Laura et Jessica. Je repenserai à nos hivers à 30 °C et nos étés à 15 °C (oui, le chauffage du bureau est réversible, et entre une brésilienne, une réunionnaise, une cambodgienne, une algérienne et une martiniquaise... pas facile de gérer la température !).



Merci aux copains de longue date, et à tous ceux rencontrés tout au long de ces trois ans. Vous m'avez tous apporté quelque chose de différent et de fort, et j'ai vécu auprès de vous des expériences géniales. Je pense à Tonton Lolo, Camille (ma p'tite KK), Éric (Rico les bons tuyaux), Serge Palu, Ben (et tes histoires à coucher dehors), Maxime (Kœur Kœur),



Manon, Céline (bière à 2 bouchons !), Abderahim, Didier, Michel, Leti, Didier Sess, Kumba, Larissa, Laura, Yasmine, Aly...

Je remercie aussi Fernando, Mariana et Marine, pour leurs stages effectués dans le cadre de ma thèse. Merci de votre sérieux, de votre implication et de votre écoute. Vous avez été supers ! Merci à Guillaume, Thomas, Ismérie, Florent, Charlotte, Johanna et tous les stagiaires qui ont contribué à faire vivre les étages de notre bâtiment pendant ces 3 ans. Spéciale dédicace à nos parties endiablées de MÖlkky !

J'adresse mes sincères remerciements à ma famille, mes parents, mon frère, mon grand-père, Charles, Alessandro, et à tous mes amis, musicos ou non, pour leur soutien indéfectible tout au long de ces trois ans. Mon absence a été longue, mes coups de gueule nombreux. Merci d'avoir été là, et de m'avoir aidée à remplir la poubelle à verre de bouteilles de bière vides. Merci de m'avoir préparé de bons petits plats et invitée à manger. Merci de vous être occupé de moi. Une mention spéciale à Lucie, ma Coupine de toujours, ma moitié de cerveau, comme ma sœur, mais en mieux. Jamais je n'aurai les mots pour nous qualifier tant nos liens sont étroits.



Enfin, et même s'ils ne liront pas ces lignes, j'espère qu'ils savent tout le bonheur, le soutien et l'amour qu'ils ont su m'apporter au cours de ces années : merci mes p'tits loups, mes bêtes, qui m'ont accompagnée. Merci Cheaper, pour tes câlins baveux, toujours heureux de me voir même si le temps nous manquait pour jouer à la balle, merci Clayton pour tes coups de dents en mode chonchon, merci Blip & feu Bubulle, merci Whooper et les poulettes Ginger & Co. Merci les toutous en garde à la maison pour l'avoir égayée.



Liste des Abréviations

ABCA1 /G5/G8	ATP binding cassette A1/G5/G8
ACAT	Acyl-CoA:cholestérol acyltransférase
ADF	Acid Detergent Fibre
ADL	Acid Detergent Lignin
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
Aw	Water Activity (Activité en eau)
BCO1/2	β -carotène oxygénase 1/2
BP	Basic Product
CASP	Caseinate Product
CD36	Cluster Determinant 36
DGAT1	Diacylglycérol acyltransférase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EIR-A	École Internationale de Recherche Agreenium
GRAS	Generally Regarded As Safe
HCl	Hydrochloric Acid (Acide chlorhydrique)
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
LDL	Low Density Lipoprotein
Log	Logarithme décimal
LRAT	Lécithine-rétinol acyltransférase
MeOH	Methanol
MRS	Rogosa and Sharpe Medium
NaCl	Chlorure de sodium
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NDF	Neutral Detergent Fibre
NPC1L1	Niemann-Pick C1-Like 1
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCA	Plate Count Agar Medium
PhytoD	Phytostérols dispersibles

Smet	Syndrome métabolique
SR-BI	Récepteur Scavenger de classe B de type I
THF	Tétrahydrofurane
TRIS	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UFC	Unité Formant Colonie
UPLC	Ultra high Performance Liquid Chromatography
v:v	volume:volume
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
vs	Versus
WPIP	Whey Protein Product

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classes d'aliments fonctionnels (d'après Siró <i>et al.</i> 2008).....	6
Tableau 2 : Exemples d'aliments traditionnels fermentés et leur origine ainsi que les souches de fermentation associées	10
Tableau 3 : Exemples de produits fonctionnels probiotiques laitiers	13
Tableau 4 : Exemples de produits fonctionnels probiotiques non laitiers	14
Tableau 5 : Facteurs à contrôler avant l'utilisation de souches probiotiques.....	27
Tableau 6 : Teneurs des caroténoïdes majoritaires dans certains fruits et légumes (d'après Maiani <i>et al.</i> (2009) et Fleshman <i>et al.</i> (2011)).....	31
Tableau 7 : Caroténoïdes possédant une activité provitaminique A. La valeur provitaminique est calculée relativement à celle du β -carotène	32

Liste des Figures

Figure 1 : Courbe générale de croissance microbienne représentant l'évolution du nombre N de bactéries par unité de volume en fonction du temps et où la phase exponentielle est caractérisée par un taux d'accroissement μ	19
Figure 2 : Quelques effets bénéfiques des probiotiques sur la santé	26
Figure 3 : Structures moléculaires des 3 phytostérols majoritaires et du cholestérol	28
Figure 4 : Structure chimique de quelques caroténoïdes majoritaires	30
Figure 5 : Schéma d'une micelle	35
Figure 6 : Absorption et métabolisme des caroténoïdes.....	36
Figure 7 : Voies d'absorption, de transport, et de sécrétion des caroténoïdes à travers l'entérocyte	41
Figure 8 : État physique des caroténoïdes dans les chromoplastes	44
Figure 9 : Absorption et métabolisme des stérols	47
Figure 10 : Procédé de fabrication du produit fonctionnel	55
Figure 11 : Protocole schématique de l'extraction des composés liposolubles	61
Figure 12 : Protocole schématique du modèle de digestion in vitro.....	62
Figure 13 : Jury CIRAD en cours d'analyse sensorielle de l'aliment.....	65

Valorisations scientifiques

Les résultats obtenus lors de ces travaux de thèse ont été valorisés sous forme de 5 communications (4 communications orales et 1 communication affichée) dans des congrès internationaux. Deux autres communications orales ont été présentées lors de la Journée de l'École Doctorale et d'un séminaire argentin. Ce travail de thèse m'a permis de participer à plusieurs concours et a été primé. Ces travaux ont également été valorisés par la rédaction de 3 publications dans des revues internationales à facteur d'impact (une publiée et deux en cours de soumission).

- **Poster** (Annexe 1)

Magali Gies, Adriana-Maria Descalzo, Adrien Servent, Claudie Dhuique-Mayer. **Stabilité et bioaccessibilité de phytomicronutriments liposolubles lors de la fabrication d'un aliment fermenté à base de maïs.** *JFN (Journées Francophones de la Nutrition) Nantes, France, 13-15 Décembre 2017*

- **Communications orales**

Magali Gies, Adriana Maria Descalzo, Sylvie Lortal, Jean-Christophe Meile, Claudie Dhuique-Mayer. **Design of a new functional fermented maize yogurt-like product containing phytosterols and papaya/melon extracts.** *2nd International Conference on Biologically Active Compounds in Food, Łódź, Poland, 8-10 November 2017*

Magali Gies, Adriana-Maria Descalzo, Adrien Servent, Claudie Dhuique-Mayer. **Nutritional values of a new functional and fermented yoghurt-like product from maize with added bioactive compounds: carotenoids, phytosterols and tocopherols.** *2nd International Conference on Food Science & Probiotics, Berlin, Germany, 06-08 August 2018*

Magali Gies, Adriana-Maria Descalzo, Adrien Servent, Claudie Dhuique-Mayer. **Interaction between carotenoids and phytosterols during *in vitro* digestion of a new functional fermented maize yoghurt-like product.** *2nd International Conference on Food Bioactives & Health, Lisbon, Portugal, 25-28 September 2018*

Magali Gies, Adriana-Maria Descalzo, Adrien Servent, Nelly Forestier-Chiron, Claudie Dhuique-Mayer. **Design and shelf-life of a new functional fermented food from maize enriched with bioactive compounds following an integrated approach.** *32nd EFFoST International Conference, Nantes, France, 06-08 November 2018*

- **Journée École Doctorale et séminaire**

Magali Gies, Sylvie Lortal, Jean-Christophe Meile, Claudie Dhuique-Mayer. **Design of a new functional fermented food based on maize and enriched with bioactive compounds (carotenoids and phytosterols)**. *Journée École Doctorale GAIA – Filière APAB, Montpellier, France, Juin 2019*

Magali Gies, Adrien Servent, Claudie Dhuique-Mayer. **Interactions between bioactive compounds during the *in vitro* gastroduodenal digestion of a functional fermented product based on maize**. *ITA-INTA, Buenos Aires, Argentine, Avril 2019*

- **Concours et Prix**

- **Ma thèse en 180 secondes : Finale Régionale** à l'Opéra Comédie de Montpellier (Mars 2018) – Annexe 7
- **Prix pour l'internationalisation des thèses**, dans la catégorie "Alimentation et Nutrition Humaines" décerné par Céréales Vallées, France (Août 2018) – Annexe 6
- Sélectionné pour faire partie des prix Innover 2019 du Concours National des Innovations en Argentine (Septembre 2019)

- **Publications**

Gies Magali, Adriana Maria Descalzo, Adrien Servent, Claudie Dhuique-Mayer. 2019. **Incorporation and stability of carotenoids in a functional fermented maize yogurt-like product containing phytosterols**. *LWT-Journal of Food Science and Technology* 111 (août): 105-10. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.103>.

Gies Magali, Adrien Servent, Patrick Borel, Claudie Dhuique-Mayer. 2019. **Phytosterols vehicles used in a functional product modify carotenoids/cholesterol bioaccessibility and uptake by Caco-2 cells**. *Soumise à Journal of Functional Foods, Septembre 2019*.

Gies Magali, Adrien Servent, Mariana Soledad Lingua, Nelly Forestier-Chiron, Claudie Dhuique-Mayer. 2019. **Sensorial and nutritional optimization of a functional fermented cereal yogurt-like product by using protein hydrolysates**. *Soumise à LWT- Journal of Food Science and Technology, Septembre 2019*.

Table des Matières

INTRODUCTION.....	1
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. GENERALITES SUR LES ALIMENTS FONCTIONNELS EN EUROPE ET DANS LE MONDE.....	4
1.1. Définition et législation	4
1.2. Objectifs et classement des aliments fonctionnels	5
1.3. Marché de l'offre et de la demande.....	6
1.4. Acceptabilité des aliments fonctionnels par les consommateurs.....	7
1.5. Aliments fonctionnels fermentés	8
1.5.1. Les aliments traditionnels : une inspiration pour les nouveaux produits fonctionnels.....	8
1.5.2. Les produits fonctionnels laitiers.....	13
1.5.3. Les produits fonctionnels non laitiers à base de céréales	14
1.6. Challenges technologiques pour la conception d'un aliment fonctionnel.....	16
1.6.1. Maîtrise de la fermentation	16
1.6.1.1. <i>La fermentation lactique</i>	16
1.6.1.2. <i>La modélisation microbienne et les paramètres de croissance</i>	17
1.6.2. Aspects liés au procédé de fabrication.....	20
1.6.2.1. <i>La fermentation par des souches probiotiques</i>	20
1.6.2.2. <i>L'incorporation des composés liposolubles</i>	21
1.6.2.3. <i>L'importance d'opérations unitaires spécifiques</i>	21
1.6.2.4. <i>Le transfert à l'échelle pilote, un passage essentiel</i>	22
2. EFFETS SANTE DES ALIMENTS FONCTIONNELS	24
2.1. Aliments fonctionnels avec probiotiques et /ou prébiotiques.....	24
2.1.1. Les probiotiques	24
2.1.1.1. <i>Les souches dites "probiotiques" : définition et physiologie digestive</i>	24
2.1.1.2. <i>Les effets santé des probiotiques dans les aliments fermentés</i>	25
2.1.2. Les prébiotiques	27
2.2. Aliments fonctionnels enrichis en phytomicronutriments et vitamines liposolubles.....	28
2.2.1. Les phytostérols.....	28
2.2.1.1. <i>Les stérols et les stanols : définition biochimique</i>	28
2.2.1.2. <i>Les effets santé des phytostérols sur l'organisme</i>	29
2.2.2. Les caroténoïdes.....	29
2.2.2.1. <i>Définition et classement</i>	30
2.2.2.2. <i>Les effets santé des caroténoïdes sur l'organisme</i>	31
3. METABOLISME D'ABSORPTION ET BIODISPONIBILITE DES MICRONUTRIMENTS LIPOSOLUBLES	34
3.1. La digestion des composés liposolubles : généralités	34
3.2. Le cas des caroténoïdes.....	35
3.2.1. Métabolisme d'absorption des caroténoïdes.....	35
3.2.2. Digestion gastro-duodénale des caroténoïdes.....	36
3.2.3. Absorption des caroténoïdes	37
3.2.3.1. <i>Transport apical à travers la membrane de la bordure en brosse d'un entérocyte</i>	38
3.2.3.2. <i>Transport cytosolique et métabolisme intracellulaire</i>	39

3.2.3.3.	Sécrétion à travers la membrane basolatérale de l'entérocyte.....	40
3.2.3.4.	Distribution tissulaire	41
3.3.	Les facteurs influençant la biodisponibilité des caroténoïdes : SLAMENGI.....	42
3.3.1.	La nature, la conformation et la quantité des caroténoïdes ingérés (S, L, A).....	42
3.3.2.	La matrice alimentaire (M)	43
3.3.3.	Les nutriments co-ingérés (E)	44
3.3.4.	Les facteurs humains (N, G, H)	46
3.3.5.	Les interactions entre facteurs (I).....	46
3.4.	Le cas des stérols	46
3.4.1.	Absorption des phytostérols végétaux et du cholestérol.....	46
3.4.2.	Distribution et excrétion des stérols	48
3.5.	Compétition et interactions entre les micronutriments	49
3.5.1.	Phytostérols vs cholestérol.....	49
3.5.2.	Caroténoïdes vs phytostérols	50

MATÉRIELS ET MÉTHODES.....52

1.	LES MATIERES PREMIERES	52
1.1.	Le matériel végétal	52
1.2.	Les autres ingrédients utilisés	52
1.3.	Les souches bactériennes	53
2.	LE PROCEDE DE FABRICATION	53
2.1.	La méthode de production	53
2.2.	L'optimisation de la formulation	56
2.3.	Les opérations unitaires : la pasteurisation et la fermentation	56
2.3.1.	La détermination des paramètres de croissance bactérienne	56
2.3.2.	La détermination du ratio de souches en fin de fermentation	57
2.3.3.	L'efficacité de la pasteurisation sur l'écologie microbienne du produit.....	57
3.	LES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES ET NUTRITIONNELLES.....	58
3.1.	Les solvants et réactifs.....	58
3.2.	L'analyse des macronutriments.....	58
3.3.	L'extraction et quantification des phytomicronutriments liposolubles	60
3.4.	Modèle de digestion <i>in vitro</i>	61
3.4.1.	Expérimentation	61
3.4.2.	Extraction des caroténoïdes après digestion <i>in vitro</i>	63
3.4.3.	Mesures granulométriques sur les micelles	63
3.5.	Modèle de culture cellulaire Caco-2.....	63
3.5.1.	Culture des Caco-2 et expérimentation.....	63
3.5.2.	Extraction des composés liposolubles après absorption par Caco-2	64
4.	ANALYSE SENSORIELLE	65
5.	ANALYSES STATISTIQUES.....	66

RÉSULTATS.....	67
1. CONCEPTION D'UN ALIMENT FONCTIONNEL PROBIOTIQUE A BASE DE MAÏS FERMENTE ET ENRICHI EN CAROTENOÏDES ET PHYTOSTEROLS.....	67
1.1. Objectif	67
1.2. Travaux préliminaires : choix des paramètres.....	68
1.3. Incorporation et stabilité des caroténoïdes dans un aliment fonctionnel à base de maïs fermenté contenant des phytostérols (PUBLICATION 1)	68
2. INTERACTIONS ENTRE CAROTENOÏDES, PHYTOSTEROLS ET CHOLESTEROL LORS DE LA DIGESTION GASTRO-DUODENALE D'UN ALIMENT FONCTIONNEL A BASE DE MAÏS FERMENTE.....	77
2.1. Objectif	77
2.2. Le véhicule des phytostérols dispersibles utilisés dans un aliment fonctionnel modifie la bioaccessibilité des caroténoïdes et du cholestérol, ainsi que leur absorption par les cellules Caco-2 (PUBLICATION 2).....	77
3. OPTIMISATION DE L'ALIMENT FONCTIONNEL A BASE DE MAÏS FERMENTE : QUALITES SENSORIELLE & NUTRITIONNELLE, ET CAPACITE ANTIOXYDANTE.....	95
3.1. Objectif	95
3.2. Optimisation sensorielle et nutritionnelle d'un aliment fonctionnel à base de céréales fermentées en utilisant des hydrolysats de protéines (PUBLICATION 3).....	95
 DISCUSSION GÉNÉRALE	 116
 CONCLUSION & PERSPECTIVES	 126
 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 129
 Liste des annexes.....	 148

INTRODUCTION



Introduction

Dans un contexte mondial de malnutrition, dû en particulier à la transition alimentaire dans certains pays en développement, la demande des consommateurs pour des aliments “santé” a augmenté depuis quelques années et a ainsi renforcé la nécessité de développer des aliments fonctionnels (Prado *et al.* 2008; Serafini, Stanzione, et Foddai 2012; I. Salmerón 2017). Ce sont des aliments capables de prévenir l’incidence de maladies issues du syndrome métabolique, comme les maladies cardiovasculaires ou le diabète de type 2. En effet, ils contiennent des composés dits “bioactifs”, comme des phytostérols, des caroténoïdes provitaminiques A, des acides gras essentiels polyinsaturés (omega-3), des prébiotiques ou encore des probiotiques, qui possèdent des effets santé bénéfiques et divers sur l’organisme. La majorité (60 à 70 %) des produits fonctionnels actuellement présents sur le marché sont d’origine laitière (Chen, McClements, et Decker 2013a; Salmerón, Thomas, et Pandiella 2015). Cependant, les substrats céréaliers ont démontré leur capacité à se substituer au lait, que ce soit au niveau de la production de biomasse bactérienne, de l’incorporation des composés liposolubles ou encore de l’acceptabilité par les consommateurs (Blandino *et al.* 2003; Guyot 2012). Ainsi, les produits fonctionnels céréaliers représenteraient une alternative aux produits laitiers, palliant à la fois l’intolérance au lactose et l’apport en cholestérol du lait, tout en répondant à la tendance croissante au végétarisme (Marsh *et al.* 2014).

Cependant, la co-incorporation de composés bioactifs liposolubles dans une matrice céréalienne complexe est un challenge technologique dû notamment à leur faible solubilité (Chen, McClements, et Decker 2013a). De plus, afin d’exercer leurs propriétés, ces composés doivent être biodisponibles c’est-à-dire absorbés, puis transportés aux tissus cibles. Cependant, cette biodisponibilité peut être impactée par plusieurs facteurs, et notamment par la matrice alimentaire dans laquelle ils sont incorporés, ou encore par des interactions entre composés liposolubles. Le mode d’action des phytostérols dans l’organisme repose sur une compétition pour l’absorption avec le cholestérol. Récemment, il a été montré que l’ajout de phytostérols dans des aliments fonctionnels altérait la biodisponibilité des caroténoïdes chez l’homme (Fardet *et al.* 2017; Baumgartner *et al.* 2017).

Ainsi, l'objectif général de ce travail de thèse a été de concevoir un aliment fonctionnel probiotique à base de céréales fermentées, enrichi en caroténoïdes et en phytostérols, et d'étudier spécifiquement la stabilité, la bioaccessibilité et l'absorption intestinale de ces composés liposolubles.

Les objectifs spécifiques de ces travaux de thèse ont donc été de (1) formuler un aliment à base de maïs fermenté et développer son procédé de fabrication, (2) d'y induire un potentiel probiotique par une fermentation contrôlée, (3) d'incorporer des composés liposolubles (caroténoïdes et phytostérols) dans cette matrice et d'en étudier la stabilité au cours du procédé de fabrication, (4) de comprendre les interactions entre ces composés liposolubles lors de la digestion gastro-duodénale, que ce soit au niveau du transfert micellaire ou de l'absorption intestinale, et enfin (5) d'optimiser le produit au niveau organoleptique et nutritionnel.

Ces travaux sont présentés en quatre parties, déclinées en chapitres.

La première partie décrit l'état de l'art des aliments fonctionnels laitiers et non-laitiers, ainsi que les effets fonctionnels associés aux composés bioactifs qu'ils contiennent. Cette synthèse bibliographique se terminera par l'explication du métabolisme d'absorption et de la biodisponibilité des composés bioactifs liposolubles étudiés, à savoir les caroténoïdes et les phytostérols, ainsi que les interactions qui leurs sont associées.

La deuxième partie de ce travail est consacrée à la présentation des résultats. La formulation de l'aliment fonctionnel et son procédé de fabrication, incluant la standardisation microbiologique avec le choix des starters, ont été mis au point, tout en tenant compte de l'incorporation et de la stabilité des composés liposolubles (**publication 1**). Ensuite, la bioaccessibilité des caroténoïdes en présence de phytostérols et de cholestérol exogène a été évaluée à l'aide d'un modèle de digestion *in vitro* simulant la digestion gastro-duodénale. L'absorption intestinale des composés liposolubles a également été mesurée en utilisant le modèle de digestion statique couplé au modèle de cellules intestinales de type Caco-2 (clone TC7). À noter que les phytostérols employés dans la formulation sont des phytostérols dispersibles (c'est-à-dire encapsulés dans un véhicule), et présentent un effet particulier sur la bioaccessibilité des caroténoïdes (**publication 2**). L'optimisation sensorielle et nutritionnelle de l'aliment par l'emploi d'hydrolysats de

protéines a été ensuite étudiée, tout en tenant compte des propriétés physico-chimiques de ces additifs sur la bioaccessibilité des composés liposolubles. L'impact des complexes protéines-polyphénols sur la capacité antioxydante du produit et sur l'oxydation des lipides a été également discuté (**publication 3**).

La troisième partie, consacrée à la discussion générale des résultats, se base sur des études récentes. Ce chapitre apporte ainsi des points de vue différents de ces travaux, permettant de prendre du recul sur le produit développé.

La quatrième et dernière partie conclue sur ces travaux de thèse, tout en présentant des perspectives de développement ou d'optimisation de cet aliment fonctionnel générique.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE



Synthèse Bibliographique

1. Généralités sur les aliments fonctionnels en Europe et dans le Monde

1.1. Définition et législation

Le concept de “produits fonctionnels” est né au Japon dans les années 1980. Ce sont des aliments qui ont été développés spécifiquement pour promouvoir la santé ou réduire les risques de maladies. Ils sont généralement considérés comme étant des aliments qui doivent être consommés dans le cadre d’une alimentation équilibrée, tout en apportant des molécules bioactives ayant un bénéfice sur la santé (Salmerón 2017; Serafini, Stanzione, et Foddai 2012; Prado *et al.* 2008). Les produits fonctionnels pourraient ainsi être représentés par la phrase suivante, énoncée par Hippocrate (environ 460 - 377 av. J-C) “*Que ton aliment soit ton médicament, que ton médicament soit ta nourriture*”, mais une définition internationale manque toujours (Krystallis, Maglaras, et Mamalis 2008). À l’origine, c’est un terme marketing qui se rapporte à une certaine synergie entre santé et régime alimentaire, mais qui n’a pas encore été défini par la législation européenne (Serafini, Stanzione, et Foddai 2012). L’attention concernant cette catégorie d’aliments ayant augmenté, de nouveaux produits sont apparus sur le marché européen. L’intérêt s’est tourné vers la définition des normes et directives pour le développement et la promotion de ce type d’aliments.

L’Action Concertée de la Commission Européenne sur la Science de l’Alimentation Fonctionnelle (FuFoSE), coordonnée par l’Institut National des Sciences de la Vie (ILSI) en Europe a défini les produits fonctionnels comme suit : “Un aliment ne peut être considéré comme fonctionnel que si, associé à l’impact nutritionnel de base, il a des effets bénéfiques sur une ou plusieurs fonctions de l’organisme humain, améliorant ainsi les conditions générales et physiques et/ou réduisant le risque d’évolution de maladies. La quantité absorbée et la forme de l’aliment fonctionnel doivent être conformes aux attentes alimentaires. Par conséquent, il ne peut pas être sous forme de pilule ou de capsule.” (Siró *et al.* 2008; Serafini, Stanzione, et Foddai 2012). Au sein de l’Union Européenne, il n’existe qu’une législation harmonisée par l’EFSA (European Food Safety Authority) sur les allégations de santé (Article 13.1 EC 1924/2006), alors que les composés, les ingrédients et les extraits de plantes ne sont encore régulés qu’au niveau national (Serafini, Stanzione, et Foddai 2012).

Plus spécifiquement, en 2002, un document du Comité Scientifique de l'Alimentation de la Commission Européenne a déclaré "recommander l'utilisation de sources naturelles de β -carotène, soit de fruits et de légumes riches en caroténoïdes, pour contrebalancer la diminution attendue du taux de β -carotène sanguin et d'autres nutriments liposolubles, causée par la consommation sur le long terme d'aliments enrichis en phytostérols" (Commission Européenne 2002). De plus, la Commission Européenne a adopté en 2004 des règles spécifiques pour l'étiquetage des "aliments et ingrédients contenant des phytostérols, des esters de phytostérols, des phytostanols et/ou des esters de phytostanols" dans le Règlement (CE) n°608/2004 et a déclaré que "cet aliment doit faire partie d'un régime équilibré, incluant une consommation régulière de fruits et légumes aidant au maintien des taux plasmatiques de caroténoïdes" (Commission Européenne 2004).

1.2. Objectifs et classement des aliments fonctionnels

Les produits fonctionnels sont donc formulés afin de prévenir le développement de maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, l'obésité, et le diabète de type 2. Ces maladies sont issues de ce que l'on nomme le 'syndrome métabolique' (Smet). Le Smet se définit par un ensemble d'anomalies métaboliques incluant l'obésité, l'hypertension, l'insulinorésistance, la dyslipidémie et l'hyperglycémie (Punthakee, Goldenberg, et Katz 2018). Ces maladies sont en croissance exponentielle dans le monde entier, et plus particulièrement dans les pays du Sud (Nzie Nzie, 2012). Elles sont principalement causées par la transition alimentaire des populations qui se traduit par un changement de régime alimentaire dans la société en général, consistant à consommer de plus en plus de calories provenant de produits alimentaires bon marché, conduisant à un régime élevé en calories et déséquilibré (Kearney 2010).

Les aliments fonctionnels peuvent par exemple être classés en 5 grandes familles (Tableau 1) : les aliments naturels, les aliments modifiés, les aliments fortifiés, les aliments enrichis et les produits améliorés (Siró *et al.* 2008).

Tableau 1 : Classes d'aliments fonctionnels (d'après Siró *et al.* 2008)

Type d'aliments fonctionnels	Définition	Exemples
Produit naturel	Un aliment contenant naturellement des composés santé	Fruits et légumes
Produit modifié	Un aliment duquel un composant nocif a été retiré, réduit ou remplacé par une autre substance aux effets bénéfiques	Fibres libérant de la graisse les produits de viande ou la crème glacée
Produit fortifié	Un aliment fortifié en nutriments additionnels	Jus de fruits fortifiés en vitamine C, laits additionnés en vitamine D
Produit enrichi	Un aliment dans lequel ont été ajoutés des nutriments ou des composés qui ne les contient normalement pas	Margarines additionnées en esters de stérols, des produits pré- ou probiotiques
Produit amélioré	Un aliment dans lequel la teneur de l'un des composés a été élevée grâce à des conditions particulières d'élevage ou une composition optimisée de la nourriture	Œufs enrichis en omega-3, produits en modifiant l'alimentation des poules pondeuses

Le plus souvent, les aliments fonctionnels sont divisés en produits laitiers et produits non-laitiers (à base de céréales), et largement inspirés d'aliments et de savoir-faire traditionnels (Serafini, Stanzione, et Foddai 2012). La plupart du temps, ils sont pré- et/ou probiotiques et/ou contiennent des minéraux et vitamines (Kandyliis *et al.* 2016). Les prébiotiques sont des fibres non-digestibles bénéfiques pour l'hôte, puisqu'elle stimulent sélectivement la croissance ou l'activité d'une ou plusieurs bactéries du côlon (Roberfroid 2000). Les produits probiotiques incluent des microorganismes (bactéries, levures, moisissures) ayant un bénéfice sur la santé s'ils sont ingérés vivants et en assez grand nombre, généralement entre 10^8 à 10^9 cellules par gramme de produit consommé (Kandyliis *et al.* 2016).

1.3. Marché de l'offre et de la demande

La demande croissante des consommateurs pour les aliments santé a renforcé la nécessité de concevoir de nouveaux aliments fonctionnels. Les États-Unis possèdent le segment de marché des produits fonctionnels le plus étendu, suivis par l'Europe et le Japon. Ces trois marchés dominants contribuent à plus de 90 % du total des ventes de produits

fonctionnels tous confondus. En Europe, les pays les plus présents sur ce segment de marché sont l'Allemagne, la France, le Royaume Uni et les Pays-Bas (Siró *et al.* 2008; Annunziata et Vecchio 2011).

Parmi eux, les produits laitiers contenant des composés liposolubles (comme les phytostérols), des acides gras omega-3 ou des starters probiotiques, représentent 60 à 70 % du marché des aliments fonctionnels (Salmerón, Thomas, & Pandiella, 2015; Chen, McClements, & Decker, 2013). Cependant, l'intolérance au lactose, les allergies aux protéines de lait, le taux de cholestérol des produits laitiers et la tendance grandissante pour le végétarisme sont autant de facteurs qui ont récemment permis d'augmenter la demande concernant les produits non-laitiers (Prado *et al.* 2008; Kandyliis *et al.* 2016). De ce fait, les produits à base de céréales sont une réponse assez générale aux consommateurs comme alternative aux produits laitiers et ayant des bénéfices santé (Marsh *et al.* 2014). Parmi les produits fonctionnels probiotiques, les produits laitiers représentent la majeure partie des boissons fermentées. Le plus populaire est le yaourt probiotique, qui représente actuellement 78 % des ventes mondiales du marché des probiotiques (Kandyliis *et al.* 2016; Marsh *et al.* 2014). Le marché potentiel mondial des produits et boissons fonctionnels a été estimé à 192 milliards de dollars en 2020 (Kaur et Singh 2017).

1.4. Acceptabilité des aliments fonctionnels par les consommateurs

Le choix des consommateurs pour ces aliments peut être expliqué par divers facteurs comme le contexte socio-démographique, la motivation personnelle, la conscience de la santé et l'attitude générale envers les aliments fonctionnels, qui jouent un rôle important pour leur acceptabilité (Büyükkaragöz *et al.* 2014; Vecchio, Van Loo, et Annunziata 2016).

Il y a 4 déterminants généraux du comportement alimentaire : les facteurs personnels, psychologiques, sociaux et culturels, et les facteurs liés aux produits fonctionnels eux-mêmes. Ainsi, l'âge ou le genre ne semblent pas corrélés à la demande pour les aliments fonctionnels ; à l'inverse, il semblerait que les facteurs les plus corrélés positivement à cette demande sont le niveau d'éducation élevé, les revenus, la sensibilité, la conscience, la familiarité avec ces produits et leur connaissance, l'intention d'achat et la volonté de consommer ces aliments pour diverses raisons (liée aux bénéfices perçus, comme une perte de poids par exemple). À noter que les rôles de la famille, des amis, des diététiciens et

médecins ainsi que la présence d'enfants dans le foyer jouent un rôle positif quant à la demande en produits fonctionnels. L'emballage, la commodité, les propriétés naturelles et la confiance en la marque commercialisant l'aliment sont également des facteurs influençant positivement le comportement d'achat de ce type de produits (Kaur et Singh 2017).

Le marché des produits fonctionnels non laitiers est une alternative, moins chère et en expansion, offrant des produits à base de céréales, de fruits et légumes, de viande ou de poisson, la plupart du temps probiotiques et parfois additionnés en minéraux et en vitamines (Kandylis *et al.* 2016; Marsh *et al.* 2014; Siró *et al.* 2008). Cependant, le succès commercial des aliments fonctionnels non-laitiers dépend beaucoup plus de leur goût, de leur apparence, de leur prix et des allégations nutritionnelles apposées sur leurs emballages, que pour leurs équivalents laitiers (Granato *et al.* 2010). En effet, il a été démontré que ces critères, avec la composition nutritionnelle, sont plus importants pour l'acceptabilité d'un nouveau produit par les consommateurs, que les propriétés fonctionnelles elles-mêmes (Marsh *et al.* 2014). Il est donc important de bien développer l'aspect marketing entourant le produit, tout en considérant que les consommateurs perçoivent déjà les yaourts, les jus de fruits et les céréales comme des aliments sains (Marsh *et al.* 2014).

1.5. Aliments fonctionnels fermentés

1.5.1. Les aliments traditionnels : une inspiration pour les nouveaux produits fonctionnels

Les aliments fermentés à base de céréales sont très populaires dans les régions tropicales mais surtout en Afrique (Marsh *et al.* 2014). Il a été démontré que certains aliments traditionnels fermentés contiennent des souches viables de microorganismes probiotiques (Rivera-Espinoza et Gallardo-Navarro 2010). Ainsi, le rôle des aliments traditionnels est sans nul doute d'inspirer le développement de nouveaux produits (Marsh *et al.* 2014), tout en les maintenant et/ou en les améliorant. (Prado *et al.* 2008).

D'ailleurs, le Projet Européen AFTER (African Food Tradition Revisited by Research) coordonné par le CIRAD de 2010 à 2014 en collaboration avec des partenaires de 7 pays africains et 4 pays européens, avait pour but de valoriser des aliments traditionnels africains et leur savoir-faire, afin d'en faire bénéficier les consommateurs et producteurs en Afrique et en Europe. Ces optimisations se sont portées sur 10 aliments fermentés, faisant partie de 3 grandes familles : les produits fermentés à base de céréales (Akpan, Gowe, Kenkey, Kishk Sa'eedi), les produits fermentés séchés à base de viande et de poisson (Lanhoun, Kitoza,

Kong) et les produits à base d'extraits de plantes (Bissap, Buy, Jaabi). Certains de ces produits sont récapitulés dans le Tableau 2. L'objectif principal était d'obtenir des produits de meilleure qualité sanitaire, sensorielle et nutritionnelle (CIRAD 2010; Sacca *et al.* 2012; Akissoé *et al.* 2015).

Tableau 2 : Exemples d'aliments traditionnels fermentés et leur origine ainsi que les souches de fermentation associées

Produits fermentés traditionnels	Substrats	Souches issues de fermentations spontanées		Origine géographique	Références
		Bactéries lactiques	Levures		
Adai	Céréales, légumineuses	<i>Lactobacillus spp.</i>	/	Afrique	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Agbelima	Manioc	<i>Lb. plantarum, Lb. Brevis, Leuc. mesenteroides</i>	/	Afrique	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> , 2010
Amasi (mukaka wakakora)	Lait (vache et autres)	<i>Lactococcus lactis, Lactobacillus, Leuconostoc, Enterococcus</i>	/	Zimbabwe	Prado <i>et al.</i> 2008 Marsh <i>et al.</i> 2014
Aryan	Lait (vache et autres)	<i>Lb. bulgaricus, Stret. thermophilus</i>	/	Turquie	Marsh <i>et al.</i> 2014
Atole	Maïs	<i>Lactobacillus spp.</i>	/	Amérique Latine	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Ben-saalga	Millet	<i>Lactobacillus spp.</i>	/	Burkina Faso	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Boza	Blé, orge, avoine, seigle, millet, maïs, riz	<i>Lb. plantarum, Lb. acidophilus, Lb. fermentum, Lb. coprophilus, Lb. brevis, Lb. rhamnosus, Leuc. reffinolactis, Leuc. mesenteroides subsp. dextranum, Leuc. paramesenteroides, Leuc. sanfranciscensis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces uvarum, Candida tropicalis, Candida glabrata, Geotrichum penicillatum, Geotrichum candidum, Pichia fermentans</i>	Bulgarie, Albanie, Turquie, Roumanie	Prado <i>et al.</i> 2008 Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010 Marsh <i>et al.</i> 2014
Bushera	Sorgho, millet	<i>Lactobacillus spp., Lb. brevis, Lactococcus, Leuconostoc, Enterococcus, Streptococcus</i>	/	Ouganda (Ouest)	Prado <i>et al.</i> 2008
Chhang	Riz	<i>Lb. pentosus, Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae, Saccharomycopsis fibuligera, Saccharomycopsis malanga</i>	Inde	Kandylys <i>et al.</i> 2016 Bhardwaj <i>et al.</i> 2015
Chicha	Riz	<i>Lactobacillus, Bacillus, Leuconostoc, Enterococcus</i>	<i>Escherichia</i>	Brésil	Kandylys <i>et al.</i> 2016 Puerari <i>et al.</i> 2014
Dosa	Riz, pois chiche	<i>Leuc. Mesenteroides, Lb. Fermentum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Inde	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Ergo	Lait	<i>Streptococcus thermophilus, Strept. acidominus, Strept. bovis, Strept. mitis, Strept. agalactiae, Enterococcus faecalis var. liquefaciens, Lactococcus cremoris, Lactococcus lactis, Leuc. dextranicum, Leuc. lactis, Lb. Xylosus</i>	NC	Ethiopie	Prado <i>et al.</i> 2008
Garris	Lait (chamelle)	<i>Lb. paracasei, Lb. fermentum, Lb. plantarum, Lactococcus, Enterococcus, Leuconostoc</i>	/	Soudan	Marsh <i>et al.</i> 2014

Hardaliye	Raisins rouges/graines de moutarde/feuilles de cerises	<i>Lb. paracasei subsp. paracasei, Lb. casei subsp. pseudoplantarum, Lb. brevis, Lb. pontis, Lb. acetotolerans, Lb. Sanfransisco, Lb. vaccinostrercus</i>	/	Turquie	Prado <i>et al.</i> 2008 Marsh <i>et al.</i> 2014
Haria	Riz	<i>Lactobacillus spp., Bifidobacterium sp.</i>	NC	Inde	Kandylis <i>et al.</i> 2016 Ghosh <i>et al.</i> 2014
Idli	Céréales, légumineuses	<i>Leuc. mesenteroides, Lactobacillus spp.</i>	NC	Inde	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Kecap	Blé, soja	<i>Lactobacillus spp.</i>	/	Indonésie	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Kefir	Lait (vache et autres)	<i>Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc</i>	<i>Naumovozyrna, Kluyveromyces, Kazachstania</i>	Europe (Est)	Marsh <i>et al.</i> 2014
Kenkey	Maïs	<i>Lb. casei, Lb. lactis, Lb. plantarum, Lb. brevis, Lb. acidophilus, Lb. fermentum</i>	NC	Ghana	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Kimchi	Légumes	<i>Lb. plantarum, Lb. curvatus, Lb. brevis, Lb. sake, Leuc. mesenteroides</i>	/	Corée	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Kishk	Céréales, lait	<i>Lactobacillus spp.</i>	/	Afrique	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Kisra	Sorgho	<i>Lactobacillus spp., Lb. brevis</i>	/	Soudan	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Kivuguto	Lait (vache)	<i>Leuc. mesenteroides, Leuc. pseudomesenteroides, Lb. lactic,</i>	/	Rwanda	Marsh <i>et al.</i> 2014
Kombucha	Thé	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Zygosaccharomyces, Candida, Hanseniaspora, Torulaspora, Pichia, Dekkera, Sccharomyces</i>	Chine International	Marsh <i>et al.</i> 2014
Koko	Millet	<i>Lb. fermentum, Lb. Salivarius, Weissella confusa, Pediococcus spp.</i>	/	Ghana	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010 Marsh <i>et al.</i> 2014
Koumiss/Airag	Lait (jument)	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Kluyveromyces, Saccharomyces cerevisiae, Kazachstania</i>	Asie, Russie	Marsh <i>et al.</i> 2014
Kulenaoto	Lait	NC	NC	Kenya	Prado <i>et al.</i> 2008
Kumis	Lait (vache)	<i>Lb. cremoris, Lb. Lactis Enterococcus faecalis, Entero. faecium</i>	<i>Galactomyces geotrichum, Pichia kudriavzevii, Clavispora lusitaniae, Candida tropicalis</i>	Colombie	Marsh <i>et al.</i> 2014
Kvass	Seigle, orge	<i>Lb. casei, Leuc. mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Russie	Marsh <i>et al.</i> 2014
Kwerionik	Lait	NC	NC	Ouganda	Prado <i>et al.</i> 2008
Mahewu	Maïs, sorgho, millet	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis, Lb. bulgaricus, Lb. brevis</i>	/	Zimbabwe, Golfe Arabique	Prado <i>et al.</i> 2008 Marsh <i>et al.</i> 2014

Mawe	Maïs	<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. salivarius</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Afrique	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Ngari	Poisson	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus plantarum</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lb. fructosus</i> , <i>Lb. amylophilus</i> , <i>Lb.</i> <i>coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> , <i>Lb. plantarum</i>	/	Inde	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Nyarmie	Lait (chamelle)	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ghana	Marsh <i>et al.</i> 2014
Ogi	Maïs	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Afrique	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Omegisool	Millet	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp.	/	Corée	Kandyli <i>et al.</i> 2016
Pozol	Maïs	<i>Lb. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. alimentarium</i> , <i>Lb. delbruekii</i> , <i>Strept. suis</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterococcus</i>	NC	Mexique (Sud-Ouest)	Prado <i>et al.</i> 2008 Marsh <i>et al.</i> 2014
Rob	Lait	<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Strept. salivarius</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida kefir</i>	Soudan	Marsh <i>et al.</i> 2014
Sauerkraut (Choucroute)	Chou	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lb. lactis</i> , <i>Lactobacillus</i> spp.	/	International	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Shubat	Lait (chamelle)	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Leuc. lactis</i> , <i>Weissella hellenica</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Kazachstania unisporus</i> , <i>Candida</i> <i>ethanolica</i>	Chine	Marsh <i>et al.</i> 2014
Som-fug	Poisson	<i>Lactobacillus</i> spp.	/	Thaïlande	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Suusac	Lait	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. cruvatus</i> , <i>Lb. salivarius</i> , <i>Lb. raffinolactis</i>	<i>Candida krusei</i> , <i>Geotrichum</i> <i>penicillatum</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Kenya	Marsh <i>et al.</i> 2014
Tarhana	Blé et yaourt	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. plantarum</i>	/	Turquie	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Tempech	Soja	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lb. plantarum</i>	/	Indonésie	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Togwa	Maïs, millet	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida</i> spp.	Tanzanie	Prado <i>et al.</i> 2008 Marsh <i>et al.</i> 2014
Uji	Maïs, sorgho, manioc, millet	<i>Lactobacillus</i> spp.	/	Kenya	Rivera-Espinoza <i>et al.</i> 2010
Water Kefir	Eau/sucre	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuc. Mesenteroides</i>	<i>Dekkera anomola</i> , <i>Dekkera bruxellensis</i> , <i>Hanseniaspora valbyensis</i> , <i>Hanseniaspora vineae</i> , <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> , <i>Lachancea fermentati</i> , <i>Zygosaccharomyces lentus</i> , <i>Zygosacch.</i> <i>florentina</i>	Mexique International	Marsh <i>et al.</i> 2014

1.5.2. Les produits fonctionnels laitiers

Parmi les produits probiotiques fonctionnels, les produits laitiers représentent la majeure partie des aliments fermentés commercialisés (exemples Tableau 3). Ils ont depuis toujours été utilisés comme véhicules pour les microorganismes probiotiques. Les laits fermentés possèdent en effet une excellente qualité nutritionnelle, étant à la fois source de calcium, protéines, phosphore et riboflavine (Prado *et al.* 2008).

Tableau 3 : Exemples de produits fonctionnels probiotiques laitiers

(d'après Siró *et al.* 2008 et Prado *et al.* 2008)

Produits fonctionnels laitiers	Substrats	Bactéries lactiques	Producteurs
Actimel	Yaourt	<i>Lb. casei</i> Imunitass®	Danone France
Activia	Yaourt	<i>Bifidus ActiRegularis</i> ®	Danone France
Evolus	Lait	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Valio Finlande
Gefilus	Kefir aux fruits	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG®	Valio Finlande
Hellus	Produits laitiers	<i>Lb. fermentum</i> ME-3	Tallinna Piimatööstuse Estonie
Jovita Probiotisch	Mélange de yaourt, céréales et fruits	NC	H&J Bruggen Allemagne
Pohadka	Yaourt	NC	Valašské Meziříčí Dairy République Tchèque
ProViva	Yaourt et fruits	<i>Lb. plantarum</i>	Skåne mejerier Suède
Rela	Yaourt, lait	<i>Lb. reuteri</i>	Ingman Foods Finlande
Revital Active	Yaourt	NC	Olma République Tchèque
Vitality	Yaourt enrichi en omega-3 pré- et probiotique	NC	Müller Allemagne
Vifit	Yaourt enrichi en vitamines et minéraux	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG®	Campina Pays-Bas
Yakult	Lait	<i>Lb. casei</i> Shirota	Yakult Japon

1.5.3. Les produits fonctionnels non laitiers à base de céréales

Cependant, les aliments fonctionnels non laitiers (exemples Tableau 4), comme ceux à base de céréales, apparaissent également comme étant une réponse aux consommateurs afin de leur assurer des bénéfices sur la santé (Marsh *et al.* 2014).

Tableau 4 : Exemples de produits fonctionnels probiotiques non laitiers
(d'après Siró *et al.* 2008 et Prado *et al.* 2008)

Produits fonctionnels à base de céréales	Substrats	Bactéries lactiques	Producteurs
Grainfield Wholegrain Liquid	Graines (alfalfa, lin), haricot mungo, céréales (avoine, maïs, riz, orge, blé, millet)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbreukii</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A.G.M. Foods Pty Australie
Proviva	Avoine	<i>Lactobacillus plantarum</i>	ProViva Suède
Rela	Jus de fruits	<i>Lb. reuteri</i>	Ingman Foods Finlande
Snack Fibra	Snacks et barres de céréales (vitamines et fibres)	/	Celigüeta Espagne
SOYosa	Gamme de produit au soja et avoine	NC	Bioferme Finlande
Soytreat	Produits types kéfir au soja	6 souches - NC	Lifeway États-Unis
Yosa	Type yaourt à l'avoine aux fruits	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i>	Bioferme Finlande

La préférence pour les produits céréaliers est certainement due à leur taux élevé de fibres et faible de lipides, contrairement à leurs équivalents laitiers. De plus, l'intolérance au lactose et la teneur en cholestérol sont les deux principaux inconvénients des produits laitiers (Prado *et al.* 2008), tout en tenant compte des allergies aux protéines de lait et de l'ampleur grandissante du végétarisme. Même si plusieurs études concluent que les produits laitiers sont les meilleurs substrats pour administrer des probiotiques, les céréales semblent également être une bonne base pour concevoir les nouveaux produits fonctionnels non laitiers. De plus, les céréales restent la principale source de nourriture dans le monde : elles

contribuent à hauteur de 70 % de l'apport énergétique dans les pays en développement, tandis que dans les pays industrialisés, elles en représentent au moins 30 %, avec environ 50 % des glucides disponibles (Kearney 2010). En effet, ce sont des sources importantes de protéines, glucides, vitamines, minéraux, fibres (prébiotiques), flavonoïdes et composés phénoliques, qui peuvent avoir des effets bénéfiques sur le stress oxydatif, l'inflammation, l'hyperglycémie et la carcinogénèse (Wang, Wu, et Shyu 2013).

Les grains sont également porteurs de composés phytochimiques comme des phytoœstrogènes, des antioxydants et des stérols. Néanmoins, la qualité nutritionnelle des céréales est souvent considérée inférieure à celle des produits laitiers, car elles contiendraient moins de protéines, et seraient déficientes en lysine et autres acides aminés essentiels, avec une disponibilité faible de l'amidon, et la présence de composés antinutritionnels (comme l'acide phytique, les tannins et les polyphénols) (Rivera-Espinoza et Gallardo-Navarro 2010). Cela dit, la fermentation permet de diminuer les taux de glucides mais également de poly- et oligosaccharides non-digestibles, et d'améliorer la qualité des protéines et le taux de lysine des produits céréaliers. De plus, la fermentation lactique permet de synthétiser certains acides aminés essentiels et d'améliorer la biodisponibilité des vitamines B, tout en conférant un pH acide bénéfique aux enzymes de dégradation des phytates, et permettant la libération de certains minéraux, comme le manganèse, le fer, le zinc et le calcium. La fermentation améliore ainsi la qualité nutritionnelle des céréales. C'est d'ailleurs le procédé de biopréservation naturelle utilisé dans les boissons traditionnelles africaines.

Parmi les céréales, le maïs est la plus importante source de nourriture en Amérique Latine et en Afrique. Le grain brut ayant une valeur nutritive assez faible, il est nécessaire de lui faire subir une nixtamalisation (trempage) et une fermentation, afin d'améliorer sa qualité nutritionnelle (Rivera-Espinoza et Gallardo-Navarro 2010).

Kandyliis *et al.* (2016) ont proposé de se focaliser sur les produits traditionnels non laitiers, dans le but de concevoir de nouveaux aliments fonctionnels probiotiques, mais en combinant par exemple des substrats laitiers et non laitiers : de cette façon, il devient

possible d'assembler le goût agréable et les saveurs des produits laitiers avec la large gamme de nutriment proposée par les produits non laitiers, comme les céréales.

1.6. Challenges technologiques pour la conception d'un aliment fonctionnel fermenté céréalier

Le développement de nouveaux produits probiotiques non laitiers est un véritable challenge. En effet, il s'agit de répondre aux attentes des consommateurs en termes de coûts ou de facilité d'utilisation, et que ces produits soient à la fois savoureux et apportent des bénéfices santé. Le défi de conception d'aliments de la sorte est essentiellement lié à l'optimisation de leur formulation, tout en obtenant les caractéristiques sensorielles et physico-chimiques nécessaires aux effets santé attendus, une durée de vie prolongée, une stabilité chimique et un prix raisonnable (Granato *et al.* 2010).

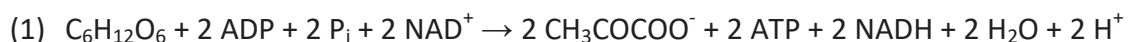
1.6.1. Maîtrise de la fermentation

1.6.1.1. La fermentation lactique

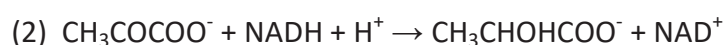
Les microorganismes utilisent deux voies respiratoires cellulaires : la respiration en conditions aérobies, et la fermentation en conditions anaérobies. La fermentation est un processus métabolique, qui permet de convertir les glucides en acides, gaz ou alcools.

La fermentation lactique induit la consommation des sucres (glucose, fructose, saccharose) par oxydoréduction, en énergie cellulaire et en lactate, effectuée par les bactéries lactiques ou certaines cellules animales (Stanbury, Whitaker, et Hall 1995).

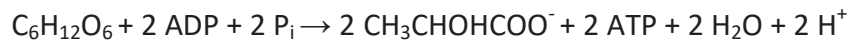
La glycolyse, ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas, doit avoir lieu avant la fermentation lactique. C'est une voie catabolique d'assimilation du glucose ($C_6H_{12}O_6$) et de production d'énergie (ATP), utilisant le NAD comme transporteur d'électrons (nicotinamide adénine dinucléotide – NADH est réducteur et NAD^+ est oxydant) et produisant du pyruvate (CH_3COCOO^-) suivant la réaction (1) :



Le pyruvate issu de la glycolyse est ensuite réduit en lactate par une enzyme, la lactate déshydrogénase, avec oxydation d'une molécule de NADH en NAD^+ suivant la réaction (2) :



D'où la réaction de fermentation suivante (1+2) où la consommation d'une molécule de glucose produit deux molécules de pyruvate :



La fermentation lactique permet une acidification rapide du milieu et engendre la production de nombreux composés, comme les acides organiques mais aussi des composés aromatiques, des bactériocines aux propriétés antibiotiques, des exopolysaccharides aux capacités texturantes, des enzymes protéolytiques/lipolytiques/amylolytiques etc. Ainsi, ce type de fermentation améliore la durée de vie et la sécurité sanitaire des aliments fermentés, ainsi que leur texture et leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles (Leroy et De Vuyst 2004). Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques, tant bactériostatiques que bactéricides, peuvent être dues à la compétition pour les nutriments et à la production d'inhibiteurs comme les bactériocines mais aussi les acides organiques ou le peroxyde d'hydrogène (Rivera-Espinoza et Gallardo-Navarro 2010).

La fermentation lactique est effectuée par des bactéries mésophiles (température optimale de croissance entre 15 et 45 °C) ou thermophiles (entre 45 et 80 °C) et aéro-anaérobies ou micro-aérophiles, c'est-à-dire qui tolèrent la présence d'oxygène en faible quantité. Plusieurs genres de bactéries peuvent effectuer la fermentation lactique, comme les *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* (Entérocoques), *Leuconostoc*, *Cenococcus*, ou encore *Bifidobacterium*. Les *Lactobacillus* et les *Bifidobacterium* sont largement utilisés pour la production d'aliments fermentés de tous types, les fruits, les légumes, la viande (comme les saucisses), et les produits laitiers (Siró *et al.* 2008; Granato *et al.* 2010); les produits obtenus, bien que fermentés, ne sont pas nécessairement probiotiques, ni fonctionnels.

1.6.1.2. La modélisation microbienne et les paramètres de croissance

La microbiologie prédictive est la combinaison des paramètres microbiens et des statistiques. Le comportement des populations microbiennes en agroalimentaire (croissance, survie, mort) est déterminé par les propriétés de l'aliment (Aw et pH par exemple) et les conditions de stockage (température, humidité relative et atmosphère). L'effet de ces propriétés peut être prédit par des modèles mathématiques, dérivés d'études quantitatives menées sur les populations microbiennes. Ces modèles sont en fait une

représentation simplifiée de la réalité. En effet, la complexité des systèmes alimentaires et des comportements microbiens ne peut être décrite complètement par un modèle prédictif, bien qu'il en donne une bonne transcription (Fakruddin, Mazumdar, et Mannan 2012). Ces modèles prédictifs permettent néanmoins d'estimer la durée de vie d'un produit et les paramètres de croissance d'une souche particulière sous des conditions fixées. Ils sont décrits sur milieux de culture expérimentaux en laboratoire et ensuite extrapolés aux matrices alimentaires. Les analyses quantitatives consistent en un comptage des colonies microbiennes sur milieu de culture approprié au genre microbien étudié (par exemple, le milieu de Man, Rogosa et Sharpe pour les lactobacilles), sur une durée limitée et à intervalles de temps réguliers. Chaque dilution décimale d'un gramme d'aliment est ensemencée en triplicata et en surface, et le nombre d'Unités Formant Colonie/mL ou /g est calculé comme

$$\text{suit : } \frac{\text{moyenne du comptage de 3 boîtes d'une même dilution}}{\text{volume d'ensemencement} \times \text{dilution}} \text{ UFC/mL}$$

Sont développés ici les deux modèles les plus employés en agroalimentaire et qui ont été testés dans ces travaux de thèse : Gompertz et Rosso.

Les modèles primaires, comme celui de Gompertz (3) est un modèle cinétique décrivant les taux de réponse des microorganismes par des paramètres tels que le temps de latence, la vitesse spécifique de croissance ou la densité maximum de population (phase stationnaire) : les courbes de croissance sont ajustées par un modèle de croissance sigmoïdal. Le modèle de Gompertz présente cependant certaines limites. En effet, la vitesse de croissance microbienne utilisée dans l'équation est dans tous les cas la vitesse spécifique de croissance maximale, ce qui peut influencer sur le point d'inflexion de la courbe et sous-estimer le temps de génération. De plus, la pente de la courbe ne pouvant être nulle, la période de latence est réduite à zéro ou peut être négative pour certaines souches, ce qui est impossible (McKellar et Lu 2004).

$$(3) \log N_{(t)} = \log N_0 + (\log N_{max} - \log N_0) \exp \left\{ -\exp \left[\left(\frac{2,71 \times \mu_{max}}{2,3 \times (\log N_{max} - \log N_0)} \right) (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

où μ_{max} est la vitesse spécifique de croissance (h^{-1}), λ la période de latence (h), N_0 la population initiale (UFC/g), N_{max} la population maximale (UFC/g) et \log le logarithme décimal.

C'est là qu'intervient le modèle de Rosso (4), qui, contrairement au modèle de Gompertz, prend en compte la période de latence mesurée par les analyses quantitatives par rapport à la population au temps t (Rosso *et al.* 1995).

$$(4) \log N_{(t)} = \begin{cases} \log N_0 & \text{si } t < \lambda \\ \log N_{\max} - \log \left(\left[1 + \left(\frac{N_{\max}}{N_0} - 1 \right) \exp(-\mu_{\max}(t - \lambda)) \right] \right) & \text{si } t \geq \lambda \end{cases}$$

où μ_{\max} est la vitesse spécifique de croissance (h^{-1}), λ la période de latence (h), N_0 la population initiale (UFC/g), N_{\max} la population maximale (UFC/g) et \log le logarithme décimal.

La courbe de croissance modèle (Figure 1) permet de déterminer les paramètres de croissance décrits ci-dessous.

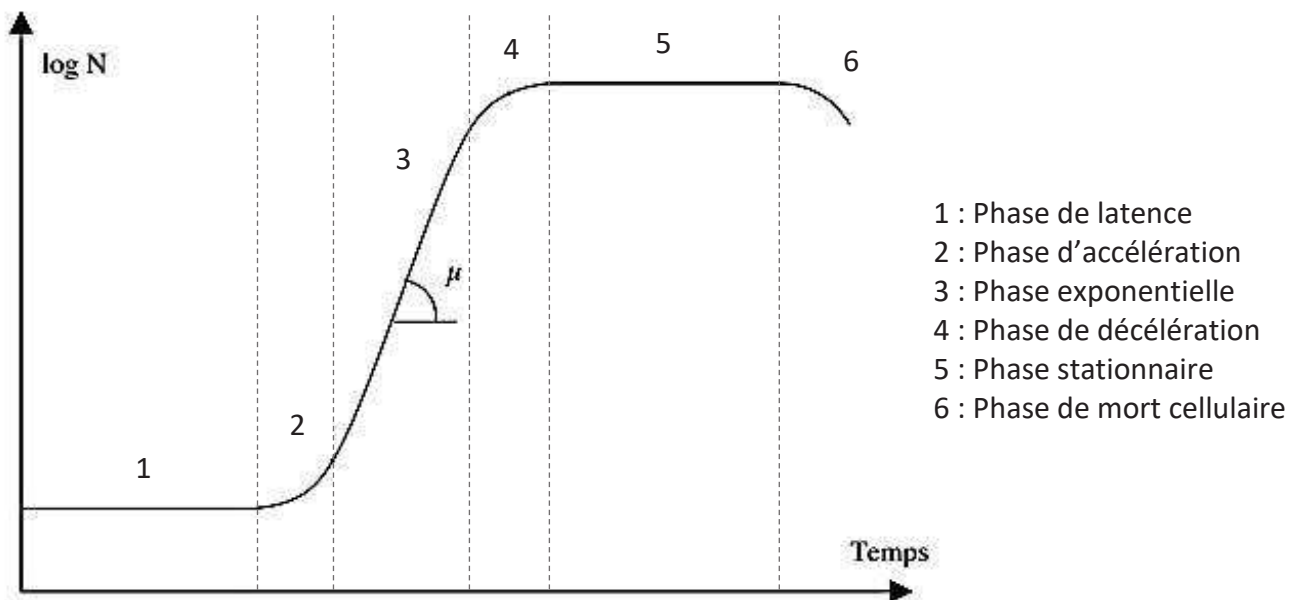


Figure 1 : Courbe générale de croissance microbienne représentant l'évolution du nombre N de bactéries par unité de volume en fonction du temps et où la phase exponentielle est caractérisée par un taux d'accroissement μ

La phase 1 représente la période de latence, considérée comme le temps d'adaptation nécessaire du microorganisme à son environnement (activation, mise en place des voies métaboliques appropriées etc.). La phase 2 correspond à l'initiation de la phase de croissance exponentielle, représentée en 3. La vitesse spécifique de croissance μ_{max} est calculée durant cette phase et est définie par l'équation $\mu_x = \frac{dx}{dt} h^{-1}$. Le temps de génération, correspondant au temps moyen nécessaire pour doubler la population microbienne, se calcule selon $G = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} h$. La phase 4 est une phase de décélération de la croissance microbienne, jusqu'à atteindre une phase stationnaire de plateau en 5 où la vitesse de croissance est égale à zéro ($\mu = 0$) et qui est considérée comme le maximum de population. La phase 6 représente la phase de déclin ou de mort cellulaire ($\mu < 0$), induite par exemple par un épuisement des ressources nutritives ou une accumulation de métabolites toxiques (Stanbury, Whitaker, et Hall 1995).

1.6.2. Aspects liés au procédé de fabrication

1.6.2.1. La fermentation par des souches probiotiques

Les co-fermentations par multi-souches ou multi-espèces sont préférables aux fermentations mono-souches, puisqu'elles apportent de meilleurs bénéfices santé (Rivera-Espinoza et Gallardo-Navarro 2010; Marsh *et al.* 2014) en couplant les avantages des différents microorganismes. Il est intéressant de noter que l'utilisation des souches probiotiques comme starters de fermentation n'est pas répandue pour la production de fruits, légumes ou produits céréaliers fermentés (Lee et Salminen 1995; Heenan *et al.* 2004; Kedia *et al.* 2007) .

L'un des défis majeurs de toute combinaison de substrats et/ou de souches est de surmonter l'aspect sensoriel, avec la saveur acide très présente, afin de produire des aliments fermentés au goût agréable pouvant être consommés régulièrement tout en apportant tous les avantages nutritionnels qu'ils confèrent (Marsh *et al.* 2014). De plus, certaines bactéries sont très sensibles et leur survie durant la durée de vie du produit peut être compromise (Rivera-Espinoza et Gallardo-Navarro 2010).

Les différents paramètres nécessaires à la croissance des souches probiotiques dans les matrices à base de céréales sont la composition et la transformation des grains, la formulation du substrat, la capacité de croissance et la productivité des souches starters, la

stabilité de ces souches durant le stockage, ainsi que les propriétés organoleptiques et nutritionnelles du produit final (Charalampopoulos, Pandiella, et Webb 2003).

1.6.2.2. *L'incorporation des composés liposolubles*

Les composés naturellement liposolubles et possédant des bénéfices santé, tels que les caroténoïdes ou les phytostérols, sont difficiles à mélanger à des matrices alimentaires non grasses et/ou non laitières. Ainsi, cela représente un réel challenge que de les incorporer dans un aliment fonctionnel céréalier. L'incorporation de ces composés bioactifs inclue la maîtrise de nombreux facteurs tels que leur concentration, leur biodisponibilité, le procédé de fabrication du produit et ses conditions de stockage (Santos Fernandes, Silveira Coelho, et De las Mercedes Salas-Mellado 2019).

Chen *et al.* (2013) ont décrit l'importance d'ajouter des caroténoïdes dans les aliments fonctionnels, pour leur impact positif sur la santé. Ces composés peuvent être naturels ou synthétiques. Néanmoins, il est recommandé d'utiliser des caroténoïdes naturels issus de fruits ou légumes (ou de leurs co-produits pour une industrie "verte") puisqu'ils possèdent de meilleurs bénéfices santé, même s'ils sont moins stables que leurs homologues. Plusieurs études soutiennent d'ailleurs que leurs équivalents synthétiques présentent certains effets secondaires négatifs sur la santé tels que l'hypertension, des allergies ou encore une toxicité et une carcinogénicité potentielles (Faustino *et al.* 2019). Les consommateurs, dans un élan de "clean label", demandent d'ailleurs le remplacement des molécules synthétiques par des alternatives naturelles.

Du fait de la supplémentation en caroténoïdes dans un aliment contenant des phytostérols afin d'éviter une compétition gastro-duodéale, il est nécessaire d'adapter le procédé de fabrication ou d'incorporation de ces composés à la matrice. Un aliment fonctionnel céréalier, hydrophile par définition, doit donc être enrichi avec ces composés sous forme dispersibles, en émulsion ou encapsulés, afin d'augmenter leur solubilité en phase aqueuse (Fernández-García *et al.* 2012).

1.6.2.3. *L'importance d'opérations unitaires spécifiques*

Lors de la fabrication d'un aliment, et d'autant plus d'un aliment fonctionnel fermenté à base de céréales enrichi en composés bioactifs, il est nécessaire de veiller aux paramètres de chaque opération unitaire du procédé de fabrication.

Par exemple, lors de la conception d'un aliment à base de maïs, il est nécessaire de faire subir aux grains une nixtamalisation puis une fermentation (Rivera-Espinoza et Gallardo-Navarro 2010). La nixtamalisation, correspondant à un trempage, permet d'abaisser la charge microbienne, d'augmenter la gélatinisation des granules d'amidon et d'améliorer ainsi la valeur nutritionnelle des grains (Sacca *et al.* 2014). La fermentation du maïs par des bactéries lactiques comme *Lactobacillus plantarum* (ubiquitaire, notamment retrouvé sur les plantes comme le maïs), ou encore *Lactobacillus casei* (connu pour ses effets probiotiques dans les produits laitiers) est nécessaire afin d'améliorer la valeur nutritionnelle du produit et d'abaisser son pH pour assurer, entre autres, une plus longue et une meilleure conservation (Rivera-Espinoza et Gallardo-Navarro 2010).

De plus, pour la fabrication d'aliments additionnés en caroténoïdes, la lyophilisation ou l'encapsulation de ces molécules sont les opérations de concentration privilégiées, car elles permettent une meilleure stabilité des molécules au cours du temps et une libération optimisée dans le produit (Rocha, Fávoro-Trindade, et Grosso 2012).

1.6.2.4. *Le transfert à l'échelle pilote, un passage essentiel*

La mise à l'échelle pilote est une phase essentielle dans la mise au point d'un aliment avant l'échelle industrielle. Elle fait partie de la Recherche & Développement, tant que l'objectif principal est d'acquérir de l'expérience et de rassembler des données scientifiques et/ou techniques. Elle permet de soulever des problèmes de mise au point de l'échelle laboratoire, mais aussi de proposer des optimisations de méthodes.

Les installations pilotes sont définies d'après l'Annexe IV du Bulletin Officiel des Impôts 4 A-3-12 n°27 du 21 février 2012 qui spécifie qu'une installation pilote est "un ensemble d'équipements ou de dispositifs permettant de tester un produit ou un procédé à une échelle ou dans un environnement proche de la réalité industrielle"(InnoviSCOP 2016). Les installations pilotes ont globalement les mêmes objectifs que le prototype. Ces données doivent, entre autres, servir à vérifier des hypothèses, élaborer de nouvelles formules, établir de nouvelles spécifications produit, concevoir les équipements et structures spéciaux nécessaires ou encore de rédiger les modes opératoires d'un nouveau procédé. En résumé, les installations pilotes permettent de mener des essais afin d'apporter les modifications nécessaires au produit ou au procédé afin d'en fixer les caractéristiques. Le transfert à

l'échelle pilote représente donc une étape cruciale du développement d'un produit et de son procédé (InnoviSCOP 2016).

2. Effets santé des aliments fonctionnels

2.1. Aliments fonctionnels avec probiotiques et /ou prébiotiques

Produire des aliments fonctionnels présentant des impacts bénéfiques sur la santé gastro-intestinale représente aujourd'hui un intérêt grandissant. Ces aliments peuvent alors être enrichis en probiotiques, prébiotiques, ou être symbiotiques (pré- et probiotiques à la fois). La plupart de ces aliments sont encore des produits laitiers, bien que les produits non-laitiers ou céréaliers commencent à se développer (Salmerón 2017).

2.1.1. Les probiotiques

2.1.1.1. Les souches dites "probiotiques" : définition et physiologie digestive

Les probiotiques sont des bactéries, levures ou moisissures, ayant un bénéfice sur la santé s'ils sont ingérés entre 10^8 à 10^9 cellules vivantes par gramme de produit consommé (Kandylis *et al.* 2016). Les souches probiotiques doivent être non-pathogéniques et faire partie des GRAS (Generally Regarded As Safe). Elles doivent également être peu chères, tout en étant faciles d'utilisation, et garder leur viabilité durant les procédés de fabrication et le stockage des aliments fermentés (Prado *et al.* 2008).

Il est nécessaire qu'elles survivent dans l'appareil digestif humain en étant résistantes aux sucs gastriques, et qu'elles puissent rejoindre l'intestin grêle et le côlon (Rivera-Espinoza et Gallardo-Navarro 2010) pour s'attacher facilement aux cellules intestinales (Prado *et al.* 2008). Cette adhésion aux surfaces mucoales, avantage compétitif, leur permet de coloniser plus facilement l'intestin et de créer des auto-agrégations, évitant d'une part leur élimination par les mouvements péristaltiques, et empêchant d'autre part la colonisation des pathogènes (Rivera-Espinoza et Gallardo-Navarro 2010). Cependant, il existe des données convaincantes démontrant les effets bénéfiques, notamment sur le système immunitaire, des cellules mortes et dégradées de ces mêmes souches. Les souches probiotiques sont principalement d'origine humaine ou animale (dont elles sont les hôtes du tractus gastro-intestinal), mais certains microorganismes ont également été retrouvés sur les plantes et l'environnement en général (Rivera-Espinoza et Gallardo-Navarro 2010).

2.1.1.2. Les effets santé des probiotiques dans les aliments fermentés

Il a été prouvé que les aliments fermentés fournissent à la fois des effets bénéfiques sur la santé directement par l'ingestion de microorganismes probiotiques, mais aussi indirectement via la production de métabolites ou la dégradation des complexes protéiques (Marsh *et al.* 2014). Certains aliments traditionnels, fermentés spontanément, ont d'ailleurs démontré des effets positifs sur le système immunitaire, la teneur en cholestérol et l'hypertension, prouvant la présence de souches probiotiques viables. En outre, ils ont montré des effets modulateurs sur le cerveau et un potentiel anti-cancer (Marsh *et al.* 2014). En plus de diminuer le taux de lactose dans les produits laitiers fermentés par les bactéries lactiques, les souches protéolytiques sont capables de produire des peptides bioactifs. Ces molécules, non seulement antioxydantes, ont montré de nombreux avantages potentiels sur la santé, notamment sur les systèmes digestif, endocrinien, cardiovasculaire, immunitaire et nerveux (Marsh *et al.* 2014).

Les souches reconnues comme probiotiques ont de nombreux effets bénéfiques sur la santé (Figure 2), comme la prévention ou le traitement de maladies : traitement des diarrhées, inhibition de *Helicobacter pylori*, diminution des maladies inflammatoires, prévention de certains cancers gastro-intestinaux, des maladies cardiovasculaires et de maladies allergiques, amélioration du système immunitaire et propriétés anti-mutagènes (Prado *et al.* 2008; Rivera-Espinoza et Gallardo-Navarro 2010). Certaines bactéries lactiques sont capables de métaboliser des composés à fort potentiel nutritionnel comme des sucres hypocaloriques (sorbitol et mannitol), des oligosaccharides, des vitamines du groupe B (comme l'acide folique). Elles peuvent également libérer des peptides bioactifs, réduire les risques toxiques et les composés anti-nutritionnels (Leroy et De Vuyst 2004). À noter que les bénéfices santé conférés sont souche-spécifique. C'est une des raisons pour laquelle les co-fermentations sont préférées aux fermentations mono-souche.

De plus, les bactéries lactiques sont connues pour métaboliser les sucres fermentescibles en acide lactique, en éthanol et autres métabolites, changeant les caractéristiques du produit, en abaissant son pH et créant ainsi des conditions défavorables à la croissance de potentiels microorganismes pathogènes, que ce soit dans les aliments eux-mêmes ou au sein du microbiote intestinal (Prado *et al.* 2008)

Certaines espèces appartenant aux genres *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium* et *Saccharomyces* (levure) ont aussi démontré leurs bénéfices en tant que souches probiotiques (Sanders et Huis in't Veld 1999; Blandino *et al.* 2003; Vinderola et Reinheimer 2003).



Figure 2 : Quelques effets bénéfiques des probiotiques sur la santé

Néanmoins, lorsque les probiotiques sont ajoutés aux aliments fonctionnels, il est nécessaire de veiller à plusieurs facteurs (récapitulés dans le Tableau 5), pouvant influencer leur survie et leur activité dans le tractus gastro-intestinal.

Tableau 5 : Facteurs à contrôler avant l'utilisation de souches probiotiques

Facteurs essentiels à contrôler
1. L'état physiologique des souches (courbe de croissance)
2. La concentration en probiotiques au moment de l'ingestion (durée de vie de l'aliment)
3. Les conditions de stockage de l'aliment (réfrigération, congélation etc.)
4. La composition chimique de l'aliment : pH, Aw, teneur en carbone, azote, minéraux et oxygène (affection possible des bactéries)
5. Les interactions possibles entre probiotiques et souches fermentatives (si le probiotique n'est pas starter lui-même)

2.1.2. Les prébiotiques

Les prébiotiques sont des composés non-digestibles. La plupart du temps, ils sont issus de la famille des glucides, comme le lactulose, l'inuline, les fructo-oligosaccharides, les polydextroses et les amidons résistants ou certaines fibres. D'ailleurs, les céréales contiennent des fibres solubles, comme le β -glucane et les arabinoxylanes (50 % de la masse sèche du péricarpe du grain de de maïs (INRA 2016)), des galacto- et fructo-oligosaccharides, ainsi que de l'amidon résistant (Andersson *et al.* 2001).

Il a été prouvé que les prébiotiques ingérés ont des effets bénéfiques sur l'hôte, stimulant de manière sélective la croissance et/ou l'activité d'une ou de plusieurs bactéries du côlon. Les ingrédients dits "prébiotiques" ne doivent pas être hydrolysés ou absorbés par le tractus gastro-intestinal supérieur et doivent être un substrat sélectif pour une ou un nombre limité de bactéries, tout en altérant de façon positive la composition du microbiote du côlon afin d'apporter un ensemble d'effets bénéfiques à la santé de l'hôte (Siró *et al.* 2008). Il a ainsi été démontré que certains composés prébiotiques sont capables d'augmenter l'absorption du calcium, améliorant ainsi la teneur en minéraux des os et la densité osseuse. De plus, ils influencent la glycémie et réduisent les taux de cholestérol et de lipides sériques. Les prébiotiques sont connus pour améliorer la croissance et la survie des souches probiotiques et des souches starters. Un aliment contenant à la fois des probiotiques et des prébiotiques est dit "symbiotique" (Prado *et al.* 2008; Siró *et al.* 2008).

2.2. Aliments fonctionnels enrichis en phytomicronutriments et vitamines liposolubles

Les produits fonctionnels développés sont en majorité laitiers et contiennent des composés liposolubles comme des phytostérols, des acides gras omega-3 (acides gras polyinsaturés ou AGPI), des vitamines D ou E (tocophérols et tocotriénols) ou des caroténoïdes provitaminiques A (Alemany-Costa et al. 2012; Gunathilake, Rupasinghe, et Pitts 2013; T. Wang, Soyama, et Luo 2016).

Ne sont développés ici que les bénéfices santé des phytostérols et des caroténoïdes pour les aliments fonctionnels.

2.2.1. Les phytostérols

2.2.1.1. Les stérols et les stanols : définition biochimique

Les phytostérols sont des constituants naturels liposolubles des parois cellulaires des plantes : les stérols libres, aux fonctions structurales, composent les parois cellulaires, tandis que les esters de stérols sont des produits de stockage à l'intérieur de la cellule (Marangoni et Poli, 2010). Les phytostérols sont des triterpènes à tétracycle avec une chaîne latérale liée au carbone 17. Ils sont classés en deux groupes, les stérols et les stanols, en fonction de la présence ou non d'une double liaison en position Δ^5 . Le β -sitostérol, le campestérol et le stigmatérol sont les phytostérols les plus abondants parmi les 250 molécules de phytostérols identifiées (García-Llatas et Rodríguez-Estrada 2011a). Leurs structures moléculaires sont présentées en Figure 3.

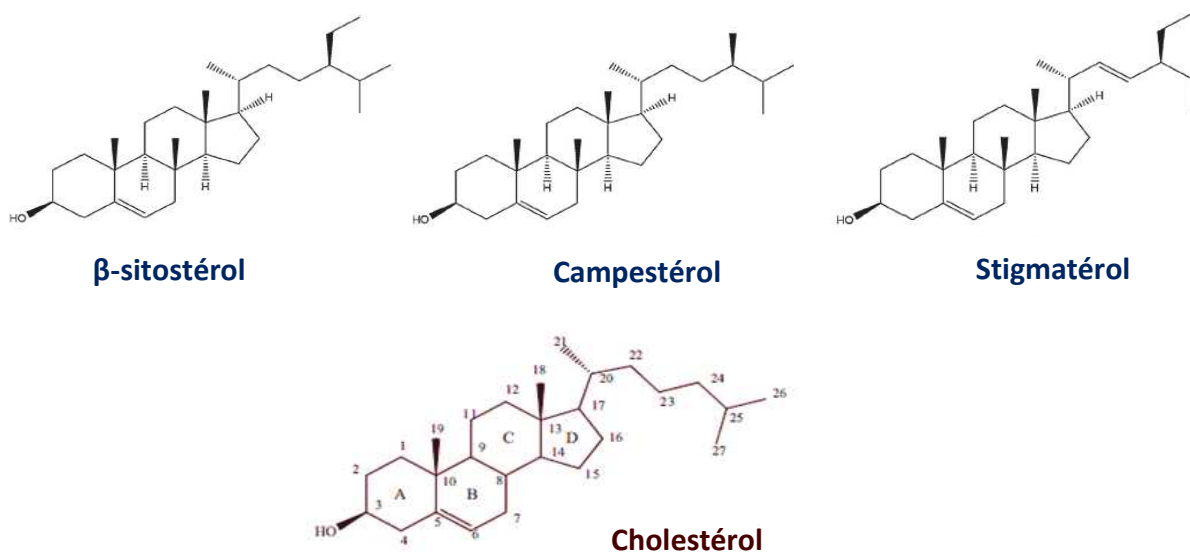


Figure 3 : Structures moléculaires des 3 phytostérols majoritaires et du cholestérol

2.2.1.2. Les effets santé des phytostérols sur l'organisme

Les phytostérols, et notamment le β -sitostérol, sont souvent ajoutés aux aliments fonctionnels pour leur effet hypocholestérolémiant, empêchant l'absorption du cholestérol au moment de la digestion. En effet, n'y a qu'une seule différence structurale entre le sitostérol et le cholestérol : un groupe éthyl additionnel en position C-24 dans le sitostérol (Figure 3).

De nombreuses études démontrent également l'action inhibitrice des phytostérols sur les cancers du poumon, de l'estomac, du sein et ovarien. Il semble qu'ils emploient plusieurs leviers d'action, incluant l'inhibition de la multiplication et de la croissance cellulaire cancéreuse, de l'angiogénèse tumorale et de l'invasion par métastases par la promotion de l'apoptose des cellules cancéreuses (Woyengo, Ramprasath, et Jones 2009; Shahzad *et al.* 2017). La consommation de phytostérols peut également augmenter l'activité des enzymes antioxydantes et réduire ainsi le stress oxydatif.

Afin de bénéficier de ces effets santé, l'apport quotidien de phytostérols recommandé est situé entre 1,6 et 2 g (Woyengo, Ramprasath, et Jones 2009; Marangoni et Poli 2010; Chen, McClements, et Decker 2013b; Shahzad *et al.* 2017).

Dans les aliments fonctionnels, les phytostérols sont ajoutés le plus souvent sous la forme estérifiée ou libre : liposolubles, ils se dissolvent bien dans les matières grasses contenues dans les produits laitiers par exemple. Il est aussi possible de les retrouver sous forme dispersible. Cette dernière est moins connue mais permet d'améliorer l'hydrophilicité de cette molécule et donc de l'incorporer dans des matrices à faible teneur en matière grasse (Thomsen *et al.* 2004; Amir Shaghghi, Harding, et Jones 2014).

2.2.2. Les caroténoïdes

Quelques aliments fonctionnels enrichis en caroténoïdes sont décrits par Garcia-Llatas *et al.* (2015), Hernández-Alvarez *et al.* (2016), Marchetti *et al.* (2018), García-Cayuela *et al.* (2018) et Ellis, Dudenbostel, et Crowe-White (2019). Marchetti *et al.* (2018) ont développé l'addition d'ortie dans des pâtes aux œufs comme un ajout fonctionnel afin d'améliorer la bioaccessibilité de la lutéine et du β -carotène. García-Cayuela *et al.* (2018) ont ajouté du kaki dans un produit laitier pour en faire un produit fonctionnel, tandis qu'Ellis, Dudenbostel, et Crowe-White (2019) ont proposé un jus de pastèque pour augmenter les taux de lycopène chez les femmes ménopausées.

2.2.2.1. Définition et classement

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles naturellement métabolisés par certaines plantes, algues et bactéries photosynthétiques. Plus de 700 caroténoïdes ont été identifiés, alors qu'une cinquantaine seulement sont retrouvés dans le régime alimentaire humain et peuvent être absorbés puis métabolisés par l'organisme (Figure 4) (Maiani *et al.* 2009; Fernández-García *et al.* 2012). Ils confèrent la couleur jaune, orange ou rouge à certains fruits et légumes (Saini, Nile, et Park 2015a), dont certains sont répertoriés dans le Tableau 6. Les caroténoïdes sont donc des composés organiques, faisant partie des terpènes, une classe d'hydrocarbures. La majorité d'entre eux sont des tétraterpénoïdes en C₄₀, biosynthétisés par la liaison de deux molécules de diphosphate de géranylgeranyle en C₂₀. Ils sont constitués de 8 unités isoprénoïdes. Ces molécules sont classées en deux groupes basés sur leurs groupes fonctionnels : les xanthophylles (β -cryptoxanthine, lutéine, zéaxanthine etc.) dont le groupe fonctionnel est l'oxygène, et les carotènes (α -carotène, β -carotène et lycopène) ne contenant que la chaîne hydrocarbonée mère sans groupe fonctionnel (Saini *et al.* 2015).

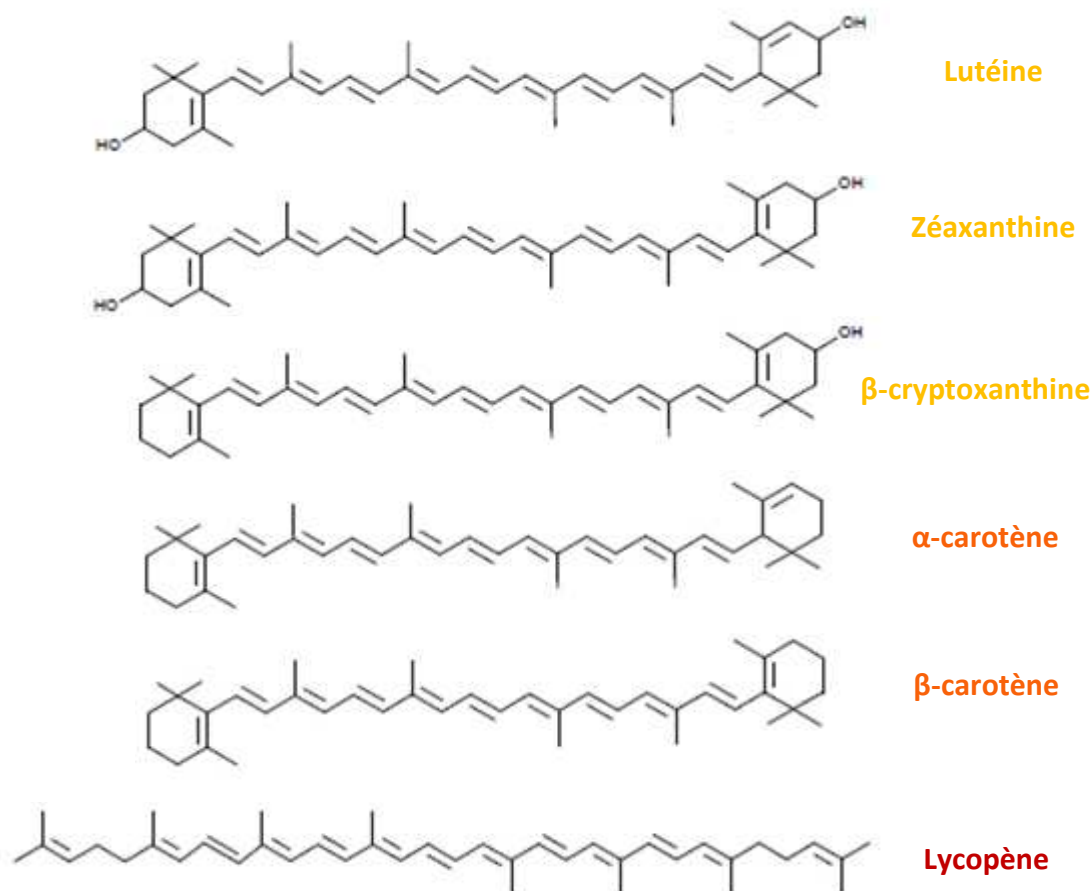


Figure 4 : Structure chimique de quelques caroténoïdes majoritaires

Tableau 6 : Teneurs des caroténoïdes majoritaires dans certains fruits et légumes (d'après Maiani *et al.* (2009) et Fleshman *et al.* (2011))

$\mu\text{g}/100 \text{ g}$ de produit frais	Lutéine	β -cryptoxanthine	β -carotène	Lycopène
Papaye	93 – 318	< 1 034	81 – 664	< 7 564
Melon	–	ND	< 2098	ND
Banane	86 – 192	< 5	43 – 131	< 247
Potiron	630	60	490	500
Tomate	46 – 213	ND	320 – 1 500	850 – 12 700
Carotte	254 – 510	ND	4 350 – 8 840	ND
Broccoli	707 – 3 300	ND	291 – 1 750	ND

ND : Non Détecté ; – : non référencé

2.2.2.2. Les effets santé des caroténoïdes sur l'organisme

Les humains et les animaux sont incapables de synthétiser les caroténoïdes alors qu'ils peuvent métaboliser certains d'entre eux en vitamine A (rétinol). La vitamine A est connue pour avoir plusieurs fonctions systémiques vitales (Maiani *et al.* 2009; Fernández-García *et al.* 2012). L'activité biologique la plus importante des caroténoïdes réside en leur capacité de clivage en rétinol. Ainsi, 10 % d'entre eux (Tableau 7) sont reconnus comme étant des précurseurs de la vitamine A, possédant la structure chimique principale requise pour agir comme des précurseurs de la vitamine A, c'est-à-dire un cycle de type β non-substitué. Le β -carotène et la β -cryptoxanthine en sont les plus représentatifs (Fernández-García *et al.* 2012). Le β -carotène possède la meilleure activité provitaminique A, puisqu'il est capable de produire deux molécules de rétinol (contre une seule pour la β -cryptoxanthine), qui sont ensuite réduites en vitamine A, en rétinol (Maiani *et al.* 2009; Fernández-García *et al.* 2012). En effet, le clivage oxydatif du β -carotène est effectué par la β -carotène-monooxygénase-1 (ou β -carotène-15,15'-monooxygénase), qui le clive en 2 molécules de trans-rétinol (rétinol-aldéhyde) : c'est la première étape de la biosynthèse de la vitamine A (Grune *et al.* 2010; Fernández-García *et al.* 2012). Ainsi, 1 mg de rétinol est obtenu depuis 6 mg de β -carotène ou 12 mg des autres caroténoïdes proactifs, comme la β -cryptoxanthine. Néanmoins, il est accepté que ces paramètres peuvent surestimer ou sous-estimer la biodisponibilité des caroténoïdes si l'on considère les autres facteurs entrant en jeu dans l'altération de l'efficacité de la biodisponibilité, comme la teneur en caroténoïdes de l'aliment étudié, le type de matrice et son degré de transformation (Fernández-García *et al.* 2012).

Tableau 7 : Caroténoïdes possédant une activité provitaminique A. La valeur provitaminique est calculée relativement à celle du β -carotèneD'après Fernández-García *et al.* (2012)

Caroténoïdes	% d'activité
<i>Trans</i> - β -carotène	100
<i>9-cis</i> - β -carotène	38
<i>13-cis</i> - β -carotène	53
<i>Trans</i> - α -carotène	53
<i>9-cis</i> - α -carotène	13
<i>13-cis</i> - α -carotène	16
<i>Trans</i> - β -cryptoxanthine	57
<i>9-cis</i> - β -cryptoxanthine	27
<i>15-cis</i> - β -cryptoxanthine	42
β -carotène-6,6-époxyde	21
Mutatochrome	50
γ -carotène	42-50
B-zéacarotène	20-40

Seulement 6 caroténoïdes (α et β -carotène, β -cryptoxanthine, lycopène, lutéine et zéaxanthine) représentent plus de 95 % de la teneur totale en caroténoïdes sanguins.

Les caroténoïdes sont aussi connus pour être des antioxydants naturels et des améliorants du système immunitaire. Ils aident alors l'organisme à maintenir une santé oculaire, une fonction épithéliale, un développement embryonnaire et une fonction du système immunitaire (Stephensen 2001). Ils présentent en effet des bénéfices sur la santé humaine en diminuant le risque de maladies cardiovasculaires, la fréquence des cancers et de maladies des yeux comme la cataracte et la dégénérescence maculaire (Jomova et Valko 2013; Rodriguez-Amaya 2015).

D'autres caroténoïdes, non provitaminiques A, sont de puissants antioxydants (Fiedor et Burda 2014). Le lycopène par exemple, possède d'autres bénéfices sur la santé, tels que la diminution du développement des cancers de la prostate, du col utérin, du côlon, du rectum, de l'estomac et d'autres types de cancers (Giovannucci 1999).

Supplémenter en caroténoïdes les produits fonctionnels contenant des phytostérols apparaît comme une nécessité, puisqu'il est suggéré que les phytostérols réduisent

l'incorporation des caroténoïdes dans les micelles mixtes durant les premières étapes de la digestion (Baumgartner *et al.* 2017). La compétition entre les phytostérols et le β -carotène pour l'absorption intestinale a d'ailleurs été reportée par Fardet, Morise, Kalonji, Margaritis, & Mariotti, (2015). Noakes *et al.* (2002) et Berger, Jones, et Abumweis (2004) ont démontré qu'un apport de 2 mg de caroténoïdes par portion de 125 g est suffisant pour contrecarrer leur compétition avec les phytostérols pendant la digestion. De plus, la bioaccessibilité des composés liposolubles, comme les caroténoïdes naturels et les phytostérols, est contrainte à plusieurs facteurs dont le degré de transformation de l'aliment et la composition de la matrice elle-même. L'homogénéisation et le traitement thermique sont cependant connus pour avoir des effets positifs sur la bioaccessibilité de ces composés (Fernández-García *et al.* 2012).

3. Métabolisme d'absorption et biodisponibilité des micronutriments liposolubles

3.1. La digestion des composés liposolubles : généralités

Les composés liposolubles doivent être préalablement hydrolysés par des enzymes gastriques et intestinales afin d'être absorbés par l'organisme. Au niveau gastrique, les composés liposolubles sont émulsifiés dans des globules gras contenant des triglycérides, phospholipides et vitamines liposolubles. La présence d'aliments dans l'estomac induit des mouvements péristaltiques favorisant cette émulsion lipidique (Amiot, Coxam, et Strigler 2012; Sherwood 2015).

Le foie produit la bile, stockée dans la vésicule biliaire et constituée de sels biliaires, de cholestérol, de lécithine et de bilirubine, baignant dans un liquide aqueux alcalin. Les sels biliaires, aux propriétés émulsifiantes, facilitent la digestion des lipides et leur absorption par la formation de micelles. Une molécule de sel biliaire est amphiphile : elle comporte une partie liposoluble (un stéroïde dérivé du cholestérol) et une partie hydrosoluble chargée négativement. De ce fait, les sels biliaires sont absorbés à la surface des globules gras, formant ainsi une émulsion stable de petites gouttelettes lipidiques, dont les triglycérides sont hydrolysés par la lipase gastrique ou pancréatique. Les sels biliaires, associés au cholestérol et à la lécithine, aident également à l'absorption des lipides par la formation des micelles (Figure 5). Ce sont des agrégats un million de fois plus petits qu'une gouttelette d'émulsion lipidique, formés de sels biliaires et de lécithine, et dont le centre est hydrophobe et la périphérie hydrophile. Les micelles, à l'enveloppe hydrophile, sont donc hydrosolubles, alors que des substances lipophiles se trouvent en solution en leur centre. Elles sont le moyen de transport de nombreuses molécules vers leur site d'absorption, comme les produits de digestion lipidiques (monoglycérides et acides gras libres) ou encore les vitamines liposolubles (caroténoïdes, tocophérols) (Sherwood 2015).

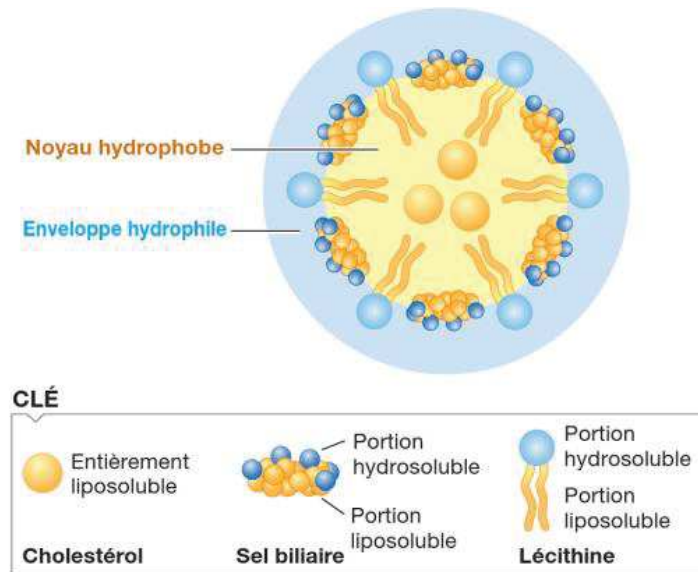


Figure 5 : Schéma d'une micelle

Sherwood (2015)

C'est dans l'intestin grêle, et en particulier le duodénum, qu'a lieu la quasi-totalité de la digestion et de l'absorption des lipides, mais aussi des électrolytes, des vitamines et de l'eau. En effet, ses parois sont tapissées de microvillosités, formant une bordure en brosse, augmentant ainsi la surface d'absorption des nutriments. Les micelles se dissocient au niveau de cette bordure à l'aide de la lipase pancréatique. Les cellules épithéliales de la muqueuse de l'intestin grêle sont dotées d'une variété de systèmes spécialisés de transport : transport passif (diffusion simple, diffusion facilitée, osmose), et transport actif (par consommation d'énergie ATP) (Sherwood 2015).

3.2. Le cas des caroténoïdes

3.2.1. Métabolisme d'absorption des caroténoïdes

Les caroténoïdes étant liposolubles, leur processus de digestion est étroitement lié à celui des lipides. Les étapes principales de leur métabolisme d'absorption sont décrites dans la Figure 6 ci-dessous : (1) extraction de la matrice alimentaire, émulsification et solubilisation dans les micelles, (2) absorption intestinale par les entérocytes et transfert vers les chylomicrons, (3) conversion des caroténoïdes provitaminiques A en vitamine A, et (4) transport vers les organes cibles par des lipoprotéines. En effet, le foie sécrète des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) pour transporter les caroténoïdes vers les tissus. Ces VLDL sont réduites en lipoprotéines de faible densité (LDL) qui sont captées par les

cellules adipeuses (80 % des réserves). D'autres lipoprotéines de haute densité (HDL) pourraient intervenir dans le transport tissulaire et seraient d'origine extra-hépatique ou d'origine entérocytaire (Faure *et al* 1999).

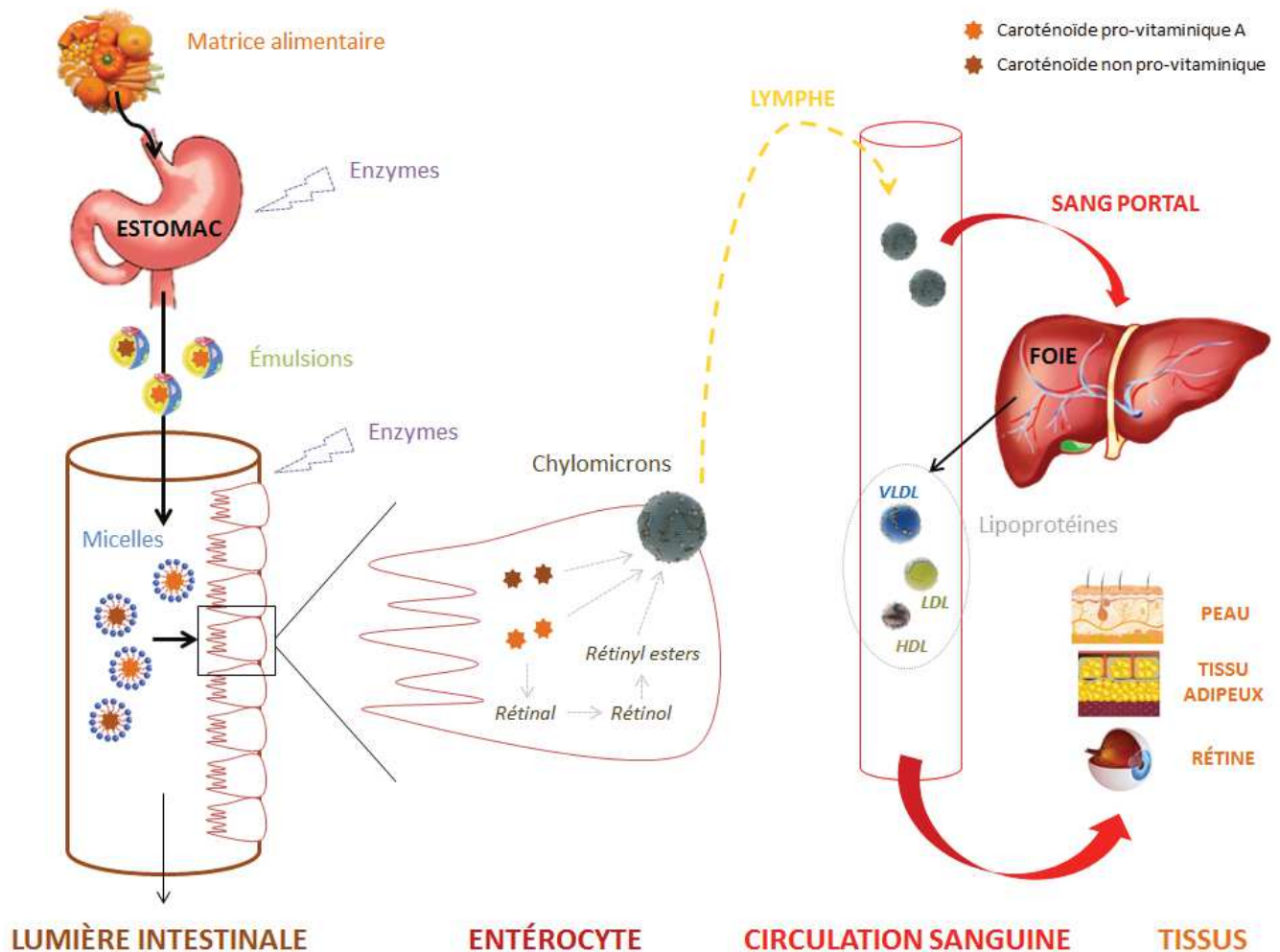


Figure 6 : Absorption et métabolisme des caroténoïdes

D'après Desmarchelier et Borel (2017)

3.2.2. Digestion gastro-duodénale des caroténoïdes

Les caroténoïdes, comme les autres composés liposolubles, sont premièrement dissous dans la phase lipidique du bol alimentaire, puis émulsifiés en gouttelettes lipidiques dans l'estomac et le duodénum. Il a été démontré par des études *in vitro* que l'hydrolyse des esters de xanthophylles par les lipases était nécessaire à l'absorption. La cholestérol-ester-hydrolase contenue dans le suc pancréatique a été reconnue comme responsable de l'hydrolyse des esters de xanthophylles (Breithaupt, Bamedi, et Wirt 2002).

Selon ces auteurs, les esters de β -cryptoxanthine ne sont pas retrouvés au niveau plasmatique, mais la biodisponibilité des formes libres et estérifiées est la même après ingestion de fruits chez l'Homme (Breithaupt *et al.* 2003). Il est donc admis que les esters sont majoritairement hydrolysés dans l'estomac avant absorption intestinale ; les esters de xanthophylles restants non clivés pourraient l'être au niveau de la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'intestin grêle, ou dans le cytosol de l'entérocyte (Dhuique-Mayer *et al.* 2007). Durant la digestion gastro-duodénale, les caroténoïdes sont incorporés dans les micelles mixtes avec les lipides, comme le cholestérol et les phospholipides, et les autres produits de la digestion lipidique (acides gras libres, monoacylglycérols, lysophospholipides etc.) (Reboul 2013). Une partie des caroténoïdes peut aussi se lier avec des protéines, comme le β -carotène avec la β -lactoglobuline. Les mécanismes d'absorption des caroténoïdes dépendent en partie de leurs transporteurs. Les micelles mixtes sont isolées du reste du bol alimentaire dans la couche d'eau de la zone du glycocalyx (Phan et Tso 2001), où les caroténoïdes peuvent être absorbés au niveau de la bordure en brosse par diffusion passive et/ou via un processus transporteur-dépendant.

La bioaccessibilité des caroténoïdes correspond à la fraction absorbable des caroténoïdes, libérée par la matrice alimentaire et incluse dans les micelles mixtes : cela représente donc la fraction de caroténoïdes micellarisés potentiellement absorbables par l'entérocyte. Les xanthophylles, tels que la β -cryptoxanthine, ont montré une bioaccessibilité plus élevée que les carotènes, probablement due à leurs groupes hydroxylés, augmentant ainsi leur hydrophilicité (Reboul, Richelle, *et al.* 2006; Mapelli-Brahm *et al.* 2017). D'une manière générale, la micellarisation des xanthophylles est supérieure à celle des carotènes : xanthophylles > β -carotène = α -carotène > lycopène (Desmarchelier et Borel 2017). Récemment, Mapelli-Brahm *et al.* (2017) ont conclu que le phytoène et le phytofluène de fruits avaient une meilleure bioaccessibilité que la β -cryptoxanthine, le β -carotène et l' α -carotène.

3.2.3. Absorption des caroténoïdes

Différentes études cliniques ont démontré que l'absorption du β -carotène pouvait fluctuer entre 10 et 30 % : cela peut être dû d'une part aux conditions de micellarisation de la molécule, et d'autre part à son absorption et son transport modérés à travers l'entérocyte (van Lieshout, West, et van Breemen 2003; Van Loo-Bouwman *et al.* 2010). Des études sur

cellules différenciées Caco-2 en monocouches ont montré que l'assimilation du phytofluène, du β -carotène et de la lutéine était similaire et significativement plus élevée que celle du phytoène, alors que celle du lycopène était la plus faible (During *et al.* 2002; Mapelli-Brahm *et al.* 2018). Ainsi, comme pour la micellarisation, l'absorption est corrélée avec la polarité des caroténoïdes. Cela pourrait expliquer que les caroténoïdes polaires possèdent une plus grande affinité pour les transporteurs lipidiques et/ou pour les membranes plasmiques, induisant une augmentation de leur absorption (Reboul 2019).

3.2.3.1. *Transport apical à travers la membrane de la bordure en brosse d'un entérocyte*

Il a longtemps été admis que l'absorption des caroténoïdes par les entérocytes se faisait par diffusion passive, mais cela était incompatible avec la variabilité d'absorption observée chez l'Homme, ou encore avec la compétition pour l'absorption entre les caroténoïdes et les autres micronutriments liposolubles. Il est toujours accepté qu'une fraction de caroténoïdes est absorbée par diffusion passive, dépendant de la concentration en caroténoïdes dans le lumen. Cependant, plusieurs transporteurs lipidiques jouant un rôle dans l'absorption des caroténoïdes ont été identifiés (During, Dawson, et Harrison 2005; Reboul, Klein, *et al.* 2006; Patrick Borel *et al.* 2013).

L'un des premiers résultats clé a été l'identification du gène *ninaD* codant pour un récepteur scavenger de classe B, essentiel pour la distribution cellulaire de la xanthophylle chez la drosophile (Kiefer *et al.* 2002). Cela a ensuite permis d'identifier le récepteur scavenger de classe B de type I (SR-BI) comme un transporteur clé de la lutéine dans les cellules intestinales humaines Caco-2 TC7. SR-BI est une glycoprotéine transmembranaire ubiquitaire se trouvant sur la membrane apicale des entérocytes, en gradient décroissant du duodénum au côlon. Il a été prouvé qu'elle présente une spécificité de substrat, facilitant ainsi l'absorption du cholestérol libre, mais aussi d'autres lipides tels que les esters de cholestérol, les phospholipides et les produits d'hydrolyse du triacylglycérol (Hauser *et al.* 1998; Bietrix *et al.* 2006). Son implication a également été démontrée dans l'absorption intestinale du lycopène (Moussa *et al.* 2008), des caroténoïdes provitaminiques A (Patrick Borel *et al.* 2013) et du phytoène et phytofluène (Mapelli-Brahm *et al.* 2018). En revanche, SR-BI n'est pas impliqué dans l'absorption de la vitamine A micellaire préformée, ou rétinol (Patrick Borel *et al.* 2013).

Un autre récepteur scavenger reconnu d'intérêt est le CD36 (Cluster Determinant 36). C'est une protéine membranaire très exprimée dans la bordure en brosse au niveau du duodénum et du jéjunum (Terpstra *et al.* 2000). Elle est supposée jouer un rôle clé dans l'absorption intestinale des acides gras à longue chaîne, mais présente aussi une large spécificité de substrats (Gerda *et al.* 1993; Rigotti, Acton, et Krieger 1995; Drover *et al.* 2008). CD36 facilite, directement ou indirectement, l'absorption des vitamines liposolubles dans l'intestin (Reboul *et al.* 2011; Goncalves, Margier, *et al.* 2014; Goncalves, Roi, *et al.* 2014), mais aussi du lycopène, du β -carotène, de l' α -carotène, de la β -cryptoxanthine et de la lutéine.

Le dernier transporteur impliqué dans l'absorption des caroténoïdes est le NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1), qui est l'un des transporteurs principaux des stérols dans l'intestin (Reboul, Klein, *et al.* 2006; Reboul *et al.* 2011). NPC1L1 est impliqué dans l'absorption intestinale de l' α -carotène, du β -carotène, de la β -cryptoxanthine et de la lutéine (During, Dawson, et Harrison 2005; Sato *et al.* 2012), mais pas du lycopène ni du phytoène et phytofluène (Moussa *et al.* 2008; Mapelli-Brahm *et al.* 2018).

3.2.3.2. Transport cytosolique et métabolisme intracellulaire

En tant que transporteurs membranaires des caroténoïdes, SR-BI, CD36 et NPC1L1 pourraient aussi agir en tant que transporteurs cytosoliques à l'intérieur de l'entérocyte (Reboul 2013). Environ 40 % des caroténoïdes absorbés ne sont pas métabolisés.

Le β -carotène peut être clivé en une seule étape en rétinal dans l'entérocyte, par une enzyme cytosolique, la β -carotène oxygénase 1 (BCO1) (dela Seña *et al.* 2014). D'autres caroténoïdes, comme la β -cryptoxanthine (xanthophylle), peuvent être clivés en rétinal par un processus en plusieurs étapes, impliquant à la fois la β -carotène oxygénase 2 (BCO2) mitochondriale et la BCO1 cytosolique (Amengual *et al.* 2013). Le rétinal ainsi produit est ensuite converti en rétinol et estérifié en esters de rétinyl par la lécithine-rétinol acyltransférase (LRAT) et probablement aussi par la diacylglycérol acyltransférase 1 (DGAT1) (O'Byrne *et al.* 2005; Wongsiriroj *et al.* 2008). Les caroténoïdes (provitaminiques A ou non) peuvent être scindés asymétriquement en apocaroténoïdes par la BCO2 (Palczewski *et al.* 2014).

3.2.3.3. Sécrétion à travers la membrane basolatérale de l'entérocyte

Pendant la période post-prandiale, la majorité des caroténoïdes libres et des esters de rétinyl est clivée et incluse dans des chylomicrons (voie apoB-dépendante), pour ensuite être sécrétée dans la lymphe et rejoindre le système sanguin. Une voie non-apoB-dépendante (via les HDL), gérée par le transporteur ABCA1 (ATP binding cassette A1), est impliquée dans l'absorption des caroténoïdes mais aussi de la vitamine E et probablement d'une partie du rétinol libre (Reboul 2013). La voie du HDL pourrait aussi exister pour les xanthophylles, comme la lutéine et la zéaxanthine (Niesor *et al.* 2014). Des études récentes ont également démontré que plusieurs variantes génétiques d'un gène d'ABCA1 pouvaient être associées aux réponses post-prandiales du lycopène et du β -carotène (Patrick Borel *et al.* 2015a; 2015b).

La Figure 7 selon Reboul (2019) présente un résumé des voies de transport des caroténoïdes à travers l'entérocyte. Les caroténoïdes sont capturés à partir des micelles mixtes et probablement par les transporteurs protéiques de la membrane apicale, SR-BI, CD36 et NPC1L1. Une fraction du phytoène et du phytofluène peut être renvoyée dans la lumière intestinale par des transporteurs membranaires apicaux (comme SR-BI ou autres). Une autre fraction est transportée vers le site où elle est transformée en chylomicrons. Des protéines peuvent être impliquées dans le transport intracellulaire des caroténoïdes, mais aucune n'a été clairement identifiée. Les caroténoïdes provitaminiques A sont partiellement métabolisés en esters de rétinyl. Les esters de rétinyl et les caroténoïdes sont ensuite sécrétés dans la lymphe sous forme de chylomicrons, alors qu'une partie des xanthophylles et une partie des métabolites plus polaires, comme les apocaroténoïdes, peuvent être sécrétés par la voie HDL.

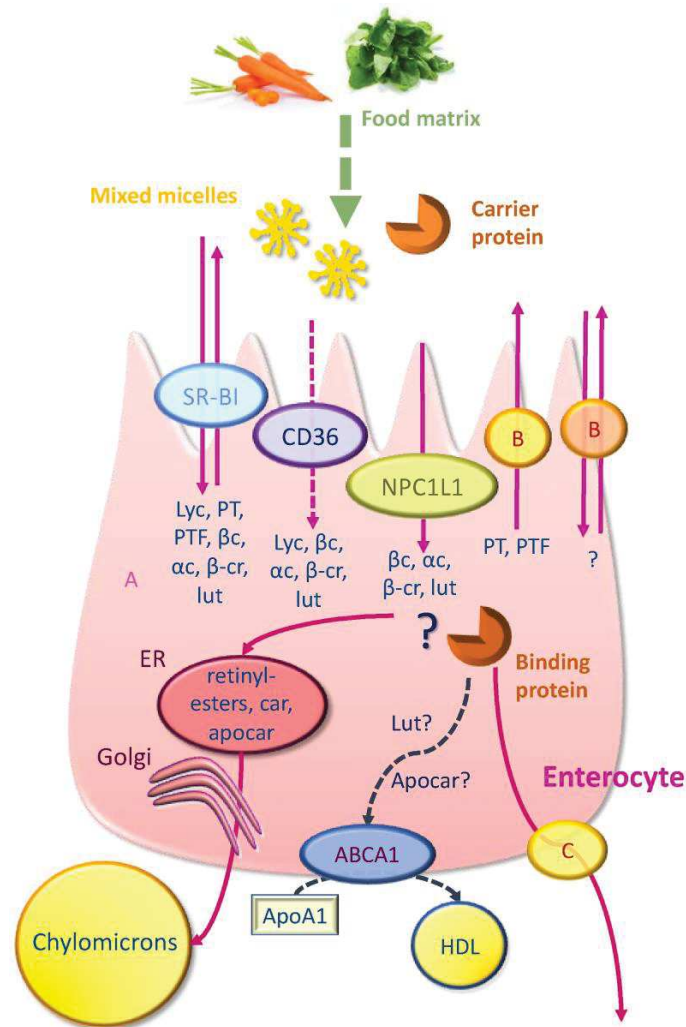


Figure 7 : Voies d'absorption, de transport, et de sécrétion des caroténoïdes à travers l'entérocyte
(Reboul 2019)

PT = phytoène ; PTF = phytofluène ; Lyc = lycopène ; β C = β -carotène ; α C = α -carotène ; β Cr = β -cryptoxanthine ; Lut = lutéine ; Car = caroténoïdes ; Apocar = apocaroténoïdes ; A = diffusion passive ; B = transporteur apical non identifié ; C = Transporteur basolatéral non identifié ; ? = Voie supposée ; ER = réticulum endoplasmique

3.2.3.4. Distribution tissulaire

Après sécrétion dans la circulation sanguine, les chylomicrons sont hydrolysés par des lipoprotéines lipases (van den Berg 1999). Ainsi libérés, les caroténoïdes peuvent être absorbés par tous les tissus de l'organisme, où ils sont d'ailleurs détectés. Leur accumulation est toutefois plus importante dans le foie, puisque c'est lui qui abrite le métabolisme des rétinoïdes : 80 % du rétinol y est stocké sous forme d'esters. Les caroténoïdes se retrouvent également dans le tissu adipeux et la rétine des yeux (Schmitz *et al.* 1991). 76 % des caroténoïdes épithéliaux sont le β -carotène et le lycopène (Scarmo *et al.* 2010) suggérant leur rôle dans la photoprotection cutanée, alors que 70 % des caroténoïdes de la rétine

(macula lutea) sont la lutéine, la zéaxanthine et la mésozéaxanthine, jouant un rôle contre la dégénérescence maculaire (Landrum et Bone 2001).

3.3. Les facteurs influençant la biodisponibilité des caroténoïdes : SLAMENGHI

Plusieurs facteurs ayant un impact sur la biodisponibilité des caroténoïdes ont été identifiés. Ils ont été présentés par de Pee and West (1996) sous l'acronyme SLAMENGHI, chaque lettre représentant un facteur : S (*Species of carotenoids*) correspondant à la nature des caroténoïdes absorbés, L (*molecular Linkage*) faisant référence aux conformations chimiques des caroténoïdes (estérification, conjugaison etc.), A (*Amount of carotenoids in the meal*) faisant référence à la quantité de caroténoïdes ingérée durant un repas, M (*Matrix properties*) tenant compte de l'effet de la matrice alimentaire dans laquelle les caroténoïdes sont incorporés, E (*Effectors*) impliquant les autres nutriments co-ingérés avec les caroténoïdes, N (*Nutrient status*) correspondant au statut en vitamine A de l'hôte, G (*Genetics*) faisant référence aux facteurs génétiques de l'hôte, H (*Host specificity*) représentant les facteurs liés à l'hôte comme l'âge, le genre ou encore le mode de vie, I (*Interactions*) prenant en compte les interactions entre tous ces facteurs.

3.3.1. La nature, la conformation et la quantité des caroténoïdes ingérés (S, L, A)

Plusieurs auteurs (Ferruzzi *et al.* 2006; Aherne *et al.* 2010) ont observé des différences de micellarisation selon la structure des caroténoïdes mais aussi selon leur formes isomériques (*cis* ou *trans*). En effet, les isomères *cis* du β -carotène sont mieux micellarisés que les isomères *trans*. La micellarisation étant corrélée à l'hydrophilicité des caroténoïdes, les xanthophylles présentent une bioaccessibilité plus élevée que les carotènes (Desmarchelier et Borel 2017). Les formes libres ou estérifiées ne sont pas absorbées de la même façon (Ferruzzi *et al.* 2006; Bengtsson *et al.* 2010). De plus, les esters de xanthophylles ne sont pas absorbés directement, car ils doivent d'abord être hydrolysés dans la lumière intestinale (Tanumihardjo 2002). La quantité de caroténoïdes incorporée dans le repas, et si ceux-ci font partie d'un repas ou sont ingérés seuls, influencent également leur biodisponibilité (Tanumihardjo 2002).

3.3.2. La matrice alimentaire (M)

La matrice alimentaire dans laquelle sont incorporés les caroténoïdes est un facteur faisant nettement varier la biodisponibilité des caroténoïdes. En effet, avant absorption, les caroténoïdes doivent être libérés de leur matrice, qui est dégradée dans le tractus intestinal (mastication, digestion). Les traitements technologiques appliqués aux aliments jouent aussi un rôle prépondérant dans la diminution de la taille des particules et dans la fragilisation des membranes cellulaires. Il est connu que les caroténoïdes des fruits sont plus bioaccessibles que ceux des légumes (O'Connell, Ryan, et O'Brien 2007; Jeffery, Holzenburg, et King 2012; Saini, Nile, et Park 2015). En effet, la concentration en β -carotène dans le plasma est 4 fois supérieure après un repas composé de papaye et de mangue plutôt que de légumes/légumes feuilles comme la carotte et les épinards (de Pee *et al.* 1998).

Ceci peut notamment s'expliquer par l'état physique sous lequel s'accumulent les caroténoïdes au sein des végétaux : la biodisponibilité des caroténoïdes est ainsi affectée par la structure des chromoplastes dans les tissus des plantes matures (Figure 8). Il est connu que les chromoplastes de structure globulaire entraînent la biodisponibilité la plus élevée des caroténoïdes, alors que la structure cristalline donne la plus faible (Fleshman *et al.* 2011). Les chromoplastes des melons sont globulaires, et renferment le β -carotène, alors que ceux de la papaye sont globulaires-tubulaires pour le β -carotène et la β -cryptoxanthine mais cristalloïdes pour le lycopène (Jeffery, Holzenburg, et King 2012). Ainsi, les bioaccessibilités du β -carotène de la papaye ou de la mangue sont plus élevées (5,3 – 10,1 %) que celles du β -carotène cristallisé de la carotte et de la tomate (0,5 – 3,1 %) (Schweiggert *et al.* 2012). Les substructures des plastides cristalloïdes sont supposées contenir les caroténoïdes dans un état physique solide-cristallin alors que les substructures globulaires et tubulaires contiennent les caroténoïdes sous la forme liquide-cristalline et/ou dissous dans des lipides (Fleshman *et al.* 2011; Schweiggert *et al.* 2017).

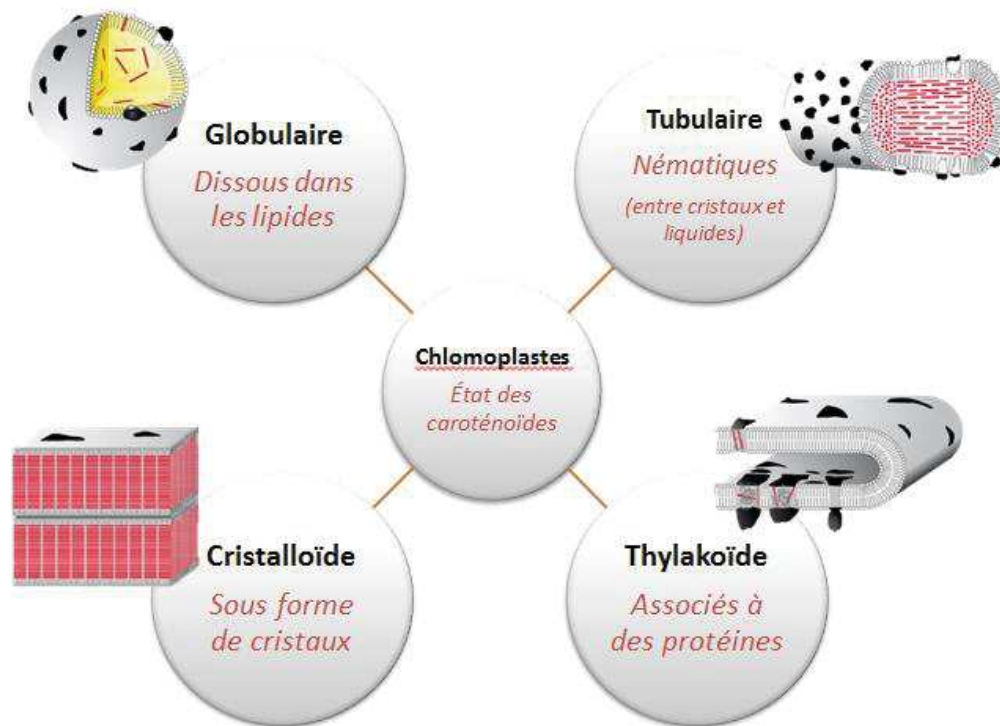


Figure 8 : État physique des caroténoïdes dans les chloroplastes
(adapté de Schweiggert *et al.* 2017)

Les traitements physiques (mécaniques, thermiques, chimiques) avant consommation des aliments, tels que le broyage ou la cuisson, améliorent la bioaccessibilité et la biodisponibilité des caroténoïdes (Lemmens *et al.* 2009; Knockaert *et al.* 2012). En effet, ces traitements induisent une libération accrue des caroténoïdes, par dégradation des parois cellulaires et des structures pectiques, et par dénaturation des protéines (Netzel *et al.* 2011). Dans le cas d'une purée infantile de patate douce, la stérilisation permet d'augmenter 6 fois la bioaccessibilité du β -carotène comparativement à une purée cuite à la vapeur (Dhuique-Mayer *et al.* 2018). L'intégrité cellulaire et la taille des particules mises en avant dans cette étude sont corrélées à la bioaccessibilité.

3.3.3. Les nutriments co-ingérés (E)

Les caroténoïdes sont digérés en même temps que les autres nutriments du bol alimentaire : protéines, lipides, glucides, vitamines et minéraux. Les caroténoïdes suivent la même voie de dégradation et d'absorption que les lipides.

Il est connu que les lipides (triglycérides, phospholipides, phytostérols) peuvent influencer la biodisponibilité des caroténoïdes. Ainsi, une ingestion minimum de 5 g/jour de lipides est nécessaire pour une absorption optimale des caroténoïdes (Ribaya-Mercado 2002). Les lipides provoquent un ralentissement du transit intestinal, permettent la solubilisation des caroténoïdes et facilitent leur incorporation dans les micelles. L'absorption des lipides par les entérocytes stimule la production des chylomicrons pour la sécrétion basolatérale des caroténoïdes (Dash *et al.* 2015). Les phospholipides peuvent affecter la formation des micelles et l'absorption des caroténoïdes par l'entérocyte (Desmarchelier et Borel 2017). Les phytostérols, pour leur part, sont connus pour diminuer la biodisponibilité de l' α -carotène, du β -carotène, du lycopène et de la lutéine chez l'Homme (Fardet *et al.* 2017; Baumgartner *et al.* 2017). Granado-Lorencio *et al.* (2014) ont montré que la β -cryptoxanthine améliorerait l'effet hypocholestérolémiant des phytostérols s'ils étaient co-ingérés, tout en diminuant les risques d'ostéoporose. La compétition pour l'absorption entre les phytostérols et les caroténoïdes, ainsi que leur effet hypocholestérolémiant, seront développés dans des paragraphes ultérieurs.

L'émulsification lipidique est aussi un paramètre à prendre en compte dans l'efficacité de la biodisponibilité des caroténoïdes : la taille des gouttelettes lipidiques est en effet inversement corrélée à la bioaccessibilité des caroténoïdes (Zhang *et al.* 2016), puisqu'en réduisant la taille des particules, la surface d'action des enzymes est plus importante, augmentant ainsi la digestibilité des lipides.

De plus, la longueur des chaînes d'acides gras ainsi que leur degré d'insaturation semblent également influencer la biodisponibilité des caroténoïdes. Ainsi, les carotènes voient leur biodisponibilité augmentée, mais pas les xanthophylles : cela peut s'expliquer par le fait que les micelles formées par des acides gras à longue chaîne carbonée favorisent l'incorporation des carotènes dans leur cœur très hydrophobe (alors que les xanthophylles restent à leur surface) (Qian *et al.* 2012).

Les fibres alimentaires (pectines, gommages, alginates, celluloses etc.) sont connues pour gêner l'absorption des caroténoïdes, et plus particulièrement du β -carotène, du lycopène et de la lutéine. Elles empêchent notamment une micellarisation efficace des caroténoïdes par l'altération de l'activité des enzymes de dégradation (lipases) ou à cause d'interactions avec les produits de la digestion lipidique et les sels biliaires. Elles sont aussi

responsables d'une augmentation de volume du chyme et donc d'un changement de viscosité du milieu, pouvant entraver l'absorption des caroténoïdes (Borel *et al.* 2005).

Il est possible d'observer des interactions et compétitions entre les caroténoïdes eux-mêmes, à plusieurs niveaux : soit au moment de l'incorporation dans les globules lipidiques ou les micelles, soit pour l'absorption par l'entérocyte ou dans les chylomicrons, mais aussi probablement au niveau de l'absorption cellulaire (van den Berg 1999).

Les protéines, quant à elles, sont connues pour stabiliser les émulsions lipidiques dans l'intestin, pour améliorer la formation des micelles et l'absorption des caroténoïdes. La lécithine, contenue dans la bile, facilite également la formation des micelles et donc l'absorption des caroténoïdes (Castenmiller et West 1998).

3.3.4. Les facteurs humains (N, G, H)

Plusieurs facteurs humains peuvent agir sur l'absorption des caroténoïdes. En effet, il existe un large éventail de variations inter-individuelles de biodisponibilité des caroténoïdes chez l'Homme (Desmarchelier et Borel 2018; Bohn *et al.* 2017). Les facteurs génétiques, comme l'âge, le sexe, le mode de vie, les pathologies, le statut en vitamine A et autres paramètres physiologiques (lipidémie, cholestérolémie) jouent un rôle important dans l'absorption des caroténoïdes (Faure *et al.* 2006; L. Wang *et al.* 2008). Par exemple, le statut en vitamines ou minéraux (carences en fer, zinc), ou le statut de l'hôte par rapport aux maladies ou un état d'inflammation, peuvent affecter l'absorption du β -carotène, et donc la bioconversion en rétinol (Bechoff et Dhuique-Mayer 2017).

3.3.5. Les interactions entre facteurs (I)

Tous ces facteurs peuvent interagir entre eux, de manière synergique ou antagoniste, sur la biodisponibilité des caroténoïdes. En effet, la somme des effets de facteurs individuels n'est pas égale à la combinaison de ces facteurs (Castenmiller et West 1998).

3.4. Le cas des stérols

3.4.1. Absorption des phytostérols végétaux et du cholestérol

L'absorption des stérols (phytostérols végétaux et cholestérol) est composée de trois étapes principales présentées dans la Figure 9 : (1) extraction de la matrice alimentaire,

émulsification et incorporation dans les micelles, (2) relargage et transport vers l'entérocyte par le transporteur NPC1L1, (3) efflux de la majorité des phytostérols dans la lumière intestinale via les transporteurs ABCG5/G8 et estérification du cholestérol via l'acyl-CoA:cholesterol acyltransférase 2 (ACAT2) permettant leur incorporation dans les chylomicrons qui iront rejoindre la lymphe puis le système sanguin.

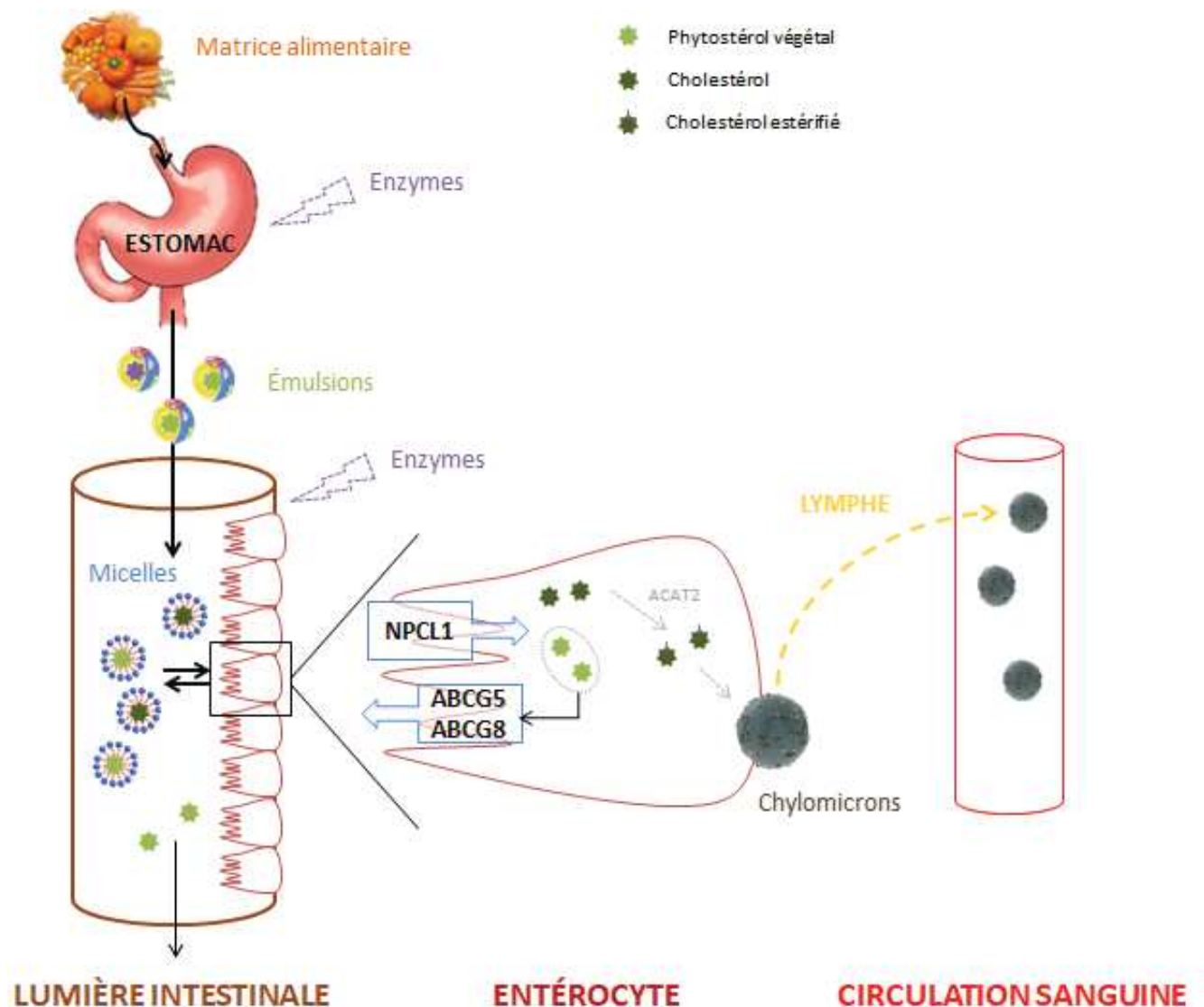


Figure 9 : Absorption et métabolisme des stérols

D'après Gylling *et al.* (2014) et Desmarchelier et Borel (2017)

L'absorption des phytostérols est connue pour être relativement faible, entre 0,5 et 1,9 % pour le sitostérol et le campestérol respectivement (Fernandez et Vega-Lopez 2005).

L'absorption des stérols, lorsqu'ils sont sous forme estérifiée, débute par une hydrolyse enzymatique par l'ester-hydrolase pancréatique, puis s'ensuit leur solubilisation dans les micelles mixtes (Marangoni et Poli 2010). Ils sont ensuite absorbés par l'entérocyte soit par diffusion passive, soit par un procédé médié par un transporteur. L'absorption des phytostérols et du cholestérol est similaire. Leur transporteur spécifique supposé est NPC1L1, une protéine de transport transmembranaire (Davis et Altmann 2009). La chaîne latérale des phytostérols est responsable de l'efflux sélectif des phytostérols, depuis l'entérocyte jusqu'à la lumière intestinale. Cet efflux est géré par les transporteurs protéiques ABC (ATP-binding cassette), ABCG5 et ABCG8 (Fernandez et Vega-Lopez 2005). Il a été suggéré qu'ABCG5 et ABCG8 jouent également un rôle dans la sécrétion biliaire des stérols. Dans la muqueuse, une partie des phytostérols est ré-estérifiée par l'acyl-CoA:cholesterol acyltransférase (ACAT). L'estérification intestinale des stérols par l'ACAT est significativement plus efficace pour le cholestérol que pour les phytostérols (Trautwein *et al.* 2003). En conséquence, le taux plasmatique de phytostérols chez l'Homme est normalement équivalent à 0,5 % (0,05 % pour les stanols) de celui du cholestérol, reflétant à la fois la synthèse endogène élevée de cholestérol par le foie, et l'absorption peu efficace des phytostérols par l'intestin grêle (de Jong, Plat, et Mensink 2003).

3.4.2. Distribution et excrétion des stérols

Les phytostérols et le cholestérol absorbés sont transportés vers le foie via les chylomicrons. Dans les modèles expérimentaux, seulement 12 % des phytostérols sont transportés sous la forme estérifiée dans les chylomicrons, contre 70 à 80 % du cholestérol (Marangoni et Poli 2010). Les phytostérols libres sont transportés à la surface lipidique des chylomicrons. Une fois assimilés par le foie, les phytostérols sont sécrétés dans la circulation sanguine en tant que constituants des particules VLDL (Very Low Density Lipoproteins). Au niveau cellulaire, les phytostérols sont stockés dans le cytoplasme ou incorporés dans la membrane cellulaire. Ils n'ont en revanche pas de rôle biologique ou fonctionnel connu (Trautwein *et al.* 2003). L'excrétion des phytostérols absorbés a lieu par la voie biliaire, alors qu'une fraction mineure est excrétée à travers la peau. Associée à une absorption faible, l'excrétion des phytostérols est rapide et responsable de la taille plus faible du pool endogène de phytostérols par rapport au cholestérol (Marangoni et Poli 2010).

3.5. Compétition et interactions entre les micronutriments

3.5.1. Phytostérols vs cholestérol

Les phytostérols étant des analogues végétaux du cholestérol : la seule différence structurale entre les 2 molécules est soit un groupe éthyle ou méthyle additionnel sur les chaînes latérales en position C-24 du phytostérol, soit la présence d'une double liaison (García-Llatas et Rodríguez-Estrada 2011). Cette différence est probablement responsable de la faible absorption des phytostérols et notamment du sitostérol.

Il est admis qu'un apport journalier de 1,6 à 2 g (2 g/100 g est la dose souvent utilisée dans les produits fonctionnels), permet de réduire l'absorption du cholestérol de 30 % et le taux de cholestérol LDL dans le plasma de 8 à 10 % (Marangoni et Poli, 2010). Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'effet hypocholestérolémiant des phytostérols : (1) leur compétition avec les molécules de cholestérol pour l'incorporation dans les micelles mixtes et les chylomicrons, (2) la co-cristallisation avec le cholestérol amenant à une augmentation de l'excrétion fécale du cholestérol, (3) la modification de l'expression des gènes codants pour les protéines du transporteur de stérols NPC1L1 ou des transporteurs ABCG5 et ABCG8, facilitant ainsi l'efflux du cholestérol, des entérocytes vers la lumière intestinale, (4) la diminution du taux de ré-estérification du cholestérol dans l'entérocyte (Marangoni et Poli 2010; Gylling et Simonen 2015). De ce fait, les phytostérols peuvent diminuer le risque de maladies cardiovasculaires, mais aussi le risque d'incidence des cancers de 20 % (Shahzad *et al.* 2017).

Plusieurs études (Volpe *et al.* 2001; Noakes *et al.* 2005; Korpela *et al.* 2006; Rudkowska *et al.* 2008) ont démontré que les stérols estérifiés de plantes bien homogénéisés dans des produits laitiers faibles en matière grasse (lait, yaourt, fromage) pouvaient réduire les taux de cholestérol total sérique et de cholestérol-LDL. Cependant, un test clinique mené par Thomsen *et al.* (2004) a démontré que des stérols libres mélangés aux mêmes types de produits laitiers étaient aussi capables de diminuer le taux de cholestérol de sujets hypercholestérolémiques. Ces résultats ont été confirmés par Amir Shaghghi, Harding, et Jones (2014), qui ont montré qu'une formulation de stérols libres dispersibles et de stérols estérifiés diminuait de façon similaire le cholestérol total et le cholestérol LDL. De plus, les auteurs ont démontré une réduction du profil lipidique sanguin en diminuant les triglycérides et le rapport CT/HDL (Cholestérol Total/Cholestérol HDL), un indice combinant

la proportion de lipides athérogènes à anti-athérogènes et de lipoprotéines. Ces études soutiennent donc l'utilisation des formes hydrosolubles (ou dispersibles) des phytostérols en place et lieu des stérols estérifiés traditionnels.

3.5.2. Caroténoïdes vs phytostérols

L'absorption des caroténoïdes et des phytostérols est régulée par les mêmes processus de digestion, mettant en jeu les mêmes transporteurs de cholestérol (Kopec et Failla 2018). Ils entrent donc en compétition lors de leur absorption. D'ailleurs, les caroténoïdes sont associés aux particules de cholestérol LDL. De ce fait, lorsque les stérols diminuent le taux de cholestérol, ils diminuent également le taux de caroténoïdes (Richelle *et al.* 2004 ; Clifton 2004). En effet, les formes estérifiées et libres des phytostérols sont capables de réduire la bioaccessibilité du cholestérol d'environ 50 % mais aussi la biodisponibilité du β -carotène chez l'Homme d'environ 20 %, après ingestion d'aliment supplémenté en phytostérols (2,2 g) (Richelle *et al.* 2004). Ainsi, les phytostérols peuvent non seulement remplacer le cholestérol au sein des micelles, mais également d'autres composés tels que les caroténoïdes, à l'intérieur et à la surface des micelles.

Certains auteurs ont préconisé de supplémenter les produits contenant des phytostérols en caroténoïdes, afin d'atteindre au minimum 2 mg/portion de 125 g (Noakes *et al.* 2002). En 2003, une méta-analyse (18 études) concluait que les phytostérols induisaient une réduction significative ($p < 0.05$) du β -carotène sérique d'environ 12,1 % (Katan *et al.* 2003). De récentes méta-analyses confirment que les caroténoïdes plasmatiques diminuent après ingestion de phytostérols (Fardet *et al.* 2017; Baumgartner *et al.* 2017). En se basant sur 49 études d'intervention humaine et de biodisponibilité, Fardet *et al.* (2017) ont rapporté que 20 essais ont montré des réductions significatives de β -carotène avec un effet médian de 24 %. Les auteurs concluent que cette baisse peut être compensée par une consommation accrue de fruits et légumes et soulignent le lien avec la prévention des risques cardiovasculaires. La même année, une étude randomisée contrôlée de 41 essais, incluant 3306 sujets, indique qu'un apport de 2,5 g de phytostérols diminue les concentrations plasmatiques de caroténoïdes, les carotènes étant plus impactés que les xanthophylles (Baumgartner *et al.* 2017).

Les phytostérols estérifiés et libres sont tous les deux connus pour entrer en compétition avec les caroténoïdes durant la digestion gastro-duodénale, même si la compétition est moindre avec les phytostérols libres (Richelle *et al.* 2004).

MATÉRIELS & MÉTHODES



Matériels et Méthodes

1. Les matières premières

1.1. Le matériel végétal

Le maïs à grains jaune (AREV, France) a été acheté dans un commerce local en quantité suffisante pour l'ensemble des expérimentations.

Les fruits utilisés pour la production de cet aliment fonctionnel sont la papaye (*Carica papaya* var. *Formosa*, Brésil) et le melon (*Cucumis melo* var. *Cantalupensis*, France). Ils ont été achetés à maturité commerciale sur le marché international de Rungis (Paris) par un intermédiaire local (Terreazur, France).

Les fruits mûres sont pelés et vidés de leurs graines, broyés une première fois par un broyeur à couteaux Juice Extractor EJE966 (Electrolux, France) afin de séparer le jus de la pulpe, puis une seconde fois en mixant ensemble les deux phases avec un broyeur Soup&CoXL (Moulinex Groupe SEB, France). La purée ainsi obtenue est homogénéisée et versée dans des contenants fermés hermétiquement sous une atmosphère d'azote pour la protéger de l'oxydation pendant sa conservation, puis congelés dans une chambre froide à -20 °C.

Dans le cas où la maturité des fruits n'est pas atteinte, les fruits sont placés en chambre climatique régulée à 85 – 95 % d'humidité relative (HR) pour les papayes et 90 - 95 % HR pour les melons. Les papayes vertes à ¼ jaunes ont été placées à 13 °C, les partiellement mûres ¼ à ½ jaunes à 10 °C, et les plus mûres conservées à 7 °C (Arpaia et Kader 2002). Les melons pour leur part sont dans tous les cas placés entre 2,2 °C et 5 °C (Mitcham, Crisosto, et Kader 2002).

Les purées sont ensuite lyophilisées dans un lyophilisateur à plateaux P6L85V (CRYONEXT, France) dans des barquettes en aluminium de volume variable où l'épaisseur de purée n'excède pas 1 à 2 cm.

1.2. Les autres ingrédients utilisés

Les phytostérols employés sont des phytostérols dispersibles S-80 WDP (90 %) 80 % de β -sitostérol, non OGM et provenant de la société Vitae Naturals (Groupe Avril, France). La micro-encapsulation industrielle de ces phytostérols a été réalisée par un procédé

d'atomisation en présence de 10 % de maltodextrine et 3 % de sucroesters (E-473) améliorant leur solubilité dans l'eau.

Le sucre blanc utilisé dans les préparations de laboratoire est du sucre en poudre (Daddy, France) et le lait en poudre demi-écrémé (Régilait, France). Les mêmes lots sont achetés dans un commerce local et en quantité suffisante pour l'ensemble des expérimentations.

1.3. Les souches bactériennes

Deux souches pures lyophilisées sont choisies pour leurs propriétés et leurs paramètres de fermentation. Elles sont employées comme starters de fermentation : *Lactobacillus plantarum* (Lp352-S1616 / CNCM I-3069) et *Lactobacillus casei* (Lc1 S42-2015 / CNCM I-4592), toutes deux provenant de la société Ennolys-Lesaffre (France). Elles sont stockées comme préconisée par le fabricant, à savoir déshydratées, sous-vide, à l'abri de la lumière à la température de +4 °C. Avant utilisation, les souches sont individuellement aliquotées, réhydratées et réactivées dans 1 mL d'eau physiologique à 0,9 % de chlorure de sodium pendant au minima 10 min avant utilisation. Ces souches ont été utilisées soit pures, soit en ratio 50 %/50 % et inoculées dans le produit brut à hauteur de 1.10^6 UFC/mL.

2. Le procédé de fabrication

Les opérations unitaires qui constituent le procédé de fabrication du produit et permettent d'aboutir à un produit fonctionnel incluent plusieurs étapes : le trempage, le broyage, le tamisage et le rinçage de la préparation à base de maïs, qui permettent de récupérer le jus qui constitue l'appareil de base du produit (majoritairement de l'eau et de l'amidon), puis la pasteurisation de la mixture et sa fermentation lactique.

2.1. La méthode de production

100 g de grains de maïs jaune sont trempés dans 200 mL d'eau préalablement chauffée jusqu'à ébullition (100 °C) dans un bécher en inox de 2 L. Après agitation, le mélange chaud est ensuite maintenu à une température de 50 °C pendant 15 h. Par la suite, les grains sont broyés à l'aide d'un broyeur à couteaux Grindomix GM200 (Retsch GM 200, Allemagne) réglé à une vitesse de 5 000 tours par min durant 1 min. Le broyat ainsi obtenu est rincé et tamisé en même temps avec 400 mL d'eau à 50 °C et à l'aide d'un tamis en métal

de 315 mesh, afin d'obtenir un jus tamisé composé essentiellement d'eau et d'amidon. Les ingrédients de la formulation sont ensuite ajoutés à ce jus : 31,3 g/100 g d'eau, 3,6 g/100 g de sucre blanc cristal, 2,4 g/100 g de lait en poudre demi-écrémé et 2,4 g/100 g de phytostérols dispersibles. Les fruits, sous forme de lyophilisats, sont incorporés à hauteur de 6 g/100 g chacun. Ils constituent la principale source de caroténoïdes dans le produit final avec un apport de β -cryptoxanthine et lycopène, apportés majoritairement par la papaye mais aussi de β -carotène apporté par le melon. Après ces ajouts, le produit est ensuite pasteurisé et fermenté (Figure 10).

Pour chaque expérimentation, les masses exactes de produit fini ont été mesurées et enregistrées, ainsi que la plupart des masses de co-produits du procédé (résidus de maïs etc.), afin de pouvoir réaliser les bilans matières globaux du diagramme de fabrication et de calculer les rendements.

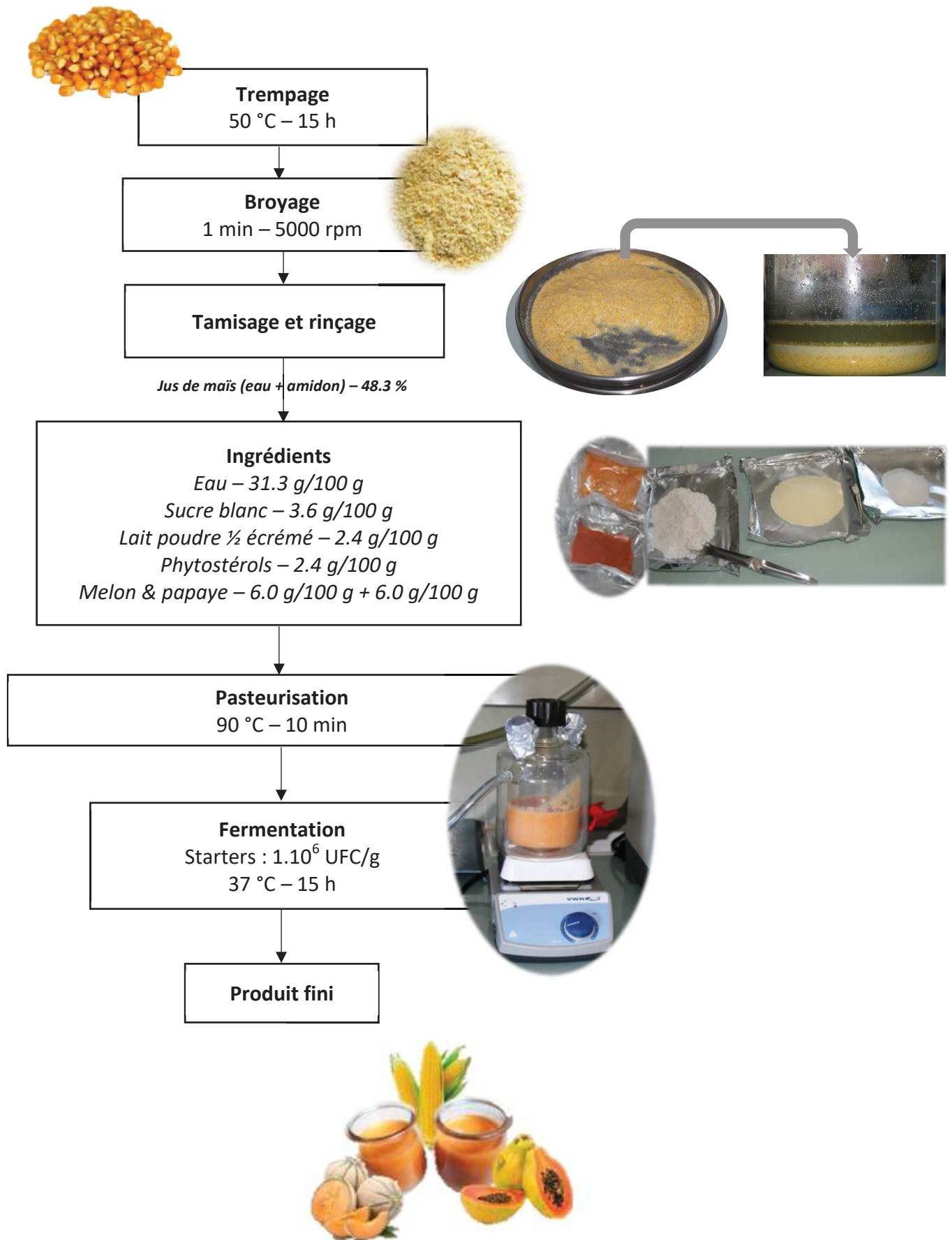


Figure 10 : Procédé de fabrication du produit fonctionnel

2.2. L'optimisation de la formulation

Dans le but d'optimiser le produit d'un point de vue nutritionnel mais également d'améliorer ses qualités sensorielles, lors de certaines expérimentations, le lait en poudre est remplacé par des hydrolysats de protéines laitières : des caséinates de sodium (CAS) d'une pureté de 91,7 % (Lactalis, France) et des protéines sériques (WPI) d'une pureté de 88,9 % (Lactalis, France). Lors de ces essais, la quantité de produit (CAS ou WPI) à ajouter est calculée afin d'obtenir la même composition finale en protéines que dans le produit de base, lorsque le lait en poudre est utilisé. Cependant, pour des raisons sensorielles, liées à l'impact sur la texture et sur la sensation en bouche, cette quantité à ajouter a été ajustée et réduite à 20 %.

2.3. Les opérations unitaires : la pasteurisation et la fermentation

Les opérations de pasteurisation et de fermentation sont menées tour à tour dans un fermenteur double-enveloppe en verre de 600 mL (Legallais, France). Dans ce système, la température de l'enveloppe extérieure est fixée et contrôlée par un bain thermostatique (Bioblock Polystat Fisher Scientific SAS, France). La température interne et le pH du produit sont déterminés et enregistrés sur un pas de temps d'une minute par des sondes connectées à une centrale d'acquisition Almemo® 2690-8A (Ahlborn, Allemagne). Une homogénéisation constante est maintenue tout le long de la pasteurisation et de la fermentation par une agitation magnétique. Tout d'abord, le produit est homogénéisé et pasteurisé à une température de 90 °C pendant 10 min (pour une valeur pasteurisatrice équivalente à 1000 min) puis refroidi à 37 °C avant l'inoculation des starters. Les souches de lactobacilles sont ensuite inoculées seules ou en ratio 50 %/50 % à 1.10^6 UFC/g et la fermentation lactique réalisée à une température de 37 °C pendant 15 h.

2.3.1. La détermination des paramètres de croissance bactérienne

Les paramètres de croissance tels que le temps spécifique de croissance, le temps de génération et la période de latence dans le produit de chacune des deux souches sont estimés par ensemencement en surface de 100 µL d'une dilution du produit sur une gélose de Man Rogosa et Sharpe (MRS), qui est un milieu spécifique pour la culture des lactobacilles (Biokar Diagnostics, France). Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à une température de 37 °C pendant 48 h. Cette évaluation est réalisée à chaque heure de fermentation. Le temps

spécifique de croissance μ_{max} et le temps de génération $G = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}}$ sont calculés pour chacune des souches ensemencées seules ainsi que pour le ratio 50 %/50 % des deux souches lactiques. Les paramètres de croissance ont été déterminés et modélisés selon l'équation de Rosso :

$$\log N_{(t)} = \begin{cases} \log N_0 & \text{si } t < \lambda \\ \log N_{max} - \log \left(\left[1 + \left(\frac{N_{max}}{N_0} - 1 \right) \exp(-\mu_{max}(t - \lambda)) \right] \right) & \text{si } t \geq \lambda \end{cases} \quad (1)$$

où μ_{max} est le temps spécifique de croissance (h^{-1}), λ le temps de latence (h), N_0 la population initiale (UFC/g), N_{max} la population maximale (UFC/g) and log le logarithme décimal.

2.3.2. La détermination du ratio de souches en fin de fermentation

L'opération de fermentation du produit final (ratio de souches) est démarrée après pasteurisation par un ajout de starters à hauteur de 50 % *L. plantarum* et 50 % *L. casei*. Il apparaît donc nécessaire de déterminer le ratio final des souches après 15 h de fermentation et les potentielles compétitions entre elles. Pour ce faire, les souches sont différenciées par la consommation de 50 sucres différents sur des galeries API 50 CHL (Biomérieux, France). Un milieu identique en composition à celui commercialisé par Biomérieux dans sa galerie API 50 CHL est réalisé en ajoutant 16 g/L d'agar-agar afin d'obtenir un milieu solide (Agar 50 CHL). Trois milieux de culture solides sont ainsi constitués : un Contrôle 50 CHL sans sucre, et deux autres milieux contenant des sources carbonées à une concentration de 20 g/L ; pour le premier, du glucose (Glc) et pour le second, de l'arabinose (Ara). Après la fermentation du produit, 1 g de produit est prélevé et dilué de 10^{-1} à 10^{-8} . 100 μ L des trois dernières dilutions sont ensuite ensemencés en triplicatas sur les milieux Contrôle, Glc et Ara puis incubés à une température de 37 °C pendant 48 h.

2.3.3. L'efficacité de la pasteurisation sur l'écologie microbienne du produit

Afin de contrôler l'efficacité de la pasteurisation pré-fermentation, 1 g du produit pasteurisé est prélevé et dilué de 10^{-1} à 10^{-4} . 100 μ L de chaque dilution sont ensemencés sur un milieu Plate Count Agar (PCA), qui est un milieu de culture non sélectif (Biokar, France) en triplicatas et incubés à une température de 30 °C pendant 72 h.

3. Les analyses physico-chimiques et nutritionnelles

3.1. Les solvants et réactifs

Les solvants et les réactifs ont été obtenus par Sigma-Aldrich (France). Les standards de grade HPLC, β -sitostérol et cholestérol, ont été obtenus par Sigma-Aldrich (France) et les standards de pureté HPLC, β -carotène, β -cryptoxanthine et lycopène, par Extra synthèse (France).

Les réactifs utilisés pour la réalisation des modèles de digestions *in vitro* (bile, pancréatine, cholestérol estérase) ont été obtenus par Sigma-Aldrich (France).

3.2. L'analyse des macronutriments

Les protéines, lipides, glucides et fibres ont été analysés dans le produit.

Les matières sèches sont mesurées dans une étuve à vide Bioblock Scientific 45001 (Fisher scientific, États-Unis) sur un 1 g de produit à une température de 70 °C pendant 24 h, selon la méthode AOAC 1991.

Les protéines sont dosées par la quantification de l'azote total, suivant la méthode de Kjeldahl (AOAC 2001), en considérant un facteur correctif de 6,25 et en utilisant un appareillage Foss Techator Digester et Foss KjeltectTM 8400 automatique (Foss, Suède). Afin de quantifier l'azote dans sa totalité, une minéralisation de l'azote organique est nécessaire afin de le libérer. Ce dosage s'est effectué sur 1 g du produit final préalablement lyophilisé. La minéralisation est réalisée par une hydrolyse acide avec un excès d'acide sulfurique concentré à chaud à 420 °C pendant 20 min, en présence de K_2SO_4 et $CuSO_4$ servant de catalyseurs. L'azote total est obtenu sous la forme NH_4^+ (ions ammonium) puis est transformé en NH_3 (ammoniac) qui est dosé à l'aide d'une solution étalonnée d'acide fort.

La composition en lipides est obtenue en suivant la procédure d'extraction développée par Folch (Schäfer 1998), sur 10 g de produit, pesés dans un tube à centrifuger de 40 mL. Ensuite, 15 mL d'une solution de chloroforme:méthanol (2:1) sont ajoutés avant homogénéisation pendant 2 h à température ambiante. Après déphasage par centrifugation avec une Aventi JE (Beckman coulter, États-Unis) réglée sur une force de 6000 g pendant 10 min, la phase organique est récupérée dans un ballon taré. L'extraction est répétée deux fois en réunissant les phases organiques, qui sont ensuite évaporées à sec à l'aide d'un

Rotavapor RV3 (IKA, Allemagne). Le ballon est ensuite pesé et la tare lui est retirée pour obtenir le poids de la matière grasse ainsi extraite.

Les sucres solubles ont été extraits à partir d'1 g d'échantillon, auquel 15 mL d'éthanol 80 % sont ajoutés. Le mélange est ensuite chauffé pendant 30 min à une température de 70 °C et centrifugé à une force de 10 000 g pendant 10 min. Le surnageant est récupéré et l'extraction répétée deux fois sur le résidu. Les surnageants sont ensuite mélangés et filtrés au travers d'un filtre en acétate de cellulose d'une porosité de 0,45 µm et analysés par UPLC. L'analyse et la séparation des sucres solubles sont effectuées sur un équipement de chromatographie UPLC connecté à un réfractomètre 1290 System Infinity II (Agilent, États-Unis). Une colonne SHODEX SH1011 300x8 mm (Japon) est utilisée couplée à un programme d'élution isocratique d'eau acidifiée à l'acide sulfurique (0,01 %) à un débit de 0,7 mL/min. La température de la colonne est fixée à 30 °C, le volume d'injection est de 10 µL et la détection spectrophotométrique est réalisée à 210 nm et 245 nm. Les courbes de calibrations de glucose, fructose, lactose et saccharose sont réalisées par étalonnage externe entre 0 et 1 g/L.

L'amidon est quantifié selon la méthode développée par Clegg (1956) par la réaction à l'Anthrone. Cette méthode est appliquée aux résidus d'extraction des sucres solubles, repris et dilués dans 5 mL d'eau distillée. 6,5 mL de solution d'acide perchlorique à 52 % sont ensuite ajoutés et le mélange est homogénéisé pendant 5 min avant l'ajout de 20 mL d'eau distillée. Après centrifugation 5 min à une force de 10 000 g, le surnageant est récupéré dans une fiole de 100 mL. L'extraction est effectuée une seconde fois, puis la fiole est complétée à 100 mL avec de l'eau distillée. Cette solution est ensuite filtrée au travers d'une membrane en acétate de cellulose d'une porosité de 0,45 µm, puis chauffée dans un bain-marie à une température de 90 °C pendant 12 min. Après refroidissement dans un bain d'eau glacée, le mélange réactionnel est formé par 10 mL de solution d'Anthrone, 1 mL d'extrait et 1 mL d'eau distillée. Les mesures sont effectuées au spectrophotomètre fixé à 630 nm avec les dilutions appropriées de solution d'Anthrone et d'échantillon (Clegg, 1956). La courbe de calibration est obtenue par un étalonnage externe avec des concentrations en glucose de 0 à 1 g/L.

Les fibres insolubles sont quantifiées par gravimétrie selon la méthode de Van Soest, Robertson, et Lewis (1991). Le principe utilisé séquence les fibres en trois fractions : les NDF (Neutral Detergent Fibre qui correspondent à l'hémicellulose, la cellulose et la lignine), les ADF (Acid Detergent Fibre, pour la cellulose et la lignine) et les ADL (Acid Detergent Lignin, pour la lignine). Pour cela, les échantillons sont successivement soumis à l'action de détergents neutres puis acides et finalement à l'action de l'acide sulfurique concentré, dans des conditions standards censées solubiliser les produits assimilables aux diverses composantes pariétales.

3.3. L'extraction et quantification des phytomicronutriments liposolubles

Les composés bioactifs tels que les caroténoïdes (β -cryptoxanthine, le β -carotène et le lycopène), les phytostérols (β -sitostérol) et les tocophérols (α -tocophérol et γ -tocophérol), sont analysés par UPLC-DAD-FLD. Cette méthode "3 en 1" a été mise au point à l'occasion de ces travaux. L'extraction de ces composés liposolubles (Figure 11) est adaptée de la méthode mise au point par Rossetti L. *et al.* (2010). 1 g de produit est pesé dans un tube à essai en verre et mélangé à 2 mL d'une solution éthanolique de pyrogallol 1 %. L'ensemble est homogénéisé 30 sec par un homogénéisateur Ultraturax T10 basics (IKA, Allemagne). Le tube est ensuite chauffé 3 min dans un bain-marie à la température de 70 °C. Une saponification est ensuite réalisée, afin d'éliminer les triacylglycérols et ne laisser que la fraction recherchée, insaponifiable, dans un bain-marie à la température de 70 °C pendant 30 min après ajout de 1,5 mL de KOH 12N. Suite au refroidissement des tubes dans un bain d'eau glacée, 2 mL d'eau distillée sont ajoutés pour permettre et améliorer un déphasage rapide, avant deux extractions consécutives avec 5 mL de N-hexane. Les phases organiques sont récupérées et mélangées puis évaporées sous flux azote par un évaporateur concentrateur à aiguilles Stuart SBHCONC/1 (Staffordshire, Angleterre). Le résidu sec est dissous dans 1 mL d'une solution de MTBE/MeOH (4:1, v:v) avant analyse par UPLC.

L'équipement utilisé est une UPLC – 1290 System Infinity II (Agilent, États-Unis), composée d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD) et d'un détecteur à fluorescence (FLD). La colonne utilisée est une C30 YMC 150 x 4,6 mm ; 3 μ m (YMC Europe GMBH, Allemagne). Les phases mobiles sont du méthanol comme éluant A, l'eau comme éluant B et le MTBE comme éluant C, fixées à un débit de 1,5 mL/min. Le gradient utilisé pour séparer les caroténoïdes, phytostérols et tocophérols est le suivant : 0-1,5 min [60 % A, 40 % B]; 1,5-

3 min [80 % A, 20 % B]; 3-12,5 min [80 % A, 5 % B, 15 % C]; 12,5-15 min [15 % A, 85 % C]; 15-17 min [100 % A] puis retour aux conditions initiales pendant 1 min pour ré-équilibrer le système avant la prochaine injection. La température de la colonne est de 25 °C et le volume d'injection est de 10 µL. La détection est fixée à 210 nm (DAD) pour les phytostérols et le cholestérol, 450 et 470 nm (DAD) pour les caroténoïdes. La détection à fluorescence (FLD) pour les tocophérols est fixée à 296 nm (excitation) et 330 nm (émission). La quantification des composés liposolubles a été faite en utilisant des courbes de calibration de standards de β -carotène, β -cryptoxanthine, lycopène, β -sitostérol, cholestérol et α - γ -tocophérols par étalonnage externe dans des gammes de concentration entre 0 et 100 mg/L pour les caroténoïdes et tocophérols, et entre 0 et 1 g/L pour les stérols.

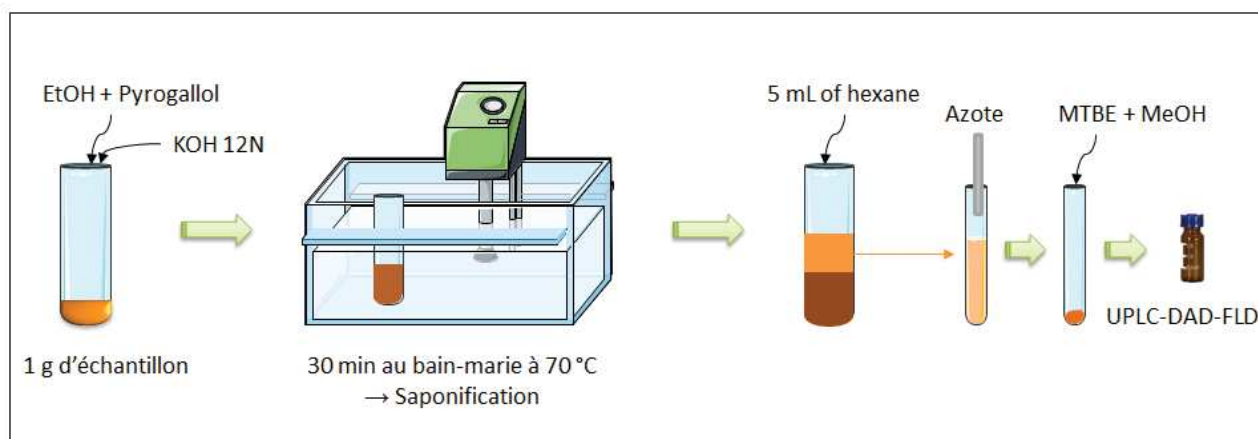


Figure 11 : Protocole schématique de l'extraction des composés liposolubles de la matrice alimentaire

3.4. Modèle de digestion *in vitro*

3.4.1. Expérimentation

Le modèle de digestion *in vitro* employé et présenté Figure 12 a été précédemment développé par Reboul *et al.* (2006) et adapté par Dhuique-Mayer *et al.* (2007). 15 g de produit sont mélangés à 32 mL d'une solution saline de NaCl à 0,9 % contenant 1 % de pyrogallol, puis homogénéisés et chauffés pendant 10 min dans un bain-marie à la température de 37 °C. La phase gastrique est simulée en ajustant le pH à 4 par une solution de NaOH 1 N ou de HCl 1 N, selon le pH initial du produit à analyser. Puis 2 mL de pepsine (40 mg/mL dans du HCl 0,1 N) sont ajoutés. Le mélange est incubé dans un bain-marie agitant à la température de 37 °C pendant 30 min. Ensuite, afin de simuler la phase

duodénale, le pH est ajusté à 6 par une solution de carbonate de sodium à la concentration de 0,45 N et 9 mL d'une solution de pancréatine/extrait de bile (2 mg/mL pancréatine et 12 mg/mL d'extrait de bile dans une solution de 100 mM de citrate trisodium) ont été ajoutés. Dans le même temps, 4 mL d'une solution d'extrait de bile (100 mg/mL dans une solution tampon TRIS à pH 6) sont ajoutés, puis 1 mL de cholestérol estérase à l'activité spécifique de 350 U dans 6 mL d'eau distillée est également ajouté afin d'hydrolyser les esters de xanthophylles. Pour terminer le processus de digestion, les échantillons sont de nouveau incubés sous agitation, à 37 °C pendant 30 min. La fraction micellaire est obtenue par centrifugation des digestats à 48 000 g pendant 4 h, à 10°C. Le surnageant est prélevé, filtré sur membranes en acétate de cellulose stériles de porosité 0,45 µm puis 0,2 µm et stocké à -20 °C jusqu'à analyse.

Afin d'évaluer les interactions entre ces composés liposolubles, du cholestérol et du β -sitostérol libre ont été ajoutés dans les produits avant digestion. Pour cela, 0,5 g de β -sitostérol de qualité standard HPLC sont mélangés à 2 mL de THF et 250 µL de cette solution sont ajoutés au produit avant digestion, de même que 120 µL d'une solution de THF contenant 0,1 g de cholestérol de qualité standard HPLC.

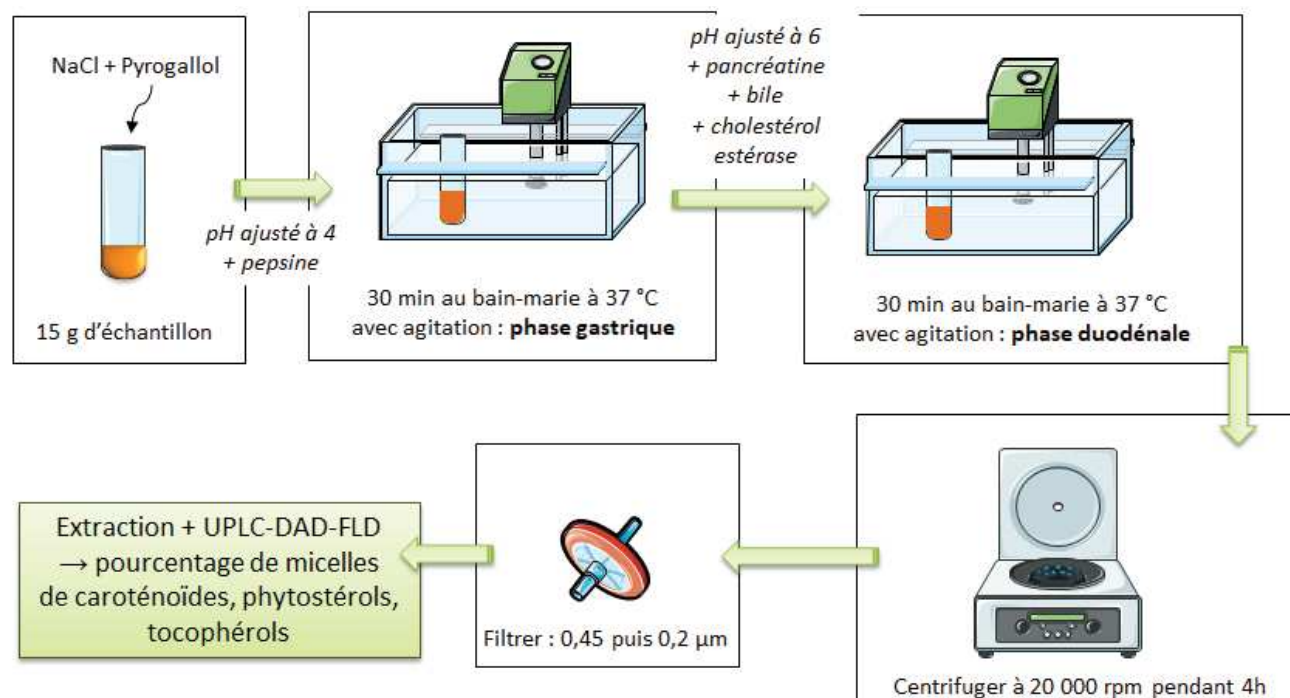


Figure 12 : Protocole schématisé du modèle de digestion *in vitro*

3.4.2. Extraction des caroténoïdes après digestion *in vitro*

10 mL de filtrat (issu de la digestion *in vitro*), auxquels sont ajoutés 5 mL d'éthanol contenant 100 µL d'une solution éthanolique de β-apo-8'-caroténal (à 24,4 mg/L) en tant qu'étalon interne, sont extraits avec 10 mL d'hexane dans une ampoule à décanter. La phase organique est récupérée, tandis que la phase aqueuse est ré-extraite une fois avec 10 mL d'hexane et 5 mL d'éthanol, puis une troisième fois avec seulement 10 mL d'hexane. Les phases hexaniques rassemblées sont ensuite séchées avec du sulfate de sodium anhydre et filtrées sur verre fritté de porosité n°2. La phase organique est évaporée à sec à l'aide d'un Rotavapor RV3 (IKA, Allemagne). L'extrait sec est repris dans 500 µL d'une solution MTBE/méthanol (4:1, v:v) avant l'analyse par HPLC (suivant les mêmes conditions chromatographiques décrites au paragraphe 3.3.)

3.4.3. Mesures granulométriques sur les micelles

La taille des micelles est mesurée à la température de 25 °C et un angle de 93 ° en utilisant la spectroscopie par corrélation de photons avec un Zeta Sizer (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, UK). Selon le principe de diffusion dynamique de la lumière, les particules et les molécules, assimilées à des sphères, effectuent des mouvements incessants et aléatoires (mouvement brownien). Elles diffusent alors à une vitesse proportionnelle à leur taille, les petites particules diffusant plus vite que les grosses. L'intensité de la diffusion à un angle spécifique varie avec le temps. Après passage par un autocorrélateur numérique intégré, la courbe générée est analysée afin d'obtenir la taille et la distribution granulométrique des particules ou molécules, et dans cette étude, des micelles.

3.5. Modèle de culture cellulaire Caco-2

3.5.1. Culture des Caco-2 et expérimentation

Les cellules clones TC7 ont été données gracieusement par le Dr. M. Rousset (U178 INSERM, France). Cette lignée cellulaire exprime l'enzyme responsable du clivage des caroténoïdes (During, Albaugh, et Smith 1998).

La culture des cellules est réalisée selon Gence *et al.* (2018) avec des modifications mineures. Les cellules sont maintenues dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) à 4,5 g/L de glucose, supplémenté avec 20 % de sérum de veau fœtal (Biomedica, France) décomplémenté (56 °C pendant 30 min), 1 % d'acides aminés non-essentiels, 1 % de

streptomycine et de 2 % de L-glutamine (Bibco BRL, France), le tout stérilisé par filtration à 0,2 μm . Pour chaque expérience, les cellules sontensemencées à une densité de 5.10^5 cellules par flasque de 25 cm^2 (Becton Dickinson, Le Pont de Chaix, France) et cultivées pendant 18 jours avec renouvellement du milieu de culture tous les deux jours, afin d'obtenir des monocouches de cellules confluentes et différenciées, c'est-à-dire formant un tapis cellulaire. Avant incubation, les cellules sont lavées par 2 mL de tampon phosphate (PBS). 7 mL des micelles issues de la digestion *in vitro* et diluées 4 fois dans du DMEM sont incubés pendant 2 h à la température de 37 °C. Après incubation, les milieux apicaux et les cellules sont collectés. Les monocouches cellulaires sont grattées et recueillies dans 2 mL de PBS. Afin de doser le cholestérol cellulaire et de pouvoir le prendre en compte par différence avec les cellules recevant du cholestérol exogène, un blanc contrôle est réalisé en incubant 7 mL de DMEM à la place des micelles. Tous les échantillons sont ensuite stockés à -80 °C sous azote avant extraction des composés liposolubles.

3.5.2. Extraction des composés liposolubles après absorption par Caco-2

Après décongélation, 1 mL d'échantillon (suspension cellulaire ou milieu apical) est extrait avec 2,5 mL d'hexane et 500 μL d'éthanol contenant de la canthaxanthine à 2 mg/mL en tant qu'étalon interne. Le mélange est homogénéisé au vortex pendant 30 sec puis centrifugé à 2000 tours par minute pendant 5 min, à température ambiante. La phase hexanique est récupérée et la phase aqueuse est ré-extraite avec 1 mL d'éthanol et 2 mL d'hexane avant centrifugation. Les phases hexaniques rassemblées sont évaporées sous azote. L'extrait sec est ensuite repris dans 100 μL d'une solution CH_2Cl_2 /méthanol (50:50, v:v) avant analyse par HPLC selon Gence *et al.* (2018)

Un système Agilent 1100 équipé d'un détecteur à barrette de diodes (DAD) a été utilisé, équipé d'une colonne C30 YMC 250 x 4,6 mm ; 5 μm (YMC Europe GMBH, Allemagne) avec un débit de 1 mL/min, une température d'analyse de 25°C et un volume d'injection de 20 μL . Les phases mobiles sont l'eau (éluant A), le méthanol (éluant B) et le MTBE (éluant C). Le gradient utilisé pour séparer les caroténoïdes, phytostérols et cholestérol est le suivant : 0-1 min [2 % A, 96 % B, 2 % C]; 1-27 [2 % A, 18 % B, 80 % C], 27-35 min [4 % A, 11 % B, 85 % C] puis retour aux conditions initiales pendant 1 min pour ré-équilibrer le système. Les caroténoïdes ont été détectés à 450 et 470 nm et le β -sitostérol et le cholestérol à 210 nm.

L'identification des composés et la quantification ont été réalisées par des étalonnages externes entre 0 et 50 mg/L pour les caroténoïdes, et 0 et 1 g/L pour les stérols.

4. Analyse sensorielle

Une analyse sensorielle est menée sur 3 produits préparés au cours des expérimentations et congelés à -20 °C : le produit initial dit "de base" BP contenant le lait en poudre (A), le CASP contenant les caséinates (B), le WPIP contenant les protéines sériques (C). Avant dégustation, ils ont été décongelés à température ambiante, homogénéisés et aliquotés par 10 g dans des contenants. Le test descriptif est conduit en duplicata par un jury d'experts composé de 12 jurés CIRAD entraînés préalablement sur le produit. Le vocabulaire spécifique pour l'analyse est généré par le jury en amont des deux séances d'entraînement. 25 descripteurs ont été choisis sur des critères visuels (homogénéité, brillance, intensité de la couleur orange, compacité et granulosité), de texture en bouche (onctuosité, granulosité), d'odeurs (vert, fruits frais, fermenté, céréales), de saveurs (sucré, acide, amer), d'impressions gustatives (âpreté, astringence) et d'arômes (fruits frais et fruits cuits, melon, fruits exotiques, fermenté, grillé, vert, épicé, céréales). Les notes de classement sont fixées de 0 (le moins) à 10 (le plus). 18 de ces descripteurs ont été sélectionnés pendant les séances d'entraînement, dont 2 pour le visuel, 3 pour l'odeur, 2 saveurs, 2 impressions, 2 pour la texture en bouche et 7 pour les arômes. Une note de qualité globale sur 10 est demandée en fin de test (Annexes 2 et 3). Le test s'est déroulé en box fermés dans une salle d'analyse sensorielle, à température contrôlée de 20 °C et sous lumière blanche.

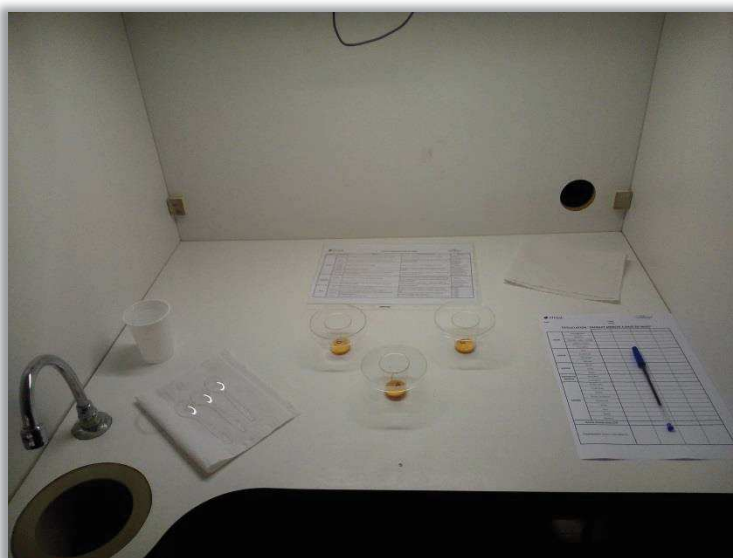


Figure 13 : Jury CIRAD en cours d'analyse sensorielle de l'aliment et box individuel de dégustation

5. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT version 19.6 (Addinsoft, France). Toutes les données sont reportées en "moyenne \pm écart-type", et issues de trois réplicas de chaque analyse. Les données ont été statistiquement analysées en utilisant une analyse de variance (ANOVA) dans le but d'évaluer les différences significatives ($p < 0,05$). Le test de comparaisons multiples de la méthode de Tukey a été utilisé afin de déterminer les différences significatives ($p < 0,05$) entre les résultats.

RÉSULTATS



Résultats

1. Conception d'un aliment fonctionnel probiotique à base de maïs fermenté et enrichi en caroténoïdes et phytostérols

1.1. Objectif

L'objectif de ces travaux a été de développer un aliment fonctionnel à base de maïs fermenté, inspiré par un aliment traditionnel africain à base de céréales fermentées. Cela permet de proposer un produit de bonne qualité nutritionnelle tout en étant une alternative aux produits laitiers déjà commercialisés. En effet, outre les margarines, les produits actuels qui possèdent une fonctionnalité hypocholestérolémiante ou probiotique sont des produits laitiers, comme des yaourts ou des boissons fermentées.

L'ajout de caroténoïdes est une démarche originale. Leur apport sous forme de fruits engendre, outre un aspect sensoriel intéressant (couleur orange vif), des bénéfices santé liés à leur rôle provitaminique A. Mais les caroténoïdes sont en compétition avec les phytostérols pour leur absorption par l'organisme : il est donc recommandé de compléter en caroténoïdes les formulations d'aliments contenant des phytostérols végétaux afin de s'affranchir de cette concurrence. De plus, si l'aliment fermenté développé est considéré probiotique, c'est une autre valeur santé qui lui est ajoutée.

Par conséquent, l'objectif général de ces travaux de thèse a été de concevoir et d'optimiser un aliment fonctionnel probiotique à base de maïs fermenté, par incorporation de caroténoïdes provenant de fruits et de phytostérols commerciaux. Cependant, différents challenges technologiques restaient à appréhender, comme l'incorporation et la stabilité de ces composés liposolubles qui impliquaient une standardisation technologique et microbiologique du procédé de fabrication.

La première étape de ces travaux a donc été d'étudier la formulation, le choix des starters de fermentation et la mise au point du procédé de fabrication. Auparavant, il a été nécessaire de fixer certains paramètres, comme le choix et la forme des matières premières (fruits, phytostérols) ainsi que l'ordre des opérations unitaires du procédé. Ensuite, l'étude de l'impact des conditions fermentaires et de la pasteurisation sur la stabilité des composés bioactifs liposolubles a fait l'objet d'une première publication.

1.2. Travaux préliminaires : choix des paramètres

La papaye et le melon ont été choisis pour apporter un profil caroténoïdique diversifié, comprenant de la β -cryptoxanthine, du β -carotène et du lycopène. Le ratio des fruits a été formulé afin d'obtenir des apports majoritaires en β -carotène (100 % provitaminique A). Les fruits ont été ajoutés dans le produit sous forme lyophilisée, qui permet de concentrer, entre autres, les caroténoïdes. Il s'est avéré que ces lyophilisats conféraient une texture plus onctueuse à l'aliment et amélioraient son homogénéité. Les lyophilisats de papaye et de melon ont donc été retenus pour la suite des fabrications.

La forme dispersible des phytostérols a été préférée, afin de favoriser leur homogénéisation dans cet aliment fonctionnel à faible teneur en matière grasse. Des travaux antérieurs avaient en effet montré que l'utilisation de phytostérols estérifiés provoquait un déphasage dans le produit et une oxydation lipidique. Les phytostérols dispersibles (phytoD) eux, ont formé un produit plus homogène, non déphasé, moins oxydé et plus stable dans le temps.

Ensuite, la détermination de l'ordre des opérations unitaires a été indispensable. Le nouvel aliment se voulant probiotique, il était nécessaire de placer la pasteurisation avant la fermentation afin de conserver les microorganismes vivants en fin de procédé.

Un test sensoriel en interne a également été effectué afin de déterminer si les lyophilisats de fruits devaient être ajoutés avant ou après pasteurisation. Le choix s'est porté vers un ajout avant la pasteurisation : premièrement dans un but microbiologique et de sécurité sanitaire afin d'éviter les contaminations ; deuxièmement d'un point de vue sensoriel, puisque les lyophilisats ayant été ajoutés avant pasteurisation induisaient une couleur orange plus appuyée, un goût plus doux et des arômes de vert moins forts en bouche que le produit préparé avec les lyophilisats après pasteurisation.

1.3. Incorporation et stabilité des caroténoïdes dans un aliment fonctionnel à base de maïs fermenté contenant des phytostérols (PUBLICATION 1)

Les étapes de cuisson et de fermentation ont été mises au point en fermenteur, et différents starters ont été utilisés dans le but de choisir le plus adapté pour obtenir un produit probiotique. Lors des différentes fermentations effectuées dans cette matrice particulière, les cinétiques de croissance de *L. plantarum* et *L. casei* ainsi que du ratio 50%/50 % de ces deux souches ont été étudiées. Le but a été de sélectionner le starter

approprié en fonction des différents paramètres de fermentation, et de ses effets sur la stabilité des composés liposolubles incorporés dans l'aliment (caroténoïdes et phytostérols).

L'incorporation des composés liposolubles a permis d'atteindre une teneur de 16 mg de caroténoïdes/kg et de 20 g/kg phytoD. En calculant en termes d'équivalent vitaminique A, 125 g de cet aliment apporterait 12 % des Apports Journaliers Recommandés. Les 2 mg de caroténoïdes par portion de 125 g sont suffisants pour contrecarrer l'effet des phytostérols dans la compétition pour leur absorption. De plus, les phytoD ajoutés représentent 2,5 g par portion, ce qui permet l'induction d'un effet hypocholestérolémiant potentiel (ANSES 2014).

- **Un choix stratégique : la co-fermentation**

Deux souches bactériennes ont été sélectionnées pour initier la fermentation de ce produit, pour leur ubiquité, leur occurrence en agroalimentaire et leur potentiel probiotique : *L. plantarum* et *L. casei*. Le ratio 50 %/50 % inoculé à hauteur de 10^6 UFC/g d'aliment a engendré une production de biomasse de plus de 3 log dans le produit durant 15 h de fermentation. Le modèle de Rosso a permis l'estimation des paramètres de croissance de ce ratio de souches fermentaires, qui a présenté la plus faible période de latence avec seulement 3 h, contre 4 et 5 h pour *L. plantarum* et *L. casei* respectivement. Il a également montré la plus grande chute de pH entre le produit non fermenté et le produit fini, ce qui est bénéfique pour une conservation plus longue et stable. La co-fermentation d'un mélange de deux souches homo- et hétérofermentaires permet la production de nombreux métabolites nécessaires aux qualités organoleptiques et fonctionnelles de l'aliment (antioxydant, peptides bioactifs etc.) (Leroy et De Vuyst 2004; Kedia *et al.* 2007; Menezes *et al.* 2018).

- **Impact du procédé de fabrication sur la stabilité des composés liposolubles**

La stabilité de la β -cryptoxanthine, du β -carotène, du lycopène, des α - et γ -tocophérols et du β -sitostérol a été étudiée dans un premier temps après la pasteurisation (90 °C pendant 10 min). Le traitement thermique n'a affecté que les caroténoïdes, les phytostérols et tocophérols étant restés stables. Des pertes relatives de caroténoïdes sont observées, de 20 à 27 %, le β -carotène étant le plus thermosensible, suivi de la β -cryptoxanthine et du lycopène. Dans un second temps, la fermentation n'a impacté aucun

des composés liposolubles (aucun effet significatif, $p < 0,05$). En fin de procédé, les composés présentent donc un taux de rétention de 73 à 100 %, ce qui reste élevé pour un aliment fonctionnel, et conforme à la littérature.

Le développement de ce nouveau produit fermenté fonctionnel a démontré qu'il est possible d'incorporer des composés bioactifs liposolubles à des teneurs nutritionnellement intéressantes dans un produit probiotique à base de céréales fermentées. De plus, l'équilibre nutritionnel entre les phytostérols et les caroténoïdes a été respecté, apportant non seulement une quantité élevée en caroténoïdes provitaminiques A, mais induisant aussi des effets bénéfiques potentiels sur la santé, comme un effet hypocholestérolémiant. Toutefois, si l'incorporation et la stabilité des caroténoïdes au cours du processus de fabrication de cet aliment ont été étudiées dans cette étude, l'étape suivante a consisté à optimiser les qualités nutritionnelle et sensorielle de ce produit initial.



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Incorporation and stability of carotenoids in a functional fermented maize yogurt-like product containing phytosterols

Magali Gies^{a,b}, Adriana Maria Descalzo^c, Adrien Servent^{a,b}, Claudie Dhuique-Mayer^{a,b,*}

^a Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UMR Qualisud, 34398, Montpellier Cedex 5, France

^b Qualisud, Univ. Montpellier, CIRAD, Montpellier SupAgro, Université d'Avignon, Université de La Réunion, Montpellier, France

^c Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA-LABINTEX, Center of Agroindustry, de la tradición & Aristizabal Str. s/n 1686 Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Fermented-maize
Probiotic cereal product
Fat-soluble phytochemicals
β-carotene
β-sitosterol

ABSTRACT

A functional yogurt-like product based on fermented maize enriched in carotenoids and phytosterols was developed to be an alternative to existing functional dairy products. Incorporation and stability of fat-soluble compounds were challenging in this complex matrix. Moreover, it is known that phytosterols decrease carotenoids absorption, but this decline can be offset by increasing carotenoids in foodstuffs. Thus, the aims of this work were to optimize the manufacturing process of a fermented yogurt-like product containing phytosterols by incorporating carotenoids taking into account two Lactobacilli strains as starters. The stability of β-cryptoxanthin, β-carotene and lycopene was studied during the whole process in order to confer a nutritional balance between them and phytosterols. After 15 h of fermentation, a starter ratio 50:50 (*L. plantarum*-*L. casei*) gave the best final biomass with 10⁹ CFU/g necessary to obtain a probiotic potential. Relative carotenoid losses (20–27%) occurred during the pasteurization step while no negative impact on carotenoids was due to fermentation. Fat-soluble compounds remained relatively stable during the whole process with 75% of retention. These results suggest that incorporation and stability of carotenoids in a fermented-maize yogurt-like product containing phytosterols are necessary steps to induce a cholesterol-lowering effect without detrimental effects on carotenoids.

1. Introduction

The increasing demand of consumers for healthy food has reinforced the necessity to design new functional foods. A functional food containing bioactive compounds can enhance health or reduce the risk of diseases (Prado, Parada, Pandey, & Soccol, 2008; I.; Salmerón, 2017; Serafini, Stanzione, & Foddai, 2012). Among functional foods, dairy products with incorporation of fat-soluble compounds (e.g. phytosterols) and fatty acid omega 3, or addition of probiotic starters represent 60–70% of the functional foods market (Ivan Salmerón, Thomas, & Pandiella, 2015; Chen, McClements, & Decker, 2013). However, lactose intolerance or protein allergies and cholesterol content are factors that have recently increased the demand for non-dairy products (Prado et al., 2008). Cereal-based products are a general response to consumers for health benefits and as an alternative to dairy products (Marsh, Hill, Ross, & Cotter, 2014) by being both probiotic (living microorganisms 10⁸ to 10⁹ cells per gram of consumed product) and containing fibers, minerals and vitamins (Kandyli, Pissaridi,

Bekatorou, Kanellaki, & Koutinas, 2016).

However, there is a lack of available data in the literature about cereal-based fermented foods with incorporation of phytosterols and/or carotenoids. Chen et al. (2013) described the importance of added carotenoids in functional foods for their positive impact on health problems. The authors also reported the challenges associated with the incorporation of these fat-soluble compounds, because of their poor water solubility, their high sensitivity to oxidation and their structural and physico-chemical properties. It is important that these dietary molecules remain stable during the whole process, transport and storage, in order to maintain their potential bioactivity and a high bioavailability during digestion to be efficient on health.

Among carotenoids, β-carotene and β-cryptoxanthin are pro-vitamin A, known to help the organism to maintain normal eye health, epithelial function, embryonic development and immune system function (Stephensen, 2001). Beside these carotenoids, lycopene, which is a non-provitamin A carotenoid, has some other health benefits, such as decreasing the development of prostate, cervical, colon, rectal, stomach

* Corresponding author. Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UMR Qualisud, 34398, Montpellier Cedex 5, France.

E-mail address: claudie.dhuique-mayer@cirad.fr (C. Dhuique-Mayer).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.103>

Received 11 February 2019; Received in revised form 5 April 2019; Accepted 30 April 2019

Available online 08 May 2019

0023-6438/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

and other types of cancers (Giovannucci, 1999). This carotenoid is also known for its great antioxidant activity (Fiedor & Burda, 2014). Moreover, supplementing functional food containing phytosterols with carotenoids seems necessary because it is suggested that phytosterols reduce the incorporation of carotenoids into mixed micelles during the first steps of digestion (Baumgartner, Ras, Trautwein, Mensink, & Plat, 2017). Furthermore, the competition between phytosterols and β -carotene (which is the most important pro-vitamin A micronutrient) during intestinal absorption has been reported by Fardet, Morise, Kalonji, Margaritis, and Mariotti (2015).

From another side, carotenoid stability must be performed during food processing such as pasteurization and fermentation. The degradation of carotenoids and especially β -carotene during food processing is mainly due to oxidation and thermal treatments knowing that β -carotene oxidation generates losses of color and pro-vitamin A activity (Pénicaud, Achir, Dhuique-Mayer, Dornier, & Bohuon, 2011). Considering fermentation process, some strains such as *Lactobacillus plantarum* can enhance the nutritional value of fermented food by increasing the nutrient density (mostly due to their consumption of sugar), hydrolyzing polymers from the raw material, biosynthesizing bioactive peptides, degrading toxic or anti-nutritional factors and by synthesizing promoters for absorption (Septembre-Malaterre, Remize, & Poucheret, 2018).

Recently, Descalzo et al. (2018) have developed a traditional fermented maize yogurt-like product derived from an African preparation, with added phytosterols. The authors suggested adding carotenoids from natural fruits to increase the bioactive potential of the yogurt-like product. They also proposed to turn the product probiotic with pertinent strains and to use dispersible phytosterols instead of esterified phytosterols emulsion because of the lipid oxidation due to the presence of unsaturated fatty acids in the esterified formulation. Finally in this work, the manufacturing process should have been standardized in fermenters by monitoring temperature and pH parameters during pasteurization and fermentation steps as it was advised by Marsh et al. (2014).

Consequently, this paper focuses on the standardization of a fermented functional product by incorporating carotenoids such as β -cryptoxanthin, β -carotene and lycopene in a fermented-maize yogurt-like product containing dispersible phytosterols. Specifically our aims were (1) to optimize the manufacturing process of this product containing phytosterols by incorporating natural carotenoids from papaya/melon fruit extracts before pasteurization step; (2) to improve the fermentation of the product with a selection of *Lactobacilli* starters in order to obtain a probiotic potential; (3) to study the behavior of these fat-soluble compounds during the whole process in order to determine which step has the main impact on their stability. In fine, the aim was obtaining a balanced product with carotenoids and phytosterols giving an interesting nutritional value and a cholesterol-lowering potential to this maize fermented yogurt-like product.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and inocula preparation

Two pure lyophilized strains *Lactobacillus plantarum* (Lp352-S1616/CNCM I-3069) and *Lactobacillus casei* (Lc1 S42-2015/CNCM I-4592) were provided as starters by Ennolys-Lesaffre (Marq-en-Baroeul, France) and stored under vacuum pack at + 4 °C. Individual strains and a 50-50% ratio (*L. plantarum* - *L. casei*) were inoculated at $1 \cdot 10^6$ CFU/g in the maize-based matrix.

2.2. Manufacture of the maize-based matrix

The manufacturing process including maize soaking, crushing, sieving, formulation, pasteurization and lactic fermentation was described in Fig. 1. 100 g of maize grains from a French local market were

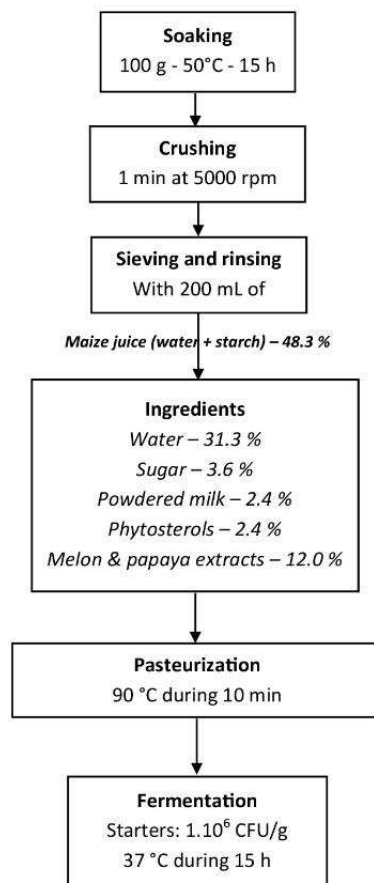


Fig. 1. Schematic overview of the manufacturing process.

soak and then crushed at 5000 rpm for 1 min (Retsch Grindomix GM 200, Germany). Ingredients such as 3.6% of sugar (Daddy, France) and 2.4% of semi-skimmed powdered milk (Régilait, France) were added in the maize juice among others. Commercial dispersible phytosterols (Vitaesterol® S-80 WDP 90% non GMO with 80% of β -sitosterol, Vitae Naturals, Spain) were added. Freeze-dried papaya (*Carica papaya* var. Formosa, Brazil) and melon (*Cucumis melo* var. Cantalupensis, France) were incorporated as sources of carotenoids (β -cryptoxanthin - lycopene and β -carotene respectively). Pasteurization and fermentation were performed in a six-hundred-milliliter glass double wall fermenter (Legallais, France) as described by de J. C. Munanga, Loiseau, Grabulos, & Mestres (2016). The intern temperature and pH were determined per minute by food penetration probes connected with a central data acquisition (Almemo® 2690-8A, Ahlborn, Germany). After pasteurization, the lactic fermentation started with *Lactobacilli* strains added either pure or mixed (50-50 ratio) at a concentration of $1 \cdot 10^6$ CFU/g. Fermentations were conducted at 37 ± 0.2 °C for 15 h. The products were kept frozen and in darkness at -20 °C until analyses.

2.3. Microbiological analysis

2.3.1. Determination of growth kinetics

The number of *Lactobacilli* was estimated each hour during fermentation by plating on MRS agar medium (Biokar Diagnostics, France – Ref BK089HA) at 37 ± 0.2 °C for 48 h. Growth kinetics and pH values were then associated to each bacteria or ratio. Growth parameters were calculated: specific growth rate (μ_{max}) and generation time corresponding to $G = \ln(2)/\mu_{max}$. Growth kinetics were determined and modelled in agreement with the Rosso equation:

$$\log N_{(t)} = \begin{cases} \log N_0 & \text{si } t < \lambda \\ \log N_{\max} - \log \left(\left[1 + \left(\frac{N_{\max}}{N_0} - 1 \right) \exp(-\mu_{\max}(t - \lambda)) \right] \right) & \text{si } t \geq \lambda \end{cases} \quad (1)$$

where μ_{\max} is the specific growth rate (h^{-1}), λ the latency period (h), N_0 the initial population (CFU/g), N_{\max} the maximal population (CFU/g) and \log the decimal logarithm.

2.3.2. Determination of the final bacterial ratio

In order to determine the final ratio of 50-50 ratio after 15 h of fermentation the strains were differentiated by their sugar consumption with an API 50 CHL gallery (Analytical Profile Index - Biomérieux, France). Then, a 50 CHL agar medium commercialized (Biomérieux, France) was used with 16 g/L added agar-agar. A control was made without any sugar, although two others were made with 20 g/L added glucose (Glc medium) and 20 g/L added arabinose (Ara medium). Just at the end of the fermentation, 1 g of the product was sampled and diluted from 10^{-1} to 10^{-8} . 100 μL of the dilutions 10^{-6} , 10^{-7} and 10^{-8} were sowed on the control medium, the Glc and the Ara mediums and incubated during 48 h at 37 ± 0.2 °C.

2.3.3. Determination of the microbiological efficiency of pasteurization: sterility of the product

Just after pasteurization, 1 g of the product was sampled and diluted from 10^{-1} to 10^{-4} . 100 μL of each dilution were sowed on Plate Count Agar (PCA) medium in triplicates and incubated during 72 h at 30 ± 0.2 °C according to the ISO 4833–2:2013 Afnor norm.

2.4. Proximate analysis

The food composition of the product was analyzed in terms of proteins, lipids and carbohydrates contents. Proteins were measured following Kjeldahl method (AOAC- 2001), ($N \times 6.25$) using a Foss Techator Digester and an automatic Foss analytical AB Kjeltec™ 8400 apparatus (Foss, Sweden). Lipid content was obtained with the Folch extraction procedure (Schäfer, 1998). Starch was dosed according to Clegg (1956) with anthrone reagent method. Analysis and separation of soluble sugars were determined using an UPLC – 1290 System Infinity II (Agilent, USA) equipped with a refractometer detector. A SHODEX SH1011 column 300×8 mm (Tokyo, Japan) was used with an isocratic system of water with H_2SO_4 (0.01%) and a flow rate of 0.7 mL/min. Temperature was set at 30 °C, injection volume at 10 μL and spectrophotometric detection at 210 and 245 nm. External calibration of glucose, fructose, lactose and sucrose were realized using standards from Sigma-Aldrich (France). Dry matters were obtained in a vacuum oven at 70 °C during 24 h according AOAC method 1991.

2.5. Phytomicronutrients analysis

Fat-soluble compounds such as carotenoids (β -cryptoxanthin, β -carotene and lycopene), phytosterols (β -sitosterol) and tocopherols (α -tocopherol and γ -tocopherol) were analyzed by UPLC-DAD. The fat-soluble extraction was adapted from Rossetti et al. (2010). Briefly, 1 g of product was saponified with 1.5 ml of 12N KOH for 30 min at 70 °C and extracted twice with 5 mL of n-hexane. Hexanic phases were evaporated under nitrogen and dissolved in 1 mL of a MTBE/methanol solution (4:1, v:v) before injection in UPLC system. An UPLC –1290 System Infinity II (Agilent, USA), with a diode array detector (DAD) and a fluorescence detector (FLD) was used. The column was a C30 YMC (150×4.6 mm; 3 μm) (YMC Europe GmbH, Germany). Mobile phases were methanol as eluant A, water as eluant B and MTBE as eluant C, set at 1.5 mL/min flow rate. The gradient used to separate carotenoids,

phytosterols and tocopherols was the following: 0-1 min [60 % A, 40 % B]; 1-1.5 min [80 % A, 20 % B]; 1.5-3 min [80 % A, 5 % B, 15 % C]; 3-12.5 min [15 % A, 85 % C]; 12-13.75 min [15 % A, 85 % C]; 13.75-15 min [100 % A]; 15-17 min [60 % A, 40 % B] and back to the initial conditions for re-equilibration. The column temperature was 20 °C and the injection volume was 10 μL . Detection was set at 210 nm (DAD) for phytosterols, 450 and 470 nm (DAD) for carotenoids. Fluorescence detection (FLD) for tocopherols was set at 296 nm (excitation) and 330 nm (emission). Quantification was achieved using calibration curve with β -carotene, β -cryptoxanthin, lycopene (Extrasynthese, France), α / γ -tocopherols standards (Sigma S¹ Louis, USA) and β -sitosterol standard (Supelco, Bellefonte, USA).

2.6. Statistical analyses

All statistical analyses were performed using XLSTAT software version 19.6 (Addinsoft, France). All data were reported as means \pm standard deviation (SD) from three replicates of each experiment. Data were analyzed statistically using one-way analysis of variance (ANOVA) in order to determine significant differences ($p < 0.05$). Tukey's multiple comparison method was used to further examine any significant difference between results.

3. Results and discussion

3.1. Standardization of the manufacturing process with incorporation of carotenoids

According to the manufacturing process (Fig. 1), the standardization in fermenters was conducted to monitor pasteurization conditions and microbial parameters during fermentation. This optimization of batch fermentation allowed a better control of parameters such as temperature and pH, thus predicting kinetics bacterial growth and ensuring product safety. A model of fermentation of a traditional Beninese beverage called gowé using this batch fermentation was described by de J. C. Munanga et al. (2016). The incorporation of lyophilized fruits enhanced the homogeneity of the product just as dispersible phytosterols. Moreover, this form of fruit concentrate was recommended as functional food ingredients because its richness in antioxidant bioactive compounds and dietary fibers (Rocha, Fávoro-Trindade, & Grosso, 2012). The addition of bioactive compounds like carotenoids led to a fortification in fat-soluble pro-vitamin A as well as antioxidants. This carotenoids supplementation induced a functional equilibrium with a balanced ratio between carotenoids and phytosterols, which should have no detrimental impact on carotenoids absorption.

In order to obtain a probiotic functional product, the cooking step was set before fermentation, acting as pasteurization in our present study. In that case, after the pasteurization, the sterility test on PCA proved that the product was microbiologically stable and safe with only $3.33 \cdot 10^1$ CFU/g which entered in the Afnor norm.

In regard to the nutritional composition of the functional product, the macronutrient contents were reported in Table 1. The product is balanced in proteins, lipids and sugars. It contained twice more proteins and 30% less sugars than a dairy yogurt containing fruits, regarding the table of the USDA (2018). Dry matter was $21.3 \pm 0.01\%$ and the calorific value 121.64 ± 6.08 kcal/100 g.

3.2. Selection of starters and microbiological optimization of the functional product

In order to select the starters to initiate the fermentation, the kinetic growth, the latency period, the final pH and the final biomass were compared between different strains *L. casei* versus *L. plantarum* versus their ratio 50-50. Therefore, these strains were used either pure or mixed in a ratio 50-50.

Data were modelled in agreement with Rosso model (1) on Fig. 2.

Table 1
Fat-soluble phytonutrients and macronutrients content of the functional yogurt-like product.

Phytonutrients	Content	Macronutrients	g per 100 g
Carotenoids (mg/kg)			
β -cryptoxanthin	1.43 ± 0.09	Proteins	8.12 ± 0.39
β -carotene	7.65 ± 0.48	Lipids	3.48 ± 0.08
Lycopene	7.02 ± 0.55	Fruits sugars	13.50 ± 0.12
Tocopherols (mg/kg)		<i>Glucose</i>	6.16 ± 0.05
α -tocopherol	0.34 ± 0.04	<i>Lactose</i>	1.08 ± 0.01
γ -tocopherol	3.47 ± 0.30	<i>Fructose</i>	6.26 ± 0.06
Phytosterols (g/kg)		Added sugar (Sucrose)	3.6 ± 0.18
β -sitosterol	19.88 ± 1.10	Starch	2.34 ± 0.29

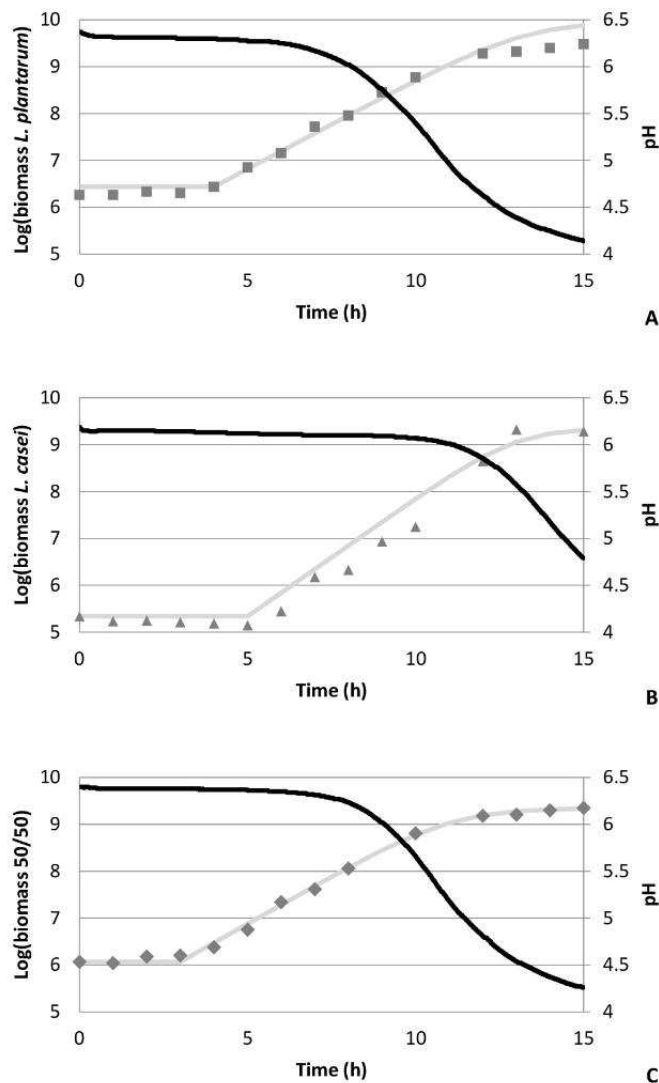


Fig. 2. Growth kinetics with Rosso model and pH drop of fermented products with A) 100% *L. plantarum*; B) 100% *L. casei*; C) ratio 50-50 *L. plantarum*/*L. casei* — Rosso — model \blacktriangle \blacksquare ; pH; log(biomass).

Strains fermented into the maize-based matrix until reaching the stationary phase around 15 h, by increasing three times their biomass from $1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$ CFU/g to $1 \cdot 10^9$ – $1 \cdot 10^{9.5}$ CFU/g. Thus, the final product contained enough living *Lactobacilli* at the end of the process to be potentially probiotic, that is to say more than 10^9 UFC/g (Prado et al., 2008). All the final products had a pH between 4 and 4.8; it is the known pH for classic yogurt (FAO, 1995) and could guarantee its shelf

life by insuring a low contamination rate as well as its microbiological stability. Moreover, the latency period of the 50-50 ratio is only 3 h (against 4 h and 5 h for *L. plantarum* and *L. casei* respectively) with a specific growth rate reaching 0.94 h^{-1} (Table 2). Thus, this ratio ensures a brief fermentation start with a swift exponential growth. Moreover, multistrain or multispecies probiotic beverages may provide greater beneficial effects than monostrain cultures (Marsh et al., 2014). *L. plantarum* was chosen for its ubiquity: it is found in the environment, especially on plants and therefore on maize. *L. casei* species are known to be used in a lot of probiotic dairy products. Consequently, the 50-50 ratio is the best compromise to ferment the maize-based product, regarding to the microbiological results.

In order to determine the real final ratio of strains, the two *Lactobacilli* strains have been counted individually at the end of the fermentation. The API 50 CHL gallery showed that the final ratio was around 45% of *L. plantarum* and 55% of *L. casei* which is highly correlated with the kinetic growth. Regarding those results, there is no competition for nutrients between these two strains: they kept their initial ratio and their own probiotic potential.

3.3. Carotenoids content and other fat-soluble phytonutrients in the functional yogurt-like product

Carotenoids, tocopherols and β -sitosterol were quantified in the functional yogurt-like product and reported in Table 1. Three main carotenoids were found in the final product: β -cryptoxanthin and lycopene related to papaya lyophilized extract and β -carotene from melon lyophilized extract. The major carotenoids were pro-vitamin A β -carotene and the well-known antioxidant carotenoid called lycopene. The total carotenoids content of the product was 16 mg/kg representing $2.01 \pm 0.14 \text{ mg}$ per serving portion of 125 g. This high content of carotenoids also produced the final orange color of this food. Using the retinol activity equivalent (RAE) as an estimation of vitamin A in the product, 125 g would bring 12% of the Recommended Daily Allowance (RDA) for an adult. Moreover, approximately 2 mg of carotenoids per portion is enough to counteract the competition for micellarization of carotenoids with phytosterols during digestion. Consequently, it is recommended to increase carotenoids intake during phytosterols consumption (Fardet et al., 2015; Noakes et al., 2002). Tocopherols originated from fruit extracts bring 4% of RDA vitamin E. These fat-soluble compounds are antioxidants *in vivo* for metabolism functions and also efficient for the protection of other phytonutrients against oxidative damage. α -tocopherols represented $0.34 \pm 0.04 \text{ mg/kg}$ and γ -tocopherols $3.47 \pm 0.30 \text{ mg/kg}$. In fine, one portion of 125 g of the yogurt-like product contained 2.5 g of free phytosterols (mainly β -sitosterol). This content is enough to obtain a cholesterol-lowering effect. Indeed, according to the report of ANSES (2014), an ingestion of 2 g of phytosterols per day is the approximate effective dose essential to reduce the Low-Density Lipoprotein cholesterol (LDL-cholesterol) concentration in plasma.

3.4. Stability of fat-soluble phytonutrients during the manufacturing process

Carotenoids and tocopherols stability were studied during pasteurization and fermentation process. To evaluate the effect of lactic fermentation on carotenoid content, the yogurt-like product was first fermented with *L. plantarum* or *L. casei* during 10, 15 and 20 h. After 20 h of fermentation with *L. casei*, lycopene significantly ($p < 0.05$) increased from 5.1 to 7.7 mg/kg (+33%), β -carotene from 6.9 to 7.4 mg/kg (+7%) and tocopherols from 5.1 to 7.2 mg/kg (+30%). No changes were observed for tocopherols when the product was fermented with *L. plantarum* and a smaller increase occurred for β -carotene (from 8 to 9.2 mg/kg; +13%) but no significant increase for lycopene. Together, these results supported that fermentation allowed the recovery of carotenoids and tocopherols to a significant extent

Table 2
Parameters of strains' growth kinetics.

Lactobacillus strains	Specific growth rate (h^{-1})	Generation time (h)	Latency period (h)	Initial pH – Final pH
<i>L. plantarum</i>	0.86 ^b	0.81	4	1.7
<i>L. casei</i>	1.16 ^a	0.60	5	1.6
<i>L. plantarum/L. casei</i> 50–50	0.94 ^b	0.74	3	1.9

a and b letters significantly different ($p < 0.05$).

particularly when the product was fermented with the starter *L. casei*. It was probably due to a production of enzymes like lipases or proteinases by strains, which allowed the liberation of carotenoids from complexes, then permitted a better extractability of these compounds. Moreover, it is also possible that these Lactobacilli strains demonstrated a carotenogenesis, when they are not in co-culture, as it is described by Kot, Błażej, Gientka, Kieliszek, and Bryś (2018) and Kot, Błażej, Kurcz, Gientka, and Kieliszek (2016). The increase of nutritional value and the changes in bioactive compound contents over lactic fermentation were reported by Katina et al. (2007) and recently by Septembre-Malaterre et al. (2018). The proteolytic activity of lactic acid bacteria culture could result in a better recovery of carotenoids. By disrupting the protein-carotenoid complexes in vegetables, carotenoid extraction was improved (Bhaskar, Suresh, Sakhare, & Sachindra, 2007). All these results represented another argument to support the choice of the fermentation with the 50-50 ratio of strains.

Considering this ratio of starters, the fat-soluble phytonutrient contents were then analyzed at three different steps of the manufacturing process: raw product (neither pasteurized nor fermented), pasteurized product and final product pasteurized and fermented for 15 h. Fig. 3 describes the evolution of bioactive compounds in the fermented product obtained with the 50-50 ratio. While carotenoids were slightly impacted during pasteurization, tocopherols and phytosterols remained stable.

There were significant ($p < 0.05$) losses in carotenoids after pasteurization but no significant difference between the pasteurized product before and after 15 h of fermentation. Indeed, the averages of losses after pasteurization were $21.4 \pm 6.0\%$, $26.9 \pm 6.0\%$ and $20.2 \pm 7.0\%$ for β -cryptoxanthin, β -carotene and lycopene respectively; while the losses after 15 h of fermentation were $23.2 \pm 1.0\%$, $28.1 \pm 1.0\%$ and $19.2 \pm 3.0\%$. Therefore, in this case, β -carotene was more sensitive to the pasteurization step than β -cryptoxanthin and lycopene. The lower thermal degradation of lycopene, compared to other carotenoids, was generally observed in vegetable matrix (tomato, citrus juice) because lycopene is bounded with proteins, giving it a better structural protection (Achir, Hadjal, Madani, Dornier, & Dhuique-

Mayer, 2015). Moreover, the lycopene degradation was also reported to be lower in lyophilized fruit form than in model system (Rocha et al., 2012).

It means that there is a “pasteurization effect” which represents the whole “process impact” on the bioactive compounds, because there is no “fermentation impact”. Thus, the fermentation of lactic strains did not impact the stability of the compounds, probably because these bacteria released bioactive peptides improving the antioxidant capacity of the product (Septembre-Malaterre et al., 2018). Even with these relative losses of carotenoids after pasteurization (20–27%), all fat-soluble compounds remained relatively stable during the whole process with a high level of retention (between 73% and 100%). Note that *cis*-isomerization of β -carotene represents 6.5% of total β -carotene and this low percentage of isomerization did not really affect the concentration of β -carotene during the process. In the final product, the *cis*-isomerization of the lycopene reaches 10%, with the half formed during pasteurization. Similar results on carotenoids degradation in pumpkin puree was observed by Provesi, Dias, and Amante (2011) with a carotenoid retention > 75%. According to Pinheiro Sant'Ana, Stringheta, Cardoso Brandão, and Cordeiro de Azeredo (1998), a water pasteurization without pressure, exactly what was performed in this new formulation, is the best way to keep the most of carotenoids, between 56 and 89%.

4. Conclusion

The standardization of this yogurt-like product, presented here as a generic functional fermented food, demonstrated that incorporation and stabilization of fat-soluble phytonutrients during a whole process is possible in a probiotic cereal-based product. Moreover, the nutritional balance between phytosterols and carotenoids was respected, to provide potential health effects such as a reduction of the absorption of cholesterol during digestion and a non-negligible intake of pro-vitamin A. Indeed, only the pasteurization step had a relative impact on carotenoids. The fermentation with the 50-50 ratio of *L. plantarum* and *L. casei* had no significant impact on the content of fat-soluble compounds. In the contrary, it seems that pure strains could demonstrate carotenogenesis. Finally, the 50-50 ratio presented the best growth parameters into this matrix and it is known that a co-culture is always better to enhance a probiotic potential. Further researches are needed in order to optimize this product on nutritional value. It is essential to know better this new cereal fermented yogurt-like product in terms of nutritional and sensory qualities. In that purpose, carotenoid bioaccessibility in this matrix has to be assessed in the future, just as sensory analyses.

Declarations of interest

None.

Acknowledgments

We particularly would like to thank Ennolys-Lesaffre for providing the *L. plantarum* (CNCM I-3069) and the *L. casei* (CNCM I-4592). All our gratitude to Sylvie Lortal (Institut National de la Recherche

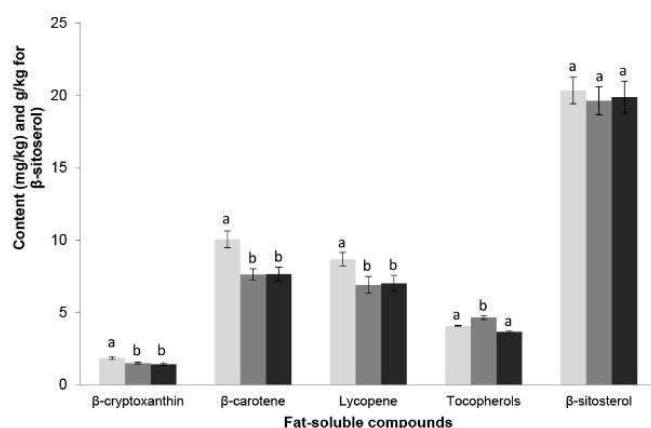


Fig. 3. Contents of carotenoids, tocopherols and β -sitosterol at different steps of the process with a and b as different statistic groups ($p < 0.05$); ■ Not pasteurized; ■ Pasteurized, not fermented; ■ Fermented for 15 h

Agronomique (INRA), UMR Science et Technologie du Lait et de l'Œuf (STLO), 35000 Rennes, France) for her priceless help for this work.

References

- Achir, N., Hadjal, T., Madani, K., Dornier, M., & Dhuique-Mayer, C. (2015). Carotene reactivity in pink grapefruit juice elucidated from model systems and multiresponse modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(15), 3970–3979. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00509>.
- ANSES. (2014). *OPINION of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety on Assessment of the risks and benefits of consuming food products fortified with phytosterols and phytosterols (No. 2010-SA-0057)*. Maisons-Alfort: ANSES15.
- Baumgartner, S., Ras, R. T., Trautwein, E. A., Mensink, R. P., & Plat, J. (2017). Plasma fat-soluble vitamin and carotenoid concentrations after plant sterol and plant stanol consumption: A meta-analysis of randomized controlled trials. *European Journal of Nutrition*, 56(3), 909–923. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1289-7>.
- Bhaskar, N., Suresh, P. V., Sakhare, P. Z., & Sachindra, N. M. (2007). Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteination/demineralization and carotenoid recovery. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1427–1434. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.10.019>.
- Chen, B., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2013). Design of foods with bioactive lipids for improved health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 35–56. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032112-135808>.
- Clegg, K. M. (1956). The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 7(1), 40–44. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740070108>.
- de J. C. Munanga, B., Loiseau, G., Grabulos, J., & Mestres, C. (2016). Modeling lactic fermentation of gowé using *Lactobacillus* starter culture. *Microorganisms*, 4(4), 44. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4040044>.
- Descalzo, A. M., Rizzo, S. A., Servent, A., Rossetti, L., Lebrun, M., Pérez, C. D., et al. (2018). Oxidative status of a yogurt-like fermented maize product containing phytosterols. *Journal of Food Science & Technology*, 55(5), 1859–1869. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3102-5>.
- FAO. (1995). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. *Collection FAO: Alimentation et nutrition*. Vol. 28. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/t4280f/t4280f00.htm#Contents>.
- Fardet, A., Morise, A., Kalonji, E., Margaritis, I., & Mariotti, F. (2015). Influence of phytosterol and phytosteranol food supplementation on plasma liposoluble vitamins and provitamin A carotenoid levels in humans: An updated review of the evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 00–00 <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1033611>.
- Fiedor, J., & Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6(2), 466–488. <https://doi.org/10.3390/nu6020466>.
- Giovannucci, E. (1999). Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of the epidemiologic literature. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 91(4), 317–331. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.4.317>.
- Kandyli, P., Pissaridi, K., Bekatorou, A., Kanellaki, M., & Koutinas, A. A. (2016). Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science*, 7, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.012>.
- Katina, K., Liukkonen, K.-H., Kaukovirta-Norja, A., Adlercreutz, H., Heinonen, S.-M., Lampi, A.-M., et al. (2007). Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.07.006>.
- Kot, A. M., Błażej, S., Gientka, I., Kieliszek, M., & Bryś, J. (2018). Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? *Microbial Cell Factories*, 17(1) <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0893-z>.
- Kot, A. M., Błażej, S., Kurcz, A., Gientka, I., & Kieliszek, M. (2016). Rhodotorula glutinis—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(14), 6103–6117. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7611-8>.
- Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 38(2), 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.05.002>.
- Noakes, M., Clifton, P., Ntanos, F., Shrapnel, W., Record, I., & McInerney, J. (2002). An increase in dietary carotenoids when consuming plant sterols or stanols is effective in maintaining plasma carotenoid concentrations. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75(1), 79–86. <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.1.79>.
- Pénicaud, C., Achir, N., Dhuique-Mayer, C., Dornier, M., & Bohuon, P. (2011). Degradation of β -carotene during fruit and vegetable processing or storage: Reaction mechanisms and kinetic aspects: A review. *Fruits*, 66(6), 417–440. <https://doi.org/10.1051/fruits/2011058>.
- Pinheiro Sant'Ana, H. M., Stringheta, P. C., Cardoso Brandão, S. C., & Cordeiro de Azeredo, R. M. (1998). Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. *Food Chemistry*, 61(1–2), 145–151. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00084-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00084-8).
- Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41(2), 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.010>.
- Provesi, J. G., Dias, C. O., & Amante, E. R. (2011). Changes in carotenoids during processing and storage of pumpkin puree. *Food Chemistry*, 128(1), 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.027>.
- Rocha, G. A., Fávoro-Trindade, C. S., & Grosso, C. R. F. (2012). Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioprocess Processing*, 90(1), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.01.001>.
- Rossetti, L., Langman, L., Grigioni, G. M., Biolatto, A., Sancho, A. M., Comerón, E., et al. (2010). Antioxidant status and odour profile in milk from silage or lucerne-fed cows. *Australian Journal of Dairy Technology*, 65(1), 3–9.
- Salmerón, I. (2017). Fermented cereal beverages: From probiotic, prebiotic and synbiotic towards nanoscience designed healthy drinks. *Letters in Applied Microbiology*, 65(2), 114–124. <https://doi.org/10.1111/lam.12740>.
- Salmerón, I., Thomas, K., & Pandiella, S. S. (2015). Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria on the physicochemical composition and acceptance of fermented cereal beverages. *Journal of Functional Foods*, 15, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.012>.
- Schäfer, K. (1998). Accelerated solvent extraction of lipids for determining the fatty acid composition of biological material. *Analytica Chimica Acta*, 358(1), 69–77. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00587-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00587-4).
- Septembre-Malaterre, A., Remize, F., & Poucheret, P. (2018). Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Research International*, 104, 86–99. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.031>.
- Serafini, M., Stanzione, A., & Foddai, S. (2012). Functional foods: Traditional use and European legislation. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, 63(sup1), 7–9. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.637488>.
- Stephensen, C. B. (2001). VITAMIN A, INFLECTION, AND IMMUNE FUNCTION *. *Annual Review of Nutrition*, 21(1), 167–192. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.167>.
- USDA. (2018). *USDA - basic report: 43261, yogurt, fruit variety, nonfat*. Retrieved from <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/43261?fgcd=&manu=&format=&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=soya+yogurt&ds=SR&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=>.

2. Interactions entre caroténoïdes, phytostérols et cholestérol lors de la digestion gastro-duodénale d'un aliment fonctionnel à base de maïs fermenté

2.1. Objectif

Afin de comprendre les interactions entre les composés liposolubles de l'aliment développé, ces travaux ont eu pour objectif d'étudier l'effet des phytoD sur la bioaccessibilité des caroténoïdes, mais aussi l'interaction entre les phytostérols et le cholestérol alimentaire, prenant en compte le potentiel hypocholestérolémiant du produit. Ces différents composés liposolubles peuvent en effet entrer en compétition lors de la digestion au cours de leur transfert micellaire et de leur absorption par l'entérocyte. L'absorption intestinale des composés a été mesurée en couplant le modèle de digestion *in vitro* aux cellules de type Caco-2 (TC7).

Par ailleurs, les phytostérols utilisés possèdent des véhicules d'encapsulation, nécessaires pour augmenter leur hydrophilicité et ainsi faciliter leur incorporation dans un aliment faible en matières grasses. Pour cette raison, il était pertinent de tenir compte de ce type de véhicule dans les interactions de ces composés liposolubles lors de la digestion de l'aliment fonctionnel. Ces travaux ont fait l'objet d'une deuxième publication.

2.2. Le véhicule des phytostérols dispersibles utilisés dans un aliment fonctionnel modifie la bioaccessibilité des caroténoïdes et du cholestérol, ainsi que leur absorption par les cellules Caco-2 (PUBLICATION 2)

En accord avec la littérature, la bioaccessibilité des caroténoïdes de cet aliment est corrélée à leur hydrophilicité, celle des caroténoïdes provitaminiques A (β -cryptoxanthine et β -carotène) étant supérieure à celle du lycopène, avec 30, 28 % et 5 % respectivement. Le β -sitostérol encapsulé présente une très faible bioaccessibilité, équivalente à 1,6 %. Cela pourrait suggérer que les phytostérols sous forme dispersibles sont mal incorporés dans les micelles mixtes, du fait de leurs véhicules.

- **Digestions *in vitro* de l'aliment**

Afin de vérifier l'effet des phytoD et de leurs véhicules (principalement la maltodextrine), la bioaccessibilité des composés liposolubles a été estimée dans l'aliment avec ou sans phytoD et avec de la maltodextrine seule. Cette étude a montré que la

bioaccessibilité des carotènes augmentait de 40 % en présence de phytoD, mais également en présence de maltodextrine. En revanche, dans les mêmes conditions, la bioaccessibilité de la β -cryptoxanthine a été diminuée de 14 %. Ces résultats suggèrent que les propriétés de la maltodextrine et notamment sa capacité à former des nano-émulsions faciliterait la micellarisation des carotènes (Liang *et al.* 2013). En effet, après digestion, la taille moyenne des gouttelettes lipidiques était significativement ($p < 0,05$) plus petite en présence de phytoD. Par sa structure plus polaire, la β -cryptoxanthine (xanthophylle) s'incorpore davantage à la surface des micelles que les carotènes, ce qui explique que sa micellarisation soit moins facilitée par la maltodextrine que pour les carotènes apolaires.

Le remplacement des phytoD par du β -sitostérol libre montre que la bioaccessibilité de tous les types de caroténoïdes diminue, conformément à la littérature. Ce résultat confirme alors l'effet du véhicule des phytoD sur la micellarisation des caroténoïdes expliqué précédemment.

Par ailleurs, dans l'aliment formulé avec ces phytoD, la micellarisation du cholestérol a été significativement ($p < 0,05$) diminuée de plus de 50 %, sans affecter la micellarisation des carotènes. Ceci confirme un effet hypocholestérolémiant potentiel du produit, sans impact sur la bioaccessibilité des carotènes.

- **Absorption intestinale par les cellules Caco-2**

L'absorption intestinale des caroténoïdes a ensuite été mesurée en couplant le modèle de digestion *in vitro* au modèle cellulaire de type Caco-2 (clone TC7). Les caroténoïdes provitaminiques A sont préférentiellement absorbés, par rapport au lycopène ($18,9 \pm 2,3$ % ; $14,1 \pm 1,6$ % ; $7,2 \pm 1,6$ % pour la β -cryptoxanthine, le β -carotène et le lycopène respectivement) après digestion de l'aliment contenant des phytoD. Ces résultats montrent également que l'absorption des caroténoïdes est plus faible en présence de phytoD dans l'aliment que sans. Il semblerait alors que l'absorption des caroténoïdes soit liée à la taille des micelles mixtes. En effet, les micelles formées en présence de phytoD ou de leurs véhicules (maltodextrine et sucroesters) présentent des tailles significativement plus élevées ($p < 0,05$) que les autres échantillons. Il est connu que les micelles de plus petites tailles sont captées plus facilement. Cette absorption plus faible pourrait être aussi en lien avec les passages facilités par les transporteurs (Nakano, Inoue, et Murakoshi 2019).

Il y a donc une corrélation positive entre la présence des véhicules des phytoD et la taille des micelles.

Une inhibition de l'absorption du cholestérol par l'entérocyte est observée en présence de phytoD, démontrant ainsi un effet hypocholesterolémiant potentiel de l'aliment.

Globalement, ces résultats ont montré que la bioaccessibilité des carotènes a été améliorée par les véhicules des phytoD, la maltodextrine et les sucroesters (10 % et 3 %). Malgré une légère diminution de l'absorption des caroténoïdes en raison de la taille des micelles formées par ces véhicules, une inhibition de l'accumulation de cholestérol par les cellules Caco-2 a été observée. Les phytoD, incorporés dans cet aliment fermenté fonctionnel, ont donc induit un effet hypocholesterolémiant potentiel, en diminuant la micellarisation du cholestérol, sans affecter la bioaccessibilité des carotènes. Ces résultats ont ainsi permis de mettre en évidence le rôle clé du véhicule des phytostérols dans la micellarisation des caroténoïdes et de leur absorption par les cellules Caco-2.

Phytosterol vehicles used in a functional product modify carotenoid/cholesterol bioaccessibility and uptake by Caco-2 cells

Magali Gies^{a,b}, Adrien Servent^{a,b}, Patrick Borel^c, Claudie Dhuique-Mayer^{a,b*}

^a CIRAD, UMR Qualisud, F-34398 Montpellier, France

^b Qualisud, Univ. Montpellier, CIRAD, Montpellier SupAgro, Université d'Avignon, Université de La Réunion, Montpellier, France

^c C2VN, INRA, INSERM, Aix Marseille Univ, Marseille, France

*Corresponding author: claudie.dhuique-mayer@cirad.fr

Abstract

Functional foods containing dispersible phytosterols (DPs) are recommended to reduce cholesterol absorption in humans. However, only a few studies have been conducted on the effect of DP vehicles on carotenoid bioaccessibility and uptake by intestinal cells. On a previously developed fermented maize product containing both DPs and carotenoids, we aim to evaluate the effect of DPs encapsulated by maltodextrin on the carotenoid/phytosterol/cholesterol interactions during gastro-duodenal digestion. Thanks to maltodextrin properties, carotene bioaccessibility was significantly improved by 40.2 ± 1.4 % while that of β -cryptoxanthin decreased by 14 ± 0.1 %. Additionally, the presence of DPs reduced the cholesterol micellarization by 51.8 ± 4.2 %. Despite a slight decrease in carotenoid uptake caused by the DP vehicle, related to micelle size, an inhibition of cholesterol accumulation by Caco-2 cells was observed. These results highlighted the key role of maltodextrin as a vehicle of DPs on carotenoid and cholesterol absorption.

Keywords

Dispersible phytosterols; maltodextrin; carotenes; xanthophylls; bioaccessibility; Caco-2 cells

1. Introduction

Phytosterols are frequently used in the functional food industry because they are known to be effective in lowering the LDL-cholesterol level (Gylling et Simonen 2015; Gleize et al. 2016). Several dairy products, such as yogurts or margerines, are enriched in phytosterols and have been on the market for several years (Descalzo et al. 2018). The daily recommended intake of phytosterols to obtain a cholesterol-lowering effect is 1.6 to 2 g. It reduces the cholesterol absorption from the gut by 30-40 % leading to 8-10 % decrease of plasma LDL-cholesterol (Marangoni et Poli 2010; Chen, McClements, et Decker 2013a; Shahzad et al. 2017). Recently, it was explained that functional foods with plant sterols may be considered in hypercholesterolemic patients with intermediate and low global cardiovascular risk (Gylling et al. 2014).

Phytosterols are natural constituents of plant cell walls. Among the 250 identified phytosterol molecules, β -sitosterol is the most abundant phytosterol along with campesterol and stigmasterol. Because of the structural similarities between sitosterol and cholesterol (an additional ethyl group at position C-24 in sitosterol), it is known that sitosterol can reduce cholesterol absorption. The two main mechanisms involved in the cholesterol-lowering effect of phytosterols are : their competition with cholesterol molecules during the incorporation into mixed micelles in the digestive tract ; and the co-crystallization with cholesterol, leading to an increase in the fecal excretion of cholesterol (Marangoni & Poli 2010). Another mechanism described the competition for uptake by intestinal transporters (NPC1L1 and SR-BI) and an apical efflux of phytosterols from the enterocytes via ABCG5/G8 (Nakano, Inoue, et Murakoshi 2019).

Data suggest that the type of phytosterols (free or esterified) and the food matrix can influence the interaction between phytosterols and cholesterol (Gleize et al. 2016). Solubilized sterols are more often used in low-fat dairy products than sterol esters. They also induced a similar LDL-cholesterol lowering effect (Thomsen et al. 2004; Shaghaghi, Harding, et Jones 2014). However, a major concern is the interaction between phytosterols and fat-soluble bioactive compounds, like carotenoids or tocopherols, during digestion (Richelle et al. 2004; Noakes et al. 2002; Rudkowska et al. 2008). Indeed, recent meta-analyses reported the decrease of carotenoid concentrations in plasma after plant sterol consumption (Baumgartner et al. 2017; Fardet et al 2017).

Consequently, it is recommended to increase the consumption of fruits and vegetables rich in carotenoids together with the consumption of functional sterol products (Fardet et al 2017). Carotenoids are known to be a natural antioxidant (such as lycopene (Lyc)), but also enhancers of the immune system, decreasing the risk of cardiovascular and eye diseases (Jomova et Valko 2013). Some of them are indeed provitamin A carotenoids (β -carotene (Bc), α -carotene, β -cryptoxanthin (Bcx)) and have many vital systemic functions after bioconversion into vitamin A in the organism (Fernández-García et al. 2012). The lipophilic nature of carotenoids could explain the decrease in their absorption when phytosterols are present. Apolar Bc is solubilized within mixed micelles whereas Bcx, like xanthophyll, is probably located on the surface of lipid droplets (Patrick Borel et al. 1996). Therefore, phytosterols can replace not only cholesterol in the core of mixed micelles but also other fat-soluble compounds, such as carotenoids (Baumgartner et al. 2017).

However, both esterified or free phytosterols are known to compete with carotenoids for absorption during gastro-duodenal digestion, in a dose-dependent manner, even if it is less with free phytosterols (Richelle et al. 2004). That is why it is necessary to supplement a functional product containing phytosterols with carotenoids, to reach at least 2 mg per 125 g serving portion (Noakes et al. 2002).

In this context, our laboratory developed a new probiotic functional food based on fermented maize, containing dispersible phytosterols (DPs) and enriched with natural carotenoids from papaya and melon. This yogurt like-product was designed to be an alternative to current functional dairy products (Gies et al.

2019). Due to possible interactions between phytosterols and fat-soluble compounds for micellarization, the bioaccessibility of carotenoids and dietary cholesterol of this new functional food had to be assessed, taking into account the role of the vehicle of DPs. Specifically, our aims were 1) to evaluate the bioaccessibility of carotenoids with and without added DPs and 2) to understand if DPs decrease cholesterol micellarization during *in vitro* digestion of the fermented yogurt-like product with added cholesterol, in order to validate the cholesterol-lowering effect of these specific DPs. In the second part, fat-soluble cellular uptake was measured using *in vitro* digestion coupled with the Caco-2 cell culture model.

2. Material and methods

2.1. Fermented maize yogurt-like product

This functional product was previously developed by our laboratory to obtain a probiotic yogurt-like food, based on fermented maize, designed to be functional. Indeed, it was enriched with carotenoids and DPs to confer a cholesterol-lowering effect and provide a high intake of provitamin A. The material contains 2.05 mg of carotenoids/portion of 125 g, which is nearly half of the estimated daily carotenoid consumption in several countries of 1.3 - 5.84 mg (Toti et al. 2018; Gies et al. 2019). The manufacturing process included maize soaking, crushing, sieving, pasteurization and lactic fermentation. DPs and freeze-dried fruits (papaya and melon) were incorporated before the pasteurization step (Gies et al. 2019). Commercial DPs, S-80 WDP 90 % non-GMO with 80 % β -sitosterol were provided by Vitaesterol® (Vitae Naturals, Spain). This type of DP is spray-dried with 10 % maltodextrin (16.5-19.5 dextrose equivalent) and 3 % sucroesters, in order to ensure good

encapsulation and therefore their hydrophilic solubility.

The product was formulated either with or without DPs, and with maltodextrin with the same dextrose equivalent, or with maltodextrin and sucroesters. Interaction mechanisms during digestion were studied thanks to products with added standards of β -sitosterol (Supelco/Sigma-Aldrich, USA) and cholesterol (Sigma-Aldrich, France). The final products were kept frozen and in darkness at -20 °C until analysis.

2.2. Fat-soluble compound analysis

The carotenoids, phytosterols and tocopherols of the yogurt-like product were analyzed by a single analysis method UPLC-DAD-FLD with an UPLC –1290 System Infinity II (Agilent, USA) according to Gies et al. (2019). Briefly, 1 g of product was saponified and extracted twice with n-hexane. Hexanic phases were evaporated under nitrogen and dissolved in 1 mL of a MTBE/methanol solution (4:1, v: v) before injection into the UPLC system.

Carotenoid extraction from digested samples was performed as previously described by

Dhuique-Mayer et al. (2018). An aliquot of 10 mL of the micellar phase from a digested sample was extracted 3 times with 10 mL of hexane and 5 mL of ethanol containing 150 μ L of β -apo-8'-carotenal as an internal standard. The pooled hexane extracts were evaporated and dissolved in 500 μ L of MTBE/methanol (4:1; v:v). Samples were injected according to the UPLC conditions described below.

The column used was a C30 YMC (150 x 4.6 mm; 3 μ m) (YMC Europe GMBH, Germany). Mobile phases were methanol as eluant A, water as eluant B and MTBE as eluant C, set at 1.5 and 1 mL/min flow rate for carotenoids/phytosterols/tocopherols and cholesterol respectively. The gradient used to separate carotenoids, phytosterols and tocopherols was the following: 0-1.5 min [60 % A, 40 % B]; 1.5-3 min [80 % A, 20 % B]; 3-12.5 min [80 % A, 5 % B, 15 % C]; 12.5-15 min [15 % A, 85 % C]; 15-17 min [100 % A] and back to the initial conditions for re-equilibration. The other gradient used for cholesterol was: 0-1 min [60 % A, 40 % B]; 1-1.5 min [80 % A, 20 % B]; 1.5-3 min [80 % A, 5 % B, 15 % C]; 3-25 min [65 % A, 5 % B, 30 % C]; 25-27.7 min [15 % A, 85 % C]; 27.7-30 min [100 % A] and back to the initial conditions for re-equilibration. The column temperature was 20 °C and the injection volume was set between 10 μ L and 40 μ L. Detection was set at 210 nm (DAD) for phytosterols and cholesterol, 450 and 470 nm (DAD) for carotenoids. Fluorescence detection (FLD) for tocopherols was set at 296 nm (excitation) and 330 nm (emission). Quantification was achieved using the external calibration curve of Bc, β -cryptoxanthin, lycopene, α/γ -tocopherol standards (Extrasynthese, France) and β -sitosterol standard (Supelco, USA).

2.3. *In vitro* digestion model

The *in vitro* digestion model was previously described by Reboul et al. (2006). The model developed by Reboul et al. (2006) had been validated against human studies and was considered to be a reliable model for

carotenoid behavior during *in vitro* digestion (Etcheverry, Grusak, et Fleige 2012). 15 g of product samples were mixed in 32 mL of saline solution (NaCl 0.9 %) and submitted to the *in vitro* digestion model according to Dhuique-Mayer et al. (2016). To mimic the gastric digestion phase, the pH was adjusted to 4.0 and 2 mL of pepsin were added before incubating the mixture at 37 °C for 30 min. To mimic the duodenal phase, the pH of the gastric mixture was raised to 6.0. Then, 9 mL of a solution containing porcine pancreatin (2 mg/mL) and porcine bile extract (12 mg/mL) in 100 mmol/L trisodium citrate were added, as well as 4 mL of porcine bile extract (0.1 g/mL) and 1 mL of cholesterol esterase (10 mg 32 U/mL in 6 mL of distilled water). Samples were subsequently incubated in a shaking water bath at 37 °C for 30 min to finish the digestion process. Micelles were separated by centrifugation at 48 000 g for 4 h at 10 °C using an Aventi JE rotor JA-20 (Beckman-coulter, USA), and the aqueous fraction was collected and filtered through a 0.20 μ m filter (Whatman, U.K.). Aliquots were stored at -20 °C until analysis.

The maltodextrin and the sucroesters (as used in the commercial DPs with 10 % maltodextrin and 3 % sucroesters) were added to 15 g of the product before starting the *in vitro* digestion process. Maltodextrin (dextrose equivalent 16.5-19.5) was purchased from Sigma-Aldrich (France), while sucroesters (E473) were purchased from Louis François (France). β -sitosterol or cholesterol standards (Sigma-Aldrich, France) were solubilized in tetrahydrofuran (THF) at 0.25g/mL and 0.05g/mL respectively and were also added before *in vitro* digestion of the product according to the experiment.

2.4. Mixed micelle size

The size of mixed micelles from the micellar phase was measured at 25 °C using the photon correlation spectroscopy analysis (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, UK).

2.5. Measurement of fat-soluble compound uptake by intestinal cells

Caco-2 clone TC7 cells were a gift from Dr. M. Rousset (U178 INSERM, Villejuif, France). Culture cell conditions were performed according to Gence et al. (2018) with minor modifications. Briefly, cells were maintained in DMEM supplemented with 20 % heat-inactivated fetal bovine serum, 1 % non-essential amino acid, 1 % streptomycin, and 2 % L-glutamine. For each experiment, cells were sowed at a density of 5×10^5 cells/25 cm² flask (Becton Dickinson, le Pont-de Chaix, France) for 21 days to obtain confluent differentiated cell monolayers. Carotenoid-rich micelles derived from the *in vitro* digestion were used at 1:4. At the beginning of each experiment, cell monolayers were washed with 2 mL of phosphate buffered saline (PBS). Cell monolayers were incubated with 7 mL of diluted micelles for 2h at 37 °C. Media and cells were collected after the incubation period. Cell monolayers were collected in 2 mL of PBS. Note that for cholesterol measurement, a control without any incubation of micelles was used as a reference. All samples were stored at -80 °C under nitrogen before carotenoid extraction. HPLC analysis was carried out as reported by Gence et al. (2018). Cholesterol and β -sitosterol were detected at 210 nm and identified by comparison with pure standards.

2.6. Statistical analyses

Data were analyzed statistically using one-way analysis of variance (ANOVA) in order to determine significant differences ($p < 0.05$). Tukey's multiple comparison method was used as a post-hoc test to further compare means together.

3. Results and discussion

3.1. Fat-soluble compound content of the fermented maize yogurt-like product

Carotenoid, tocopherol and β -sitosterol contents of the fermented yogurt-like product are reported in Table 1. The three main

carotenoids, which were Bcx, Bc and Lyc, came from papaya and melon extracts. They represented a total carotenoid content of 26.3 ± 0.8 mg/kg, Bc being the major provitamin A carotenoid. α -tocopherol and γ -tocopherol (provided by maize and fruits) content were of 3.8 ± 0.1 mg/kg. This is equivalent to 4 % of the Recommended Daily Allowance, which is low, but valuable for their antioxidant role, both *in vitro* for the product stability and *in vivo* for the organism. The added DPs, represented 1.68 g/100 g available portion, the same as the minimum recommended intake of 1.6 g/day to display a cholesterol-lowering effect (Marangoni et Poli 2010; Chen, McClements, et Decker 2013a; Shahzad et al. 2017). *In fine*, this product provided a functional balance between carotenoids and phytosterols, necessary to induce a cholesterol-lowering effect without a detrimental effect on carotenoids (Noakes et al. 2002)

Table 8 : Fat-soluble compound contents of the fermented maize yogurt-like product

Phytochemicals	Content/kg	Content/serving portion
Carotenoids	mg/kg	mg/125 g portion
β -cryptoxanthin	1.90 ± 0.04	
β -carotene	14.55 ± 0.45	3.29 ± 0.10
Lycopene	9.85 ± 0.32	
Tocopherols	mg/kg	mg/125 g portion
α -tocopherol	1.53 ± 0.05	0.48 ± 0.04
γ -tocopherol	2.28 ± 0.06	
Phytosterol	g/kg	g/125 g portion
β -sitosterol	16.84 ± 0.46	2.11 ± 0.06

Values are means of 3 independent determinations \pm standard deviation (SD)

3.2. Bioaccessibility of fat-soluble compounds in the fermented maize yogurt-like product

The bioaccessibility of β -cryptoxanthin, β -carotene, lycopene, β -sitosterol, α -tocopherol and γ -tocopherol was studied in this product (Figure 1). Carotenoid bioaccessibilities were ranked as follows: 29.9 ± 3.0 % (Bcx), 28.0 ± 0.5 % (Bc) and 5.5 ± 0.5 % (Lyc), according

to this order $Bcx \geq Bc > Lyc$ in agreement with the literature (Kopeck et Failla 2018). Indeed, it is known that efficiency of carotenoid micellarization is positively correlated with their hydrophilicity. Because of their presence in the food matrix, tocopherol bioaccessibility was also evaluated. Since their bioaccessibility was high (94-100%), interactions with other fat-soluble compounds were unlikely. Although tocopherol bioaccessibility could be variable among dietary sources and processes, the present study was in agreement with previous studies (Reboul, Richelle, et al. 2006; F Granado-Lorencio et al. 2007; Cilla et al. 2012).

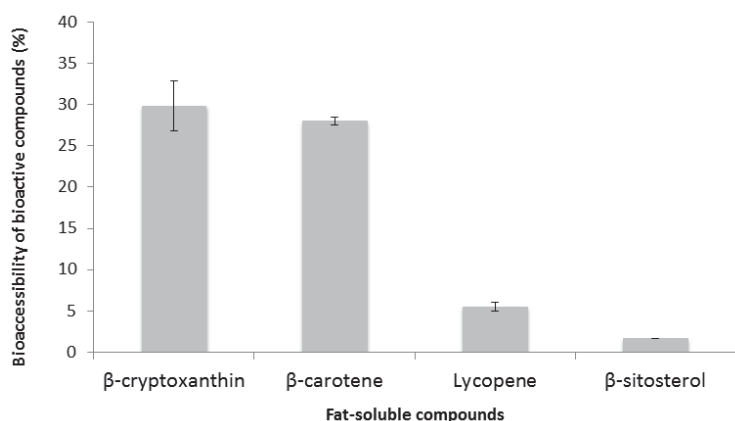


Figure 1: Bioaccessibility of fat-soluble compounds in the functional product

It is interesting to underline that the β -sitosterol bioaccessibility was very low, with only 1.6 ± 0.3 %. This result suggested that a very slight fraction of β -sitosterol added in the formulation was micellarized. This result was confirmed by measuring the β -sitosterol content in the micellar phase, the aqueous phase and the pellets after *in vitro* digestion. It represented 0.22 mg/mL; 2.56 mg/mL and 31.4 mg/mL respectively in these fractions.

It was supposed that a high amount of β -sitosterol was not micellarized because of the vehicle of DPs (mainly maltodextrin), and consequently not micellarized. Anyway, in this case, this low β -sitosterol micellarization (1.6 %) represented approximately 34 mg of bioaccessible β -sitosterol/125 g serving

portion, sufficient to obtain a cholesterol-lowering effect. Alemany et al. (2013) and Garcia-Llatas et al. (2015) also used microencapsulated phytosterols and observed low micellarization (from 2.9 to 6.4 %) of the added phytosterols in milk-based fruit beverages. These authors reported that the presence of Bcx seemed to decrease the sitosterol bioaccessibility in milk-based fruit beverages, supposing an interaction between carotenoids and phytosterols for incorporation into mixed micelles. Differences between micro or nano-encapsulation and types of carriers of bioactive encapsulated compounds could have an influence on fat-soluble compound bioaccessibility (Soukoulis & Bohn, 2018).

3.3. Effect of DPs and their vehicles on carotenoid bioaccessibility

In order to better understand how these DPs influence carotenoid bioaccessibility, four products were compared: two products, with and without DPs, and two products with the vehicles of encapsulation mainly represented by maltodextrin, either with maltodextrin alone at 10 % or maltodextrin associated with sucroesters at 10 %-3 % (Figure 2A and 2B).

Surprisingly, the bioaccessibility of both Bc and Lyc significantly ($p < 0.05$) increased by 40.2 ± 1.4 % in the presence of added DPs as represented on Figure 2. Similarly, carotene bioaccessibility also increased in the presence of maltodextrin alone. Maltodextrin is a polysaccharide produced from partial hydrolyzed starch and currently used as an encapsulating agent of fat-soluble compounds (Medeiros et al. 2019). It is used during the spray-drying of high carotenoid content extracts, and it is known to have properties such as low viscosity and coating capacity, which can also stabilize emulsions (Parikh, Agarwal, et Raut 2014). Some authors reported that bioaccessibilities of spray-dried carotenoids encapsulated with maltodextrin increased significantly (Montero et al. 2016; Kyriakoudi et Tsimidou 2018). Therefore, in our study, maltodextrin, added with DPs,

significantly increased the bioaccessibility of carotenes.

Conversely, the bioaccessibility of Bcx, of which the concentration was low so it represented a minor provitamin A carotenoid in this product, decreased by 19 and 24 % when DPs or maltodextrin respectively were added. This different behavior between carotene and xanthophyll (oxygenated forms) bioaccessibility was probably due to xanthophyll hydrophilicity. It is thought that xanthophylls (as Bcx) are located on the surface of the lipid droplets whereas apolar carotenes (such as Bc or Lyc) are solubilized in the core of lipid droplets (Patrick Borel et al. 1996). Maltodextrin and its emulsifying properties appeared to have a lower effect on Bcx bioaccessibility than on Bc, which is less polar. However, the bioaccessibility of carotenoids in the product with the maltodextrin alone were not significantly different ($p < 0.05$) from the bioaccessibility of carotenoids in the product containing DPs.

The same experiment on the product without DPs but containing maltodextrin associated with sucroesters, reduced the vehicle effect for Bcx but maintained it for carotenes. The addition of sucroesters seemed to reduce the difference between carotenoid bioaccessibility from the product with DPs and that from the product with vehicles (Figure 2B). Therefore, it seemed that sucroesters, which are known to decrease carotenoid bioaccessibility, counteracted the maltodextrin effect (Grune et al. 2010). This second experiment didn't reveal any significant difference ($p < 0.05$) between bioaccessibility of carotenoids in the product containing DPs and the product with the encapsulation excipients. Together, these results suggested that the bioaccessibility of carotenes in the product with DPs was enhanced by the vehicles of DPs used for encapsulation (mainly maltodextrin). Indeed, the competition for absorption during digestion between carotenes and phytosterols seemed to be avoided in these conditions.

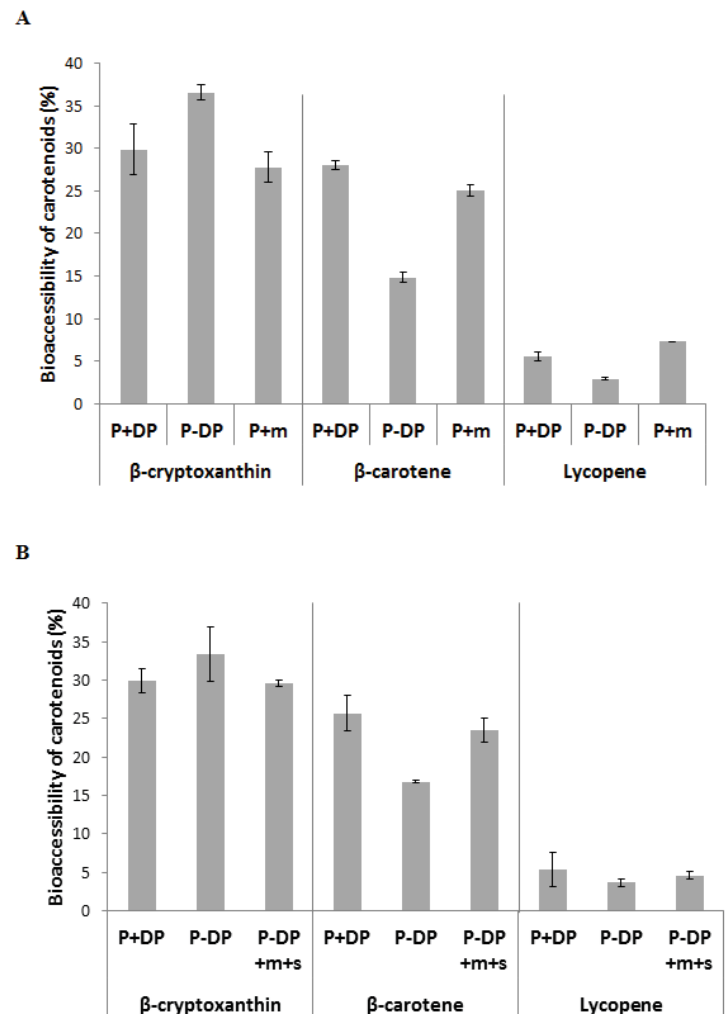


Figure 2: A) Carotenoid bioaccessibility of the functional Product (P) with and without Dispersible Phytosterols (+/- DP) and with maltodextrin vehicle (+m) B) Carotenoid bioaccessibility of the functional Product (P) with and without dispersible phytosterols (+/- DP) and with maltodextrin and sucroester vehicle (+m+s)

Maltodextrin is known to be a fat-replacer in the food industry and can be used as a fat-like gel (Hofman, van Buul, et Brouns 2016). It was thus possible that maltodextrin could enhance the micellarization of the most apolar carotenoids. After digestion of the product, the average diameter of particle size in the aqueous phase was of 51 nm while the mean diameter of the product without DPs measured 189 nm. These results suggested that maltodextrin could contribute to the formation of nanoemulsion systems with oil-in-water interfaces, efficient in enhancing carotenoid

solubility or bioaccessibility (Liang et al. 2013).

To better understand the role of the vehicles and their interaction between DPs and carotenoids, *in vitro* digestion of the product with added free β -sitosterol, without encapsulation, was investigated. Figure 3 shows that the bioaccessibility of Bcx and Bc decreased by 32 and 23 % respectively when the product contained free β -sitosterol. Therefore, free β -sitosterol affected the micellarization of Bcx and Bc, while Lyc micellarization was not impacted. Interestingly, the bioaccessibility of free β -sitosterol was 11.8 % compared to the dispersible β -sitosterol (1.6 %). This last result showed that β -sitosterol without an excipient was more easily micellarized, which induced a detrimental effect on all types of carotenoid bioaccessibility. This is in agreement with several human studies reporting that free or esterified (emulsion form, associated with lipids) phytosterols decreased plasma concentrations of carotenoids and/or tocopherols (Noakes et al. 2002; Richelle et al. 2004).

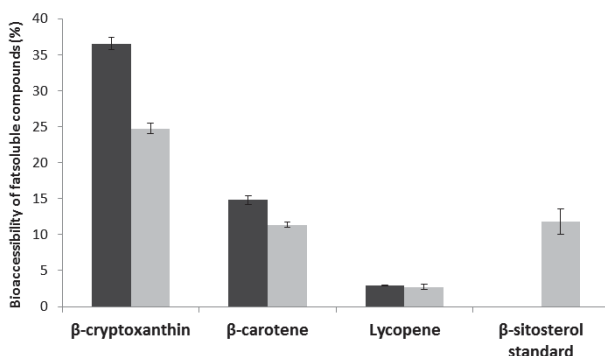


Figure 3: Carotenoid bioaccessibility of the functional Product (P) without Dispersible Phytosterols containing standard β -sitosterol; ■ P-DP; ■ P-DP + Bsit

3.4. Impact of DPs on cholesterol micellarization during *in vitro* digestion

In order to assess the effect of DPs on cholesterol micellarization, the yogurt was submitted to *in vitro* digestion with added cholesterol (Figure 4).

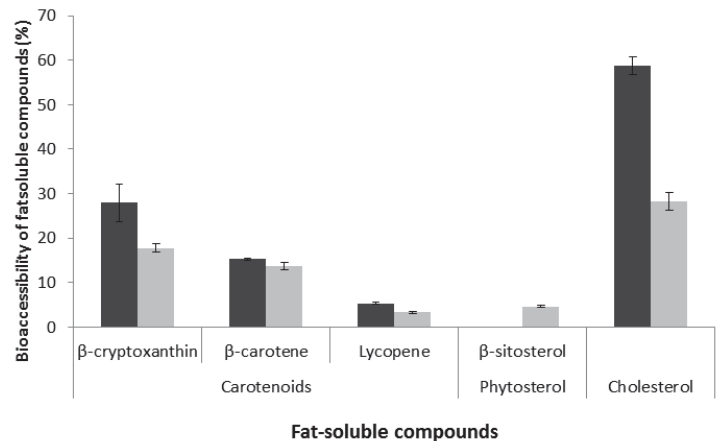


Figure 4: Carotenoid bioaccessibility of the functional Product (P) with or without Dispersible Phytosterols in presence of standard cholesterol; ■ P-DP + chol; ■ P+DP + chol

The reduction in the micellarization of cholesterol was more than 50 %. DPs used in our formulation had therefore a potential cholesterol-lowering effect. Beside this effect, carotene micellarization was not affected by DPs whereas the bioaccessibility of Bcx decreased from 28 % to 18 %. Although Bcx bioaccessibility was also affected by DPs in presence of cholesterol, it represented only 7 % of the total carotenoid content of our product and was half provitaminic A. Nevertheless, using *in vitro* and *in vivo* studies, Fernando Granado-Lorencio et al. (2011) showed that Bcx bioavailability was not affected by the presence of water-dispersible microencapsulated phytosterols, but the vehicle of encapsulation was not mentioned. Conversely, Hernández-Alvarez et al. (2016) observed that the bioaccessibility of Bcx decreased while phytosterol bioaccessibility increased after the *in vitro* digestion of a dairy beverage enriched in milk fat globule membrane. They highlighted the competitive effect between Bcx and phytosterols for incorporation into micelles. However, they did not find a similar trend in human serum. Additionally, in a recent human study, Bcx seemed to enhance the cholesterol-lowering effect of DPs and to improve the lipid profile (F. Granado-Lorencio, Lagarda, et al. 2014).

A recent meta-analysis study concluded that plant sterol intake decreased plasma concentrations of carotenoids and affected oxygenated carotenoids in different ways (Baumgartner et al. 2017). In this review based on 41 trials, Bcx content in plasma was impacted less than the carotene ones, underlining their different behaviors.

In our study, we observed the opposite behavior for Bcx, because this carotenoid was more affected by the presence of DPs. However, in these meta-analyses data, the vehicles of the DPs were not considered or discussed, and it could be a critical point influencing carotenoid absorption. Nevertheless, Amir Shaghghi, Harding, et Jones (2014) highlighted that DPs did not affect fat-soluble vitamins or carotenoids in plasma of moderately hypercholesterolemic subjects; the vehicle used was a polysorbate emulsifier and the carotenoids tested were carotenes and lutein but not Bcx. Note that *in vivo* studies reflect carotenoid serum levels, while *in vitro* studies analyze carotenoid bioaccessibility by evaluating the available fraction for enterocytes. Thus, our results underlined the essential role of the phytosterol vehicles incorporated in a functional food. Therefore, the cholesterol-lowering efficacy of DPs in this product was demonstrated, without a detrimental effect on carotenes.

3.5. Carotenoids and β -sitosterol/cholesterol uptake by Caco-2 cells exposed to micelles generated from *in vitro* digestion

To investigate any potential effect of DPs on intestinal carotenoid uptake, differentiated Caco-2 cells were exposed to micelles generated from *in vitro* digestion of the products with and without DPs. The provitamin A carotenoids, Bcx and Bc, were preferentially absorbed with an average of 16 % vs 7.2 % respectively in comparison to Lyc (Table 2).

Table 2: Cellular uptake of fat-soluble compounds by Caco-2 cells

% UPTAKE	Bcx	Bc	Lyc	β -sitosterol	Cholesterol
P	18.9 ± 2.3 ^c	14.1 ± 1.6 ^{de}	7.2 ± 1.6 ^g	7.9 ± 1.3 ^g	-
P without DP	28.4 ± 2.4 ^a	21.3 ± 0.7 ^{bc}	10.4 ± 1.8 ^{ef}	-	-
P + chol	18.5 ± 0.8 ^{cd}	18.2 ± 0.6 ^{cd}	9.21 ± 1.9 ^g	5.8 ± 0.4 ^h	0
P without DP + chol	24.9 ± 0.2 ^{ab}	25.4 ± 1.5 ^{ab}	12.31 ± 1.8 ^{ef}	-	2.1 ± 0.4 ⁱ

Values are means of 3 independent determinations ± standard deviation (SD)

Means with the same superscript (a–b) do not differ significantly (Tukey test, p -value \leq 0.05)

Moreover, carotenoid uptake was significantly higher ($p < 0.05$) with micelles issued from *in vitro* digestion of the product without DPs. These results can be explained by the relationship between uptake and micelle size. Indeed, the size of mixed micelles formed during the *in vitro* digestion experiments was measured (Table 3).

Table 3: Size of mixed micelles after the *in vitro* digestion of different products

	Size (mean radius, nm)	
	Mean	SEM
P	9.41 ^b	0.20
P without DP	8.33 ^c	0.20
P without DP + vehicles	10.61 ^a	0.24

P: Product; DP: Dispersible Phytosterols; vehicles: maltodextrin/sucroesters (10/3%)

Means with the same superscript (a–b) do not differ significantly (Tukey test, p -value \leq 0.05)

The presence of the vehicles (maltodextrin/sucroesters) with or without phytosterols significantly ($p < 0.05$) modified the size of the micelles. Thus, micelles without phytosterols presented a mean radius (8.33 nm) smaller than those with the vehicles (9.41 nm for P and 10.61 nm for P without DP). The smaller-sized micelles seemed to be taken up better by intestinal cells. Moreover, the higher uptake of carotenoids obtained from digestion of the product without phytosterols could be explained by a mechanism involved in the regulation of intestinal transporters. Indeed, the uptake of carotenoids and phytosterols by enterocyte could be facilitated by the same transporter such as NPC1L1 or SR-BI and

consequently, carotenoids could compete with phytosterols for binding to these transporters (Reboul 2013; Gleize et al. 2016; Nakano, Inoue, et Murakoshi 2019). We performed the same experiments with the addition of cholesterol in order to observe the ability of DPs to reduce cholesterol accumulation by intestinal Caco-2 cells. A slight decrease of cholesterol uptake was observed when DPs were present in mixed micelles (~2 %). However, in our study, the ratio of cholesterol to plant sterol was 1:2.5 while the ratio used in human studies is near to 1:5 corresponding to a dietary cholesterol intake of 300-400 mg/day (Bohn et al. 2007). The supplementation of 1.5-2g of phytosterols reduced by 7 % the cholesterol intake (300 mg) in human studies. Finally, a decrease was observed for the uptake of β -sitosterol when cholesterol was present, from 7.9 % to 5.8 %.

4. Conclusion

This study resulted in a better understanding of the role of DP vehicles on carotenoid bioaccessibility and uptake by Caco-2 cells of a functional cereal-fermented food. Our results showed that carotene bioaccessibility -or solubilization in aqueous phase during digestion- was improved by the vehicle of DPs, i.e. maltodextrin associated with sucroesters. Moreover, these DPs, incorporated in the functional fermented food, were able to induce a potential cholesterol-lowering effect by decreasing cholesterol micellarization without having a detrimental effect on carotene bioaccessibility. Despite a slight decrease in carotenoid uptake caused by the DP vehicle related to micelle size, an inhibition of cholesterol accumulation by Caco-2 cells was observed. Together, our findings underlined the key role of the vehicle of the phytosterols on carotenoid micellarization and Caco-2 cell uptake. Our results supported the use of DPs encapsulated in maltodextrin associated with sucroesters to design functional foods containing natural carotenoids. However, further studies are needed to clarify the specific behavior of Bcx

in the interaction with phytosterols in different food matrices. Finally, dietary intervention studies are needed to validate the efficiency of this functional fermented product in humans, mainly the *in vivo* cholesterol-lowering effect without having a detrimental effect on provitamin A carotenoid bioavailability.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Alemany, Laia, Antonio Cilla, Guadalupe Garcia-Llatas, Maria T. Rodriguez-Estrada, Vladimiro Cardenia, et Amparo Alegría. 2013. « Effect of Simulated Gastrointestinal Digestion on Plant Sterols and Their Oxides in Enriched Beverages ». *Food Research International* 52 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.024>.
- Amir Shaghghi, Mandana, Scott V. Harding, et Peter J.H. Jones. 2014. « Water Dispersible Plant Sterol Formulation Shows Improved Effect on Lipid Profile Compared to Plant Sterol Esters ». *Journal of Functional Foods* 6 (janvier): 280-89. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.10.017>.
- Baumgartner, Sabine, Rouyanne T. Ras, Elke A. Trautwein, Ronald P. Mensink, et Jogchum Plat. 2017. « Plasma Fat-Soluble Vitamin and Carotenoid Concentrations after Plant Sterol and Plant Stanol Consumption: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials ». *European Journal of Nutrition* 56 (3): 909 - 23. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1289-7>.
- Bohn, Torsten, Qingguo Tian, Chureeporn Chitchumroonchokchai, Mark L. Failla, Steven J. Schwartz, Richard Cotter, et Joel A. Waksman. 2007. « Supplementation of Test Meals with Fat-Free Phytosterol Products Can Reduce Cholesterol Micellarization during Simulated Digestion and Cholesterol Accumulation by Caco-2 Cells ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2): 267 - 72. <https://doi.org/10.1021/jf061829l>.
- Borel, Patrick, P Grolier, M Armand, A Partier, H Lafont, D Lairon, et V Azais-Braesco. 1996. « Carotenoids in Biological Emulsions: Solubility, Surface-to-Core Distribution, and Release from Lipid Droplets », 12.
- Chen, Bingcan, David Julian McClements, et Eric Andrew Decker. 2013. « Design of Foods with Bioactive Lipids for Improved Health ». *Annual Review of Food Science and Technology* 4 (1): 35 - 56. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032112-135808>.
- Cilla, Antonio, Amparo Alegría, Begoña de Ancos, Concepción Sánchez-Moreno, M. Pilar Cano, Lucía Plaza, Gonzalo Clemente, María J. Lagarda, et Reyes Barberá. 2012. « Bioaccessibility of Tocopherols, Carotenoids, and Ascorbic Acid from Milk- and Soy-Based Fruit Beverages: Influence of Food Matrix and Processing ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (29): 7282 - 90. <https://doi.org/10.1021/jf301165r>.
- Descalzo, Adriana María, Sergio Aníbal Rizzo, Adrien Servent, Luciana Rossetti, Marc Lebrun, Carolina Daiana Pérez, Renaud Boulanger, Christian Mestres, Dominique Pallet, et Claudie Dhuique-Mayer. 2018. « Oxidative Status of a Yogurt-like Fermented Maize Product Containing Phytosterols ». *Journal of Food Science and Technology* 55 (5): 1859-69. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3102-5>.
- Dhuique-Mayer, Claudie, Adrien Servent, Adriana Descalzo, Claire Mouquet-Rivier, Marie-Josèphe Amiot, et Nawel Achir. 2016. « Culinary Practices Mimicking a Polysaccharide-Rich Recipe Enhance the Bioaccessibility of Fat-Soluble Micronutrients ». *Food Chemistry* 210 (novembre): 182 - 88. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.037>.
- Dhuique-Mayer, Claudie, Adrien Servent, Charlotte Messan, Nawel Achir, Manuel Dornier, et Yery Mendoza. 2018. « Bioaccessibility of Biofortified Sweet Potato Carotenoids in Baby Food: Impact of Manufacturing Process ». *Frontiers in Nutrition* 5 (octobre).

<https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00098>.

Etcheverry, Paz, Michael A. Grusak, et Lisa E. Fleige. 2012. « Application of *in Vitro* Bioaccessibility and Bioavailability Methods for Calcium, Carotenoids, Folate, Iron, Magnesium, Polyphenols, Zinc, and Vitamins B6, B12, D, and E ». *Frontiers in Physiology* 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00317>.

Fardet, Anthony, Anne Morise, Esther Kalonji, Irène Margaritis, et François Mariotti. 2017. « Influence of Phytosterol and Phytostanol Food Supplementation on Plasma Liposoluble Vitamins and Provitamin A Carotenoid Levels in Humans: An Updated Review of the Evidence ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 00-00. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1033611>.

Fernández-García, Elisabet, Irene Carvajal-Lérida, Manuel Jarén-Galán, Juan Garrido-Fernández, Antonio Pérez-Gálvez, et Dámaso Hornero-Méndez. 2012. « Carotenoids Bioavailability from Foods: From Plant Pigments to Efficient Biological Activities ». *Food Research International* 46 (2): 438 - 50. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.007>.

Fiedor, Joanna, et Květoslava Burda. 2014. « Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease ». *Nutrients* 6 (2): 466-88. <https://doi.org/10.3390/nu6020466>.

Garcia-Llatas, Guadalupe, Antonio Cilla, Amparo Alegría, et María Jesús Lagarda. 2015. « Bioavailability of Plant Sterol-Enriched Milk-Based Fruit Beverages: In Vivo and in Vitro Studies ». *Journal of Functional Foods* 14 (avril): 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.023>.

Gence, Laura, Adrien Servent, Patrick Poucheret, Abel Hiol, et Claudie Dhuique-Mayer. 2018. « Pectin Structure and

Particle Size Modify Carotenoid Bioaccessibility and Uptake by Caco-2 Cells in Citrus Juices vs. Concentrates ». *Food & Function* 9 (6): 3523 - 31. <https://doi.org/10.1039/C8FO00111A>.

Gies, Magali, Adriana Maria Descalzo, Adrien Servent, et Claudie Dhuique-Mayer. 2019. « Incorporation and Stability of Carotenoids in a Functional Fermented Maize Yogurt-like Product Containing Phytosterols ». *LWT* 111 (août): 105-10. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.103>.

Gleize, Béatrice, Marion Nowicki, Christophe Daval, Hana Koutnikova, et Patrick Borel. 2016. « Form of Phytosterols and Food Matrix in Which They Are Incorporated Modulate Their Incorporation into Mixed Micelles and Impact Cholesterol Micellarization ». *Molecular Nutrition & Food Research* 60 (4): 749-59. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500586>.

Granado-Lorencio, F., M.J. Lagarda, F.J. Garcia-López, L.M. Sánchez-Siles, I. Blanco-Navarro, A. Alegría, B. Pérez-Sacristán, et al. 2014. « Effect of β -Cryptoxanthin plus Phytosterols on Cardiovascular Risk and Bone Turnover Markers in Post-Menopausal Women: A Randomized Crossover Trial ». *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 24 (10): 1090-96. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2014.04.013>.

Granado-Lorencio, F, B Olmedillaalonso, C Herrero barbudo, I Blanconavarro, B Perezsacristan, et S Blazquezgarcia. 2007. « In Vitro Bioaccessibility of Carotenoids and Tocopherols from Fruits and Vegetables ». *Food Chemistry* 102 (3): 641 -48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.043>.

Granado-Lorencio, Fernando, Encarnación Donoso-Navarro, Luis Manuel Sánchez-

Siles, Inmaculada Blanco-Navarro, et Belen Pérez-Sacristán. 2011. « Bioavailability of β -Cryptoxanthin in the Presence of Phytosterols: In Vitro and in Vivo Studies ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (21): 11819 - 24. <https://doi.org/10.1021/jf202628w>.

Grune, Tilman, Georg Lietz, Andreu Palou, A. Catharine Ross, Wilhelm Stahl, Guangweng Tang, David Thurnham, Shi-an Yin, et Hans K. Biesalski. 2010. « β -Carotene Is an Important Vitamin A Source for Humans ». *The Journal of Nutrition* 140 (12): 2268S-2285S. <https://doi.org/10.3945/jn.109.119024>.

Gylling, Helena, Jogchum Plat, Stephen Turley, Henry N. Ginsberg, Lars Ellegård, Wendy Jessup, Peter J. Jones, et al. 2014. « Plant Sterols and Plant Stanols in the Management of Dyslipidaemia and Prevention of Cardiovascular Disease ». *Atherosclerosis* 232 (2): 346-60. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.11.043>.

Gylling, Helena, et Piia Simonen. 2015. « Phytosterols, Phytostanols, and Lipoprotein Metabolism ». *Nutrients* 7 (9): 7965-77. <https://doi.org/10.3390/nu7095374>.

Hernández-Alvarez, E., I. Blanco-Navarro, B. Pérez-Sacristán, L.M. Sánchez-Siles, et F. Granado-Lorencio. 2016. « In Vitro Digestion-Assisted Development of a β -Cryptoxanthin-Rich Functional Beverage; in Vivo Validation Using Systemic Response and Faecal Content ». *Food Chemistry* 208 (octobre): 18 - 25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.119>.

Hofman, Denise L., Vincent J. van Buul, et Fred J. P. H. Brouns. 2016. « Nutrition, Health, and Regulatory Aspects of Digestible Maltodextrins ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56 (12): 2091-2100.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2014.940415>.

Jomova, Klaudia, et Marian Valko. 2013. « Health Protective Effects of Carotenoids and Their Interactions with Other Biological Antioxidants ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 70 (décembre): 102 - 10. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.054>.

Kopec, Rachel E., et Mark L. Failla. 2018. « Recent Advances in the Bioaccessibility and Bioavailability of Carotenoids and Effects of Other Dietary Lipophiles ». *Journal of Food Composition and Analysis* 68 (mai): 16-30. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.06.008>.

Kyriakoudi, Anastasia, et Maria Z. Tsimidou. 2018. « Properties of Encapsulated Saffron Extracts in Maltodextrin Using the Büchi B-90 Nano Spray-Dryer ». *Food Chemistry* 266 (novembre): 458-65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.038>.

Liang, Rong, Charles F. Shoemaker, Xiaoqing Yang, Fang Zhong, et Qingrong Huang. 2013. « Stability and Bioaccessibility of β -Carotene in Nanoemulsions Stabilized by Modified Starches », no 61: 1249-1257. <https://doi.org/10.1021/jf303967f>.

Marangoni, Franca, et Andrea Poli. 2010. « Phytosterols and Cardiovascular Health ». *Pharmacological Research* 61 (3): 193-99. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.01.001>.

Medeiros, Anny Karoliny de Oliveira Cavalcanti, Camila de Carvalho Gomes, Mary Louize Querino de Araújo Amaral, Luciana Daniela Gurgel de Medeiros, Isaiane Medeiros, Dayanne Lopes Porto, Cícero Flávio Soares Aragão, Bruna Leal Lima Maciel, Ana Heloneida de Araújo Moraes, et Thais Souza Passos. 2019. «

Nanoencapsulation Improved Water Solubility and Color Stability of Carotenoids Extracted from Cantaloupe Melon (*Cucumis Melo L.*) ». *Food Chemistry* 270 (janvier): 562-72.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.099>.

Montero, P., M.M. Calvo, M.C. Gómez-Guillén, et J. Gómez-Estaca. 2016. « Microcapsules Containing Astaxanthin from Shrimp Waste as Potential Food Coloring and Functional Ingredient: Characterization, Stability, and Bioaccessibility ». *LWT - Food Science and Technology* 70 (juillet): 229 - 36. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.040>.

Nakano, Takanari, Ikuo Inoue, et Takayuki Murakoshi. 2019. « A Newly Integrated Model for Intestinal Cholesterol Absorption and Efflux Reappraises How Plant Sterol Intake Reduces Circulating Cholesterol Levels ». *Nutrients* 11 (2): 310.

<https://doi.org/10.3390/nu11020310>.

Noakes, Manny, Peter Clifton, Fady Ntanos, William Shrapnel, Ian Record, et Jenny McInerney. 2002. « An Increase in Dietary Carotenoids When Consuming Plant Sterols or Stanols Is Effective in Maintaining Plasma Carotenoid Concentrations ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 75 (1): 79 - 86. <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.1.79>.

Parikh, Aakash, Siddharth Agarwal, et Kirtesh Raut. 2014. « A REVIEW ON APPLICATIONS OF MALTODEXTRIN IN PHARMACEUTICAL INDUSTRY ». *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 4 (4): 8.

Reboul, Emmanuelle. 2013. « Absorption of Vitamin A and Carotenoids by the Enterocyte: Focus on Transport Proteins ». *Nutrients* 5 (9): 3563 - 81. <https://doi.org/10.3390/nu5093563>.

Reboul, Emmanuelle, Myriam Richelle, Eloïse Perrot, Christiane Desmoulin-Malezet, Victor Pirisi, et Patrick Borel. 2006. « Bioaccessibility of Carotenoids and Vitamin E from Their Main Dietary Sources ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (23): 8749 - 55. <https://doi.org/10.1021/jf061818s>.

Richelle, Myriam, Marc Enslem, Corinne Hager, Michel Groux, Isabelle Tavazzi, Jean-Philippe Godin, Alvin Berger, et al. 2004. « Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption.pdf ». *Am J Clin Nutr*, 2004, sect. 80.

Rudkowska, Iwona, Suhad S. AbuMweis, Catherine Nicolle, et Peter J.H. Jones. 2008. « Cholesterol-Lowering Efficacy of Plant Sterols in Low-Fat Yogurt Consumed as a Snack or with a Meal ». *Journal of the American College of Nutrition* 27 (5): 588 -95.

<https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719742>.

Shahzad, Naiyer, Wajahatullah Khan, Shadab Md, Asgar Ali, Sundeep Singh Saluja, Sadhana Sharma, Faisal A. Al-Allaf, et al. 2017. « Phytosterols as a Natural Anticancer Agent: Current Status and Future Perspective ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 88 (avril): 786 - 94. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.068>.

Thomsen, A B, H B Hansen, C Christiansen, H Green, et A Berger. 2004. « Effect of Free Plant Sterols in Low-Fat Milk on Serum Lipid Profile in Hypercholesterolemic Subjects ». *European Journal of Clinical Nutrition* 58 (6): 860-70.

<https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601887>.

Toti, Elisabetta, C.-Y. Oliver Chen, Maura Palmery, Débora Villaño Valencia, et Ilaria Peluso. 2018. « Non-Provitamin A and Provitamin A Carotenoids as Immunomodulators: Recommended

Dietary Allowance, Therapeutic Index, or Personalized Nutrition? » Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2018: 1-20.

<https://doi.org/10.1155/2018/4637861>

3. Optimisation de l'aliment fonctionnel à base de maïs fermenté : qualités sensorielle & nutritionnelle, et capacité antioxydante

3.1. Objectif

Cette troisième partie présente l'optimisation de l'aliment initialement développé, en termes de qualités sensorielle et nutritionnelle. En effet, un produit fonctionnel doit non seulement induire des bénéfices santé mais également être accepté par les consommateurs. Pour ce faire, le lait en poudre a été substitué à des hydrolysats de protéines, à savoir des caséinates et des protéines sériques. Le produit fonctionnel précédemment mis au point contient une petite quantité de lait en poudre demi-écrémé (2,4 %), qui est en fait dérivée de la recette traditionnelle africaine (Sacca *et al.* 2012; Akissoé *et al.* 2015). Mais ce lait, en plus de son apport en lactose, apporte un goût désagréable au produit final, probablement à cause de la production de peptides amers à partir de ses protéines, formés lors de la fermentation lactique et de la pasteurisation. La papaye et le melon apportent sucrosité et arômes, mais aussi des composés antioxydants comme les polyphénols.

Les hydrolysats de protéines, amphiphiles, sont utilisés dans les aliments pour améliorer leurs propriétés organoleptiques. Ils sont en effet connus pour leur pouvoir tampon, et leurs propriétés émulsifiantes. Ils peuvent stabiliser les émulsions et améliorer ainsi la bioaccessibilité de composés liposolubles tels que les caroténoïdes.

Par conséquent, la publication 3 s'est focalisée sur l'optimisation sensorielle et nutritionnelle de cet aliment fermenté à base de maïs, en remplaçant le lait en poudre par des protéines sériques ou des caséinates de sodium dans la formulation.

3.2. Optimisation sensorielle et nutritionnelle d'un aliment fonctionnel à base de céréales fermentées en utilisant des hydrolysats de protéines (PUBLICATION 3)

L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'effet de la substitution du lait en poudre par des isolats de protéines sériques ou des caséinates de sodium sur les qualités organoleptiques de l'aliment et sur la bioaccessibilité des caroténoïdes et du β -sitostérol. La capacité antioxydante de l'aliment a également été évaluée, compte tenu de la possibilité d'interactions entre les protéines et les polyphénols. Les résultats de l'analyse sensorielle

descriptive ont été croisés avec ceux de la bioaccessibilité afin de déterminer la meilleure option de formulation.

Trois aliments ont donc été comparés : l'aliment fonctionnel initial (BP), contenant du lait en poudre, un aliment optimisé contenant des caséinates de sodium (CASP) et un deuxième aliment optimisé formulé avec des protéines sériques (WPIP).

- **Analyse sensorielle, composition en nutriments et capacité anti-oxydante**

Les profils sensoriels de ces trois produits ont été établis sur la base de 9 descripteurs sensoriels sélectionnés au préalable. L'aliment initial BP est le plus acide et amer, mais aussi le plus brillant et homogène. Il obtient cependant la note de qualité globale la plus faible, bien que non-significative, de 5,26/10, contre 6,05 et 6,12 pour CASP et WPIP respectivement. L'amertume de BP peut s'expliquer par la protéolyse des protéines du lait, induisant la formation de peptides. La brillance et l'homogénéité significativement plus élevées ($p < 0,05$) de BP sont également liées à la présence du lait en poudre, et plus spécifiquement à sa teneur en protéines et en lipides (12 % en plus), rendant le produit plus onctueux.

Les hydrolysats de protéines sont capables de tamponner l'acidité perçue en bouche. Ces protéines sont aussi capables de créer des interactions avec les polyphénols (qui sont amers). Ces complexes protéines-polyphénols diminue l'amertume et induisent une teneur en polyphénols libres deux fois plus faible dans WPIP que dans ses homologues. En revanche, sa capacité antioxydante est aussi élevée que celle des autres produits, suggérant que même complexés, les polyphénols sont capables de conserver leurs propriétés antioxydantes. De plus, l'oxydation lipidique semble corrélée à l'absence de fruits dans les échantillons, montrant que la capacité antioxydante des différentes versions testées de l'aliment fonctionnel provient quasiment intégralement des fruits incorporés.

- **Bioaccessibilité des composés liposolubles**

La bioaccessibilité de la β -cryptoxanthine augmente de 26 % dans WPIP comparativement à BP et CASP. Aucune différence significative ($p < 0,05$) n'est observée pour la bioaccessibilité des carotènes provenant de BP ou de WPIP. En revanche, les carotènes de CASP semblent moins bien se micelliser (-26 % pour le β -carotène et -51 % pour le lycopène) que ceux des deux autres produits. Cette différence de bioaccessibilité

pourrait s'expliquer par la taille des gouttelettes lipidiques de l'émulsion formée lors de la digestion. Elle est généralement plus élevée dans les émulsions formées par les caséinates que par les protéines sériques (Yi *et al.* 2014). En effet, plus le diamètre des particules d'une émulsion ou d'une micelle est faible, plus la bioaccessibilité est élevée (Soukoulis et Bohn 2018). La micellisation plus élevée de la β -cryptoxanthine en présence des protéines sériques pourrait être liée à sa structure plus polaire, qui facilite l'incorporation à la surface des micelles mixtes.

Leur pouvoir tampon ainsi que leur capacité à former et à stabiliser des nano-émulsions permettent de conclure que les isolats de protéines sériques sont les hydrolysats de protéines les plus adaptés à l'optimisation de cet aliment fonctionnel. Dans ces conditions, la bioaccessibilité de la β -cryptoxanthine provitaminique A atteint même plus de 41 %.

Cette étude visait à optimiser un produit fonctionnel développé précédemment en termes de propriétés organoleptique et nutritionnelle. Les compositions en micronutriments et en macronutriments définies théoriquement dans la conception de l'aliment fonctionnel initial ont été vérifiées expérimentalement et convergent vers une maîtrise du procédé. Il a également été montré qu'il est possible de guider un procédé de fabrication afin d'obtenir une composition cible, et éventuellement une idée globale de l'aspect sensoriel du produit. Les protéines sériques ont démontré leur capacité à améliorer les propriétés organoleptiques de cet aliment fonctionnel, mais aussi la bioaccessibilité des caroténoïdes ajoutés à cette formulation.

Sensory and nutritional optimization of a functional fermented cereal yogurt-like product

Magali Gies^{a,b}, Adrien Servent^{a,b}, Mariana Soledad Lingua^c, Nelly Forestier-Chiron^{a,b},
Isabelle Maraval^{a,b}, Claudie Dhuique-Mayer^{a,b}

^a CIRAD, UMR Qualisud, F-34398 Montpellier, France

^b Qualisud, Univ. Montpellier, CIRAD, Montpellier SupAgro, Université d'Avignon,
Université de La Réunion, Montpellier, France

^c LCLA EEA Rafaela e Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba (ICYTAC),
CONICET and Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba,
Argentina

*Corresponding author: claudie.dhuique-mayer@cirad.fr

Abstract

Protein hydrolysates are known to have buffering capacity resulting in a decrease of the bitter and sour taste in the mouth. Moreover, they can stabilize emulsions of lipid droplets and increase the bioaccessibility of lipophilic compounds such as carotenoids. For these reasons, a previously developed functional product, based on fermented maize and containing fat-soluble compounds, was optimized by adding sodium caseinates (CAS) and whey protein isolates (WPI) instead of powdered milk. Thanks to their emulsifying properties, WPI produced a significant increase ($p < 0.05$) in β -cryptoxanthin bioaccessibility which reached 41.4 ± 1.2 % while β -carotene and lycopene bioaccessibilities were of 26.1 ± 0.5 and 4.8 ± 1.0 % respectively, with no significant difference to the original product. Conversely, CAS decreased carotene bioaccessibility. The sensory aspect was improved by WPI, associated with a decrease of quantified polyphenols, suggesting an interaction between proteins and polyphenols. The total antioxidant capacity of the product was related to the hydrophilic fraction of polyphenols, and was kept unchanged despite this interaction. Overall this study demonstrated that this functional product can be optimized by managing and guiding the manufacturing process with target compositions. Whey protein isolates were finally the best protein hydrolysates considering sensory and nutritional aspects.

Keywords

Whey protein isolates, sodium caseinates, carotenoid bioaccessibility, antioxidant capacity, organoleptic properties

1. Introduction

Functional foods contain bioactive compounds are able to confer beneficial health effects or reduce the risk of diseases (Serafini, Stanzione, and Foddai 2012; Salmerón 2017). Phytosterols are natural ingredients often incorporated into functional foods and recommended to lower LDL-cholesterol level, an admitted risk factor for the development of cardiovascular diseases (Gylling et al. 2014). Phytosterols also have an inhibitory action on lung, stomach, breast and ovarian cancers and their consumption can increase the activity of antioxidant enzymes (Shahzad et al. 2017). Recently it was reported that phytosterols can decrease carotenoid absorption, but this can be offset by increasing fruit carotenoids in food products (Noakes et al. 2002; Fardet et al. 2017; Baumgartner et al. 2017). Moreover, there is an increase in consumer demand for the development of functional products containing phytosterols and other bioactive compounds (Siró et al. 2008). The demand for non-dairy functional foods is increasing too, due to lactose intolerance and the vegan trend, among others (Kandylis et al. 2016). The potential market of functional foods is estimated to reach 192 billion US dollars in 2020 (Kaur and Singh 2017).

For these reasons, in a previous study we developed and standardized a functional fermented yogurt-like product based on maize, containing dispersible phytosterol and enriched with natural carotenoids from fruits (Gies et al. 2019). Moreover, this food presented a nutritional balance between carotenoid and phytosterol contents, with the objective to exhibit a significant cholesterol-lowering effect without any detrimental impact on carotenoid absorption.

However, this functional food needed to be optimized in terms of sensory and nutritional qualities. Enriching functional

foods in carotenoids implies evaluating the bioaccessible fraction of carotenoids, absorbable by the enterocyte. Carotenoid bioaccessibility is the proportion extracted from the food matrix and solubilized in mixed micelles. The *in vitro* digestion procedure represents an effective tool to evaluate the micellar transfer of fat soluble compounds (Bohn et al. 2007). However, micellar transfer depends firstly on emulsification during gastro-duodenal digestion. It has been reported that proteins can stabilize emulsions due to their amphiphilic nature (Lam and Nickerson 2013). Whey protein isolates or sodium caseinates can improve carotenoid bioaccessibility because of their emulsifying properties (Yi et al. 2014; Iddir et al. 2019). After their adsorption to lipid droplet surface, proteins may stabilize emulsions in the gastro-intestinal tract, by reducing the interfacial tension at the oil-water interface (Lam and Nickerson 2013). Moreover, whey proteins and caseinates have already been employed as emulsifiers or bioactive compounds in nanoemulsions (Adjonu et al. 2014; Soukoulis and Bohn 2018).

On the other hand, protein isolates were also used in functional foods to improve sensory quality. Different solutions exist to improve the organoleptic properties of functional foods. Among them, adding proteins, either concentrates or isolates, is a solution to neutralizing the sour taste in the mouth and would therefore create a more pleasant taste of this functional product. Adjonu et al. (2014) also highlighted that it was possible to use sodium caseinates or whey protein isolates to release bioactive peptides from their hydrolysis. Sodium caseinates are composed of different proportions of α S1, β , α S2 and γ caseins. Whey proteins are a mix of several globular proteins such as β -lactoglobulin (~65 %), α -lactalbumin (~25 %), bovine serum albumin (~8 %) and immunoglobulins (~1 %). β -lactoglobulin

and α -lactalbumin are able to adsorb to oil-water interfaces and are good emulsifiers (Yadav et al. 2010). However, these emulsifying properties can change in relation to pH, salt content and heating conditions (Yadav et al. 2010; D. Zhu, Damodaran, and Lucey 2010). Proteins can also be conjugated with polysaccharides and polyphenols, changing various sensory properties of the food (Yadav et al. 2010; Ozdal, Capanoglu, and Altay 2013). It was demonstrated that whey proteins can alkalize an acidic product (Salaün, Mietton, and Gaucheron 2005).

In fine, it is essential that a functional product contains bioactive compounds, such as antioxidants, to preserve the product but also for nutritional aspects. It is known that almost 90 % of the antioxidant intake is obtained by fruits and vegetables in the human diet, mainly from polyphenols, vitamins C, E and A, respectively in the descending order (Landete 2013; Ellong et al. 2015). Among strong antioxidants, phenolic compounds (flavonoids and nonflavonoids) also have health benefits such as anti-inflammatory, cardioprotective, cancer chemo-preventive and neuroprotective properties (Ishiwata et al. 2004; Landete 2013). Indeed, oxidative stress is recognized as a “key phenomenon” in chronic diseases. Moreover, polyphenols can decrease the oxidation of α -tocopherol, i.e vitamin E (Q. Y. Zhu et al. 1999).

2. Material and methods

2.1. Manufacturing process and optimization of the functional product

This functional product based on fermented maize was previously developed and described by Gies et al. (2019). The manufacturing process included soaking, crushing, sieving

The functional product previously developed by our laboratory contained a small amount of semi-skimmed powdered milk (2.4 %) and was derived from a traditional recipe (Gies et al 2019). The presence of milk gave a sour and bitter taste, probably because of the lactic fermentation (acidic pH) and the pasteurization (heating), responsible for the production of bitter peptides from the milk proteins. The papaya and the melon, added to the formulation, are a source of carotenoids and polyphenols and bring sweetness and aromas but also antioxidant compounds. All these bioactive compounds can participate in providing a food product that combines nutritional benefits and a pleasant taste. Consequently, this paper focuses on the sensory and nutritional optimization of this maize-based yogurt-like product, by using whey protein isolates or sodium caseinates in the formulation. Then, the objective of this study was to assess the effect of supplementing the product with whey proteins or sodium caseinates instead of milk, in order to: (1) improve organoleptic properties; (2) evaluate the antioxidant capacity in relationship with protein hydrolysates and polyphenol content and (3) compare carotenoid bioaccessibility. *In fine*, the results of bioaccessibility of the final products were crossed with sensory analysis data to determine the formulation that is the best possible compromise.

and pasteurizing the maize, followed by lactic fermentation with two bacterial starters. Among the added ingredients, the dispersible phytosterols used were encapsulated in maltodextrin (10 %) with a dextrose equivalent between 16.5 and 19.5.

In order to optimize the bioaccessibility of bioactive compounds but also the sensory qualities of the product and avoid the lactose

content, the powdered milk was replaced by protein hydrolysates such as sodium caseinates (Lactalis, France) and whey protein isolates (Lactalis, France). The quantity of each ingredient to be added was calculated in order to obtain the same amount of total proteins in the original product and in the other new formulated products. The products made with powdered milk, sodium caseinates and whey proteins were called Basic Product (BP), CASeinates Product (CASP) and Whey Protein Isolate Product (WPIP) respectively.

2.2. Macronutrient quantification

The composition of the products was assessed in terms of protein, lipid and carbohydrate contents. Proteins were quantified following the Kjeldahl method (AOAC- 2001). Lipid content was obtained using the the Folch extraction procedure (Schäfer 1998). Analysis and separation of soluble sugars were determined by using a UPLC – 1290 System Infinity II (Agilent, USA) equipped with a refractometer detector according to Gies et al. (2019).

Theoretical values of macronutrients were calculated by taking into account the composition on the label of each raw material and their mass balance in the formulation of the products.

2.3. Physico-chemical analyses

Bioactive compound contents such as β -cryptoxanthin, β -carotene, lycopene, β -sitosterol, and α/γ -tocopherols were analysed simultaneously by UPLC-DAD in the three products: BP, CASP and WPIP. The extraction was performed according to Gies et al. (2019). Briefly, 1 g of product was saponified using KOH for 30 min at 70 °C and extracted twice with n-hexane. Hexanic phases were evaporated under nitrogen and dissolved in 1 mL of a MTBE/methanol solution (4:1, v:v) before injection in a UPLC system. A UPLC –1290 System Infinity II (Agilent, USA), with a diode array detector (DAD) and a fluorescence detector (FLD) was used. The column was a C30 YMC (150 x 4.6 mm; 3

μm) (YMC Europe GMBH, Germany) and the method used was described in Gies et al. (2019). All chemicals were of HPLC grade from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, USA). Mobile phases were methanol as eluant A, water as eluant B and MTBE as eluant C, set at 1.5 mL/min flow rate. The gradient used to separate carotenoids, phytosterols and tocopherols was the following: 0-1 min [60 % A, 40 % B]; 1-1.5 min [80 % A, 20 % B]; 1.5-3 min [80 % A, 5 % B, 15 % C]; 3- 12.5 min [15 % A, 85 % C]; 12-13.75 min [15 % A, 85 % C]; 13.75-15 min [100 % A]; 15-17 min [60 % A, 40 % B] and back to the initial conditions for re-equilibration. The column temperature was 20 °C and the injection volume was 10 μL . Detection was set at 210 nm (DAD) for phytosterols, and 450 and 470 nm (DAD) for carotenoids.

2.4. *In vitro* digestion model

The *in vitro* digestion model was previously described by Reboul et al. (2006). The model developed by Reboul et al. (2006) had been validated against human studies and was considered as a reliable model for carotenoid behavior during *in vitro* digestion (Etcheverry, Grusak, and Fleige 2012). 15 g of product samples were mixed in 32 mL of saline solution (NaCl 0.9 %) and submitted to the *in vitro* digestion model according to Dhuique-Mayer et al. (2016). To mimic the gastric digestion phase, the pH was adjusted to 4.0 and 2 ml of pepsin were added before holding the mixture at 37 °C for 30 min. To mimic the duodenal phase, the pH of the gastric mixture was raised to 6.0. Then, 9 mL of a solution containing porcine pancreatin (2 mg/mL) and porcine bile extract (12 mg/mL) in 100 mmol/L trisodium citrate were added, as well as 4 mL of porcine bile extract (0.1 g/mL) and 1 mL of cholesterol esterase (10 mg 32 U/mL in 6 mL of distilled water). Samples were subsequently incubated in a shaking water bath at 37 °C for 30 min to finish the digestion process. Micelles were separated by centrifugation at 48 000 g for 4 h at 10 °C using an Aventi JE rotor JA-20 (Beckman-coulter, USA), and the aqueous fraction was

collected and filtered through a 0.20 μm filter (Whatman, U.K.). Aliquots were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

2.5. Polyphenol content, antioxidant capacity and lipid oxidation

The total polyphenol content (TPC) was analyzed with the Folin-Ciocalteu method, according to Arnous, Makris, and Kefalas (2001). The FRAP method (Ferric Reducing Ability of Plasma) which was used to determine the antioxidant capacity and to analyze the reducing capacity of the food, was performed according to Benzie and Strain (1996). The ABTS method was used to evaluate the capacity to capture free radicals, following Re et al. (1999). It was evaluated for all the samples in triplicate, for the hydrophilic fraction and the total antioxidant capacity (hydrophilic and lipophilic fractions) of the products. The TBARS analysis, which is known to evaluate the lipid oxidation, was employed to quantify the rancidity of the oil fraction. 0.4 g of samples were weighed in Eppendorf tubes. Then 0.4 mL of ethanol/BHT 0.1 % was added. Thereafter, 1 mL of a solution 1:1 v/v of trichloroacetic acid solution/thiobarbituric acid solution (solution of TCA 20 % in 1.6 % metaphosphoric acid; solution of TBA 2.88 g/L in water) was added to each tube. Tubes were then held at $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 45 min and centrifuged at $15\ 500\ \text{g}$ for 10 min. 200 μL of each sample were placed on a plate (Thermo Fisher Scientific, Nunclon Delta Surface "U") to measure their absorbance with a Spark 10M plate spectrophotometer reader (Tecan, France) at 532 nm. In parallel, samples for the calibration curve were realized between 0 et 0.01 μM of 1,1,3,3-tetramethoxypropane.

TPC, ABTS and TBARS were determined on BP, WPIP, a BP with only fruits (BPf) and BP with only dispersible phytosterols (BPp). These analyses were carried out in order to understand the role of the fruits in relation to the antioxidant properties of the product. CASP was not analyzed because it was assumed that caseinates had no impact on antioxidant capacity.

2.6. Sensory analysis

The products were evaluated and characterized by a panel from CIRAD, composed of 12 trained assessors (5 women, 7 men, of an average age of 47), during a quantitative descriptive test and a ranking test. First of all, the descriptors were generated by the assessors and the panel was trained before the tastings, using agreed standard procedures to familiarize them with the selected descriptors. Finally, after the training sessions, 18 descriptors were selected and defined in order to evaluate the differences provided by the three formulations: visual (homogeneity, brightness), odor (green, fruity, fermented), savor (sour, bitter), impression in the mouth (lumpy, astringency), texture in the mouth (smooth, rough) and aromas (fruity, melon, exotic fruits, fermented, roasted, green, spicy). A structured discrete scale from 0 (none) to 10 (high intensity) was used to rate the sensory attributes. The overall quality was also noted. It represents the overall objective judgment of the sample. It considers all the sensory elements, the presence of atypical flavors and their importance as well as particular characteristics.

The sensory evaluation was performed in duplicate. 10 g of samples were randomly presented in monadic mode with a 3-digit anonymous code. Samples were served at $23.1 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, and the room temperature and humidity were at $22.4 \pm 0.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 26 %, respectively.

At the end of the test, each jury was called to classify the three products from the most preferred to the least preferred. This test was carried out to collect data on the global taste evaluation of consumers.

2.7. Statistical analyses

Data were analyzed statistically using one-way analysis of variance (ANOVA) in order to determine significant differences ($p < 0.05$). Tukey's multiple comparison method was used to further examine any significant difference between results.

3. Results and discussion

3.1. Sensory analysis

The three products BP, CASP, and WPIP were tasted and then compared in order to determine the differences in their organoleptic characteristics. The analysis of the results led to 9 discriminating descriptors being retained out of the 18 proposed: homogeneity, brightness, green and fruity odor, sour and bitter, smooth and rough for the texture and only 'melon' for fruit aroma. Indeed, the other descriptors were not significantly different ($p < 0.05$) between the three products. These non-discriminating descriptors were: fermented odor (4.6 ± 0.6), lumpy impression (3.8 ± 0.5), astringent impression (2.2 ± 0.4), fruity aroma (6.0 ± 0.5), exotic fruits aroma (3.7 ± 0.3), fermented aroma (4.1 ± 0.7), roasted aroma (1.7 ± 0.1), green aroma (5.7 ± 0.6) and spicy aroma (1.2 ± 0.4). As shown in Figure 1, BP was the most homogenous, bright, fruity and smooth, but also the most sour and bitter. For these last reasons, its global quality was the lowest, with a note of 5.26 ± 1.24 on a scale of 10. Indeed, even if the acidity allowed the release of fruity odors, the sour taste prevailed. The bitterness of BP could be attributed to peptides, produced by the protein hydrolysis during fermentation, which is linked to their amino acid composition (Suárez-Estrella et al. 2018). Bitterness could also be due to the phenols coming from fruits (Drewnowski and Gomez-Carneros 2000). Antioxidant phytochemicals, such as phenols or hydrolysable tannins (e.g. pentagalloylglucose, malvidin-3-glucoside, etc.), can be present in small quantities in a product but can induce a strong bitter taste. This phenomenon is due to human sensory capacities, which can detect bitter compounds in micromolar amounts (Drewnowski and Gomez-Carneros 2000; Soares et al. 2013). The sourness was related to the production of different kinds of acids by bacteria during the fermentation of the maize and fruits (Mcfeeters 2004). CASP and WPIP appeared more balanced in terms of sourness, with a global quality of 6.05 ± 1.36 and 6.12 ± 0.99

respectively, without any significant ($p < 0.05$) difference. Therefore, CASP and WPIP had a slightly better global quality than BP. However, BP was sourer ($p < 0.05$) than CASP and WPIP, with scores of 6.5, 5.2 and 3.7 respectively.

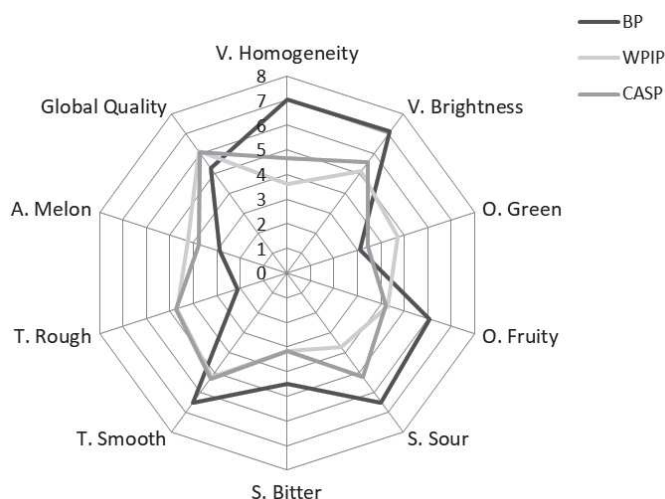


Figure 1: Radar data of discriminant descriptors from sensory analysis on the three products; V: visual; O: odor; S: savor; T: texture; A: aroma

Caseinates and especially whey proteins are known to reduce the pH perception in the mouth, acting like buffers (Salaün, Mietton, and Gaucheron 2005). Authors showed that acidification can also be related to heat treatment > 90 °C which induced a decrease in the pH due to lactose degradation (50 %), casein dephosphorylation (30 %) and calcium phosphate precipitation (20 %). While maximum buffering capacity in the mouth of whey proteins is situated between a pH of 3 and 4, that of sodium caseinates is situated at around 5.6 (Salaün, Mietton, and Gaucheron 2005). Moreover, Kailasapathy, Supriadi, and Hourigan (1996) highlighted that the substitution of some of the skimmed powdered milk by whey proteins in yogurt increased this buffering capacity at a pH of 4. The buffering capacity of skimmed powdered milk is indeed situated at around a pH of 5-6. This explained the differences of the sour taste for BP, CASP and WPIP. The ranking test on appreciation revealed that WPIP was the preferred product. On the other hand, the fruity odor was negatively correlated to the melon aroma: it was due to the sourness, giving off the smell

of fresh fruits but hiding the melon aroma in the mouth. As the added proteins had a buffering capacity, the sourness in the mouth decreased, revealing the melon taste.

3.2. Relation between nutrient composition and sensory analysis

The sensory aspect of a product could be partly predicted by the composition of macronutrients and micronutrients. For this reason, the food composition, in terms of macronutrients, was analyzed experimentally and theoretically, and reported in Table 1.

Table 1: Theoretical and experimental contents of macronutrients in the three products

Material balance		Macronutrients (g/100 g)		
		Proteins	Lipids	Carbohydrates
BP	Theory	2.08	3.01	16.64
	Experimental	1.75 ^a	3.48 ^a	14.46 ^a
CASP	Theory	1.37	2.67	15.56
	Experimental	1.36 ^b	2.95 ^b	14.16 ^a
WPIP	Theory	1.37	2.67	15.56
	Experimental	1.36 ^b	2.95 ^b	14.42 ^a

Means with the same superscript (a-b) do not differ significantly (Tukey test, p -value ≤ 0.05)

Theoretical and experimental values for proteins, lipids and carbohydrates were very similar. These results underlined the possibility of controlling the final nutritional quality of the functional products presented in this study. They reinforced the conclusions obtained by Gies et al. (2019), proving that the manufacturing process had a very low effect on the nutritional quality of the final product. The highest impact of the process was related to BP semi-skimmed milk proteins which underwent a 16 % loss and therefore presented a higher bitterness sensory perception.

Table 1 shows that BP contained more proteins and lipids than CASP and WPIP. In BP, although proteins are provided by the powdered milk (35 %), more are provided by the maize (47 %) and the rest from the fruits (10 % from melon and 8 % from papaya) (ANSES 2017). The difference of fruit maturation or a different batch of maize could explain the difference in protein content between BP and the two other products. CASP and WPIP contained significantly 12 % ($p <$

0.05) lower lipid content than BP which was made with semi-skimmed powdered milk containing 14 % fat. Caseinates and whey proteins, being almost pure proteins, did not provide any lipids in the CASP and WPIP respectively. Carbohydrates, namely saccharose, fructose and glucose, came from the maize, sugar and fruits. The difference between the theoretical results concerning the carbohydrates of the BP is due to the lactose, contained in the milk, representing 1.1 %.

The composition and the physico-chemical properties of a product are directly related to its organoleptic properties. Indeed, proteins can increase the roughness in case of granulation, while lipids increase the smoothness, the brightness and the homogeneity. However, fat-related properties could also be enhanced by increasing the protein concentration, except for whey proteins (Tomaschunas et al. 2012).

Proteins are known to be good emulsifiers. However, their stabilized emulsions can be destabilized by heating (Yadav et al. 2010). According to Yamauchi, Shimizu, and Kamiya (1980), the creaming and the viscosity of a product are maximum at a pH of 5 over the range of pH 3-9. It means that the emulsion is destabilized at a low pH (around 50 % stability at a pH of 4, which is the pH of our product). Moreover, the same authors proved that proteins had a tendency to form a more granular structure with an acidic pH than with an alkaline pH. This phenomenon confirms the hypothesis of a partial destabilized emulsion and therefore a granular structure with an acidic pH. This result could explain the roughness of CASP and WPIP containing pure proteins compared to BP, composed of semi-skimmed powdered milk (namely around 80 % caseins and 20 % whey proteins) according to Adjonu et al. (2014); de Castro et al. (2017). Furthermore, the emulsions made with whey proteins lead to flocculation at pH values near to their isoelectric point ($pI \sim 4.8$). The heat intake can result in the aggregation of the emulsion droplets and are susceptible to forming gels (D. Zhu, Damodaran, and Lucey 2010). A complexation between polyphenols

and proteins can also occur and the degree of binding is affected by different factors, mainly the pH. The lowest solubility of polyphenol-protein complexes occurred at 0.3-3.1 pH units below the isoelectric point of proteins, explaining the reason why WPIP and CASP were the most rough (Ozdal, Capanoglu, and Altay 2013). However, it was also proven that whey proteins can be conjugated with polysaccharides. In our case, the Maillard reaction causing a roasted note around 1.6/10 was not significantly different for the three products. This complexation is even better with a maltodextrin with a dextrose equivalent to 19 (Akhtar and Dickinson 2007). The maltodextrin used as a vehicle of the dispersible phytosterols added in the functional products had this dextrose equivalent. This conjugate of whey protein-maltodextrin would confer a better solubility of the proteins, and by maintaining emulsion systems and color, lead to excellent storage stability of the product (Akhtar and Dickinson 2007).

BP contained significantly more proteins and lipids, and was smoother and less rough than CASP and WPIP. The bitterness was partly due to peptides from the proteolysis of albumins and globulins contained by milk and caseinates or whey proteins. However, BP had a higher bitterness than CASP and WPIP, linked to the several different peptides produced from the semi-skimmed powdered milk (Suárez-Estrella et al. 2018). The sweet taste was induced by sugar content: this descriptor was not reported in Figure 1 because it was not discriminant ($p < 0.05$), as an experimental carbohydrate content. Moreover, the expert panel did not notice any differences concerning the intensity of the orange color of the products, which is related to the carotenoid stability. For BP, WPIP and CASP, the mean content of β -cryptoxanthin was 1.50 ± 0.31 mg/L, of β -carotene was 12.94 ± 1.80 mg/L and of lycopene was 8.32 ± 1.27 mg/L. Carotenoid contents were not impacted by the process as proven in a previous study (Gies et al. 2019). Polyphenols were also associated with the bitterness and the astringency of the products (Drewnowski and Gomez-Carneros

2000). The more a product contains phenols, the more it would have a bitter taste, just like BP in this case (Figure 1 and Table 2). However, the astringency of the three products was not significantly different ($p < 0.05$). Phenolic compounds such as tannins can be linked with salivary proteins to develop the astringency sensation in the mouth (Ozdal, Capanoglu, and Altay 2013; Soares et al. 2013).

3.3. Polyphenol content, antioxidant capacity and lipid oxidation

As reported in Table 2, polyphenol content was twice as high in BP than in WPIP. BPp was then the least antioxidant product with a FRAP result of 26.9 ± 2.6 μ mol Trolox/100g and an ABTS of 31.7 ± 1.0 and 22.5 ± 7.2 μ mol Trolox/100 g for respectively total ABTS and ABTS of the hydrophilic fraction. This result was related to its low TPC which was between 2.6 and 4.8 times less than WPIP and BP respectively. BPf and BP presented a similar FRAP and ABTS value, significantly different to WPIP ($p < 0.05$). According to Ishiwata et al. (2004), the TPC of freeze-dried melon is 555 ± 8 mg EAG/100 g and of papaya 389 ± 2 mg EAG/100 g.

Table 2: Polyphenols, antioxidant capacity and lipid oxidation

Products	Total polyphenols mg EAG/100 g	FRAP μ mol Trolox/100 g	ABTS (total) μ mol Trolox/100 g	ABTS (hydrophilic) μ mol Trolox/100 g	TBARS mg MDA/kg
BP	47.5 ± 1.8^b	133.2 ± 8.7^a	160.5 ± 5.8^a	147.2 ± 10.2^a	0.60 ± 0.02^a
WPIP	25.6 ± 1.2^c	127.0 ± 9.7^a	154.4 ± 1.0^b	124.9 ± 9.7^b	0.57 ± 0.04^a
BPf	54.4 ± 1.4^a	131.2 ± 10.7^a	150.1 ± 2.8^{ab}	150.1 ± 2.8^{ab}	0.73 ± 0.09^b
BPp	9.8 ± 0.4^d	26.9 ± 2.6^b	31.7 ± 1.0^c	22.5 ± 7.2^c	0.81 ± 0.04^b

BPf = BP with fruits without dispersible phytosterols

BPp = BP with dispersible phytosterols without fruits

Values are means of 3 independent determinations \pm standard deviation (SD)

Means with the same superscript (a-b) do not differ significantly (Tukey test, p -value ≤ 0.05)

The proportion of freeze-dried fruits incorporated into the formulation was 12 %. Consequently, it corresponds to 56.6 mg EAG/100 g of total polyphenols in the products. This result supports the TPC of BP and BPf. These data showed that these polyphenols came mainly from papaya and melon, while the BPp only contained the polyphenols from maize. Even if most of the polyphenols contained by maize are in bound

form, with a greater anti-radical and reducing activity than the free phenols, it could not be compared to the quantity of polyphenols introduced with fruits (Lopez-Martinez et al. 2009).

This difference in TPC could be attributed to the interactions between polyphenols and whey proteins. Interactions between proteins and polyphenols induce changes in the physico-chemical properties of proteins such as solubility, thermal stability and digestibility, but also content of free polyphenols and antioxidant capacity (Ozdal, Capanoglu, and Altay 2013). Proteins and quinones can form covalent interactions due to heat oxidation of phenolic compounds, leading to a decrease of the polyphenol content too, especially when polyphenols are linked to whey proteins (von Staszewski, Pilosof, and Jagus 2011).

Overall, FRAP values were similar to hydrophilic ABTS fraction which represented the most important part of the total ABTS. It means that the hydrophilic fraction of the products contained the main contributor to the total antioxidant capacities, from 80 to 100 %. FRAP and ABTS for BP and WPIP were similar to BPf results, with a mean of 130.4, 155.0 and 140.7 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$ for FRAP, total ABTS and hydrophilic ABTS fraction respectively. BPp values were significantly different, confirming that the antioxidant capacity of the final products came from fruits.

Toor and Savage (2005) explained that antioxidant capacity of tomatoes was mainly due to the hydrophilic fraction linked to the content of flavonoids and hydrophilic polyphenols. Toor and Savage (2005) and Tlili et al. (2011) also demonstrated that the hydrophilic antioxidant fraction was correlated to the amount of polyphenols, while lycopene content was correlated to the lipophilic antioxidant activities (Cano, Acosta, and Arnao 2003). The functional food described in this study was made with papaya and melon. These fruits are rich in hydrophilic phenolic

compounds and contain a small amount of lycopene which remains low in the final product, therefore it has a low lipophilic antioxidant capacity. However, as the TPC of WPIP was twice as low as that of BP, its antioxidant capacity should be affected. A similar behavior was described by Ryan and Sutherland (2011). Authors highlighted that additions of milk to tea decreased the total antioxidant capacity. Similar results were obtained by Niseteo et al. (2012) mixing coffee and milk. Nevertheless, Tsai and She (2006) proved that antioxidant capacity of peas increased thanks to protein-phenolic interactions which remained stable throughout the heating process. Almajano, Delgado, and Gordon (2007) also showed that the total antioxidant capacity increased when milk proteins and condensed tannins were mixed. These controversial results might be due to some differences in the analytical techniques or methodologies used to measure antioxidant capacity or total phenolic compound content (Ozdal, Capanoglu, and Altay 2013).

Moreover, the remaining antioxidant capacity of WPIP could be linked to whey proteins, which are considered an excellent source of bioactive peptides, released in the product during the hydrolyzation of proteins by fermentation with lactic acid bacteria (de Castro et al. 2017; Fardet and Rock 2018).

The lipidic oxidation (TBARS) was higher for BPp than for BP and WPIP, which was consistent with the previous results: the lipids of BP and WPIP were protected by the antioxidants coming from fruits. BPf presented a higher TBARS value related to its composition. BPf did not contain dispersible phytosterols, which represented 70 % of the total fat content. Therefore, for the same TBARS result, the lipid oxidation of BPf was related to a different total lipid content of only 30 % of the total lipidic content of BPp, BP and WPIP.

3.4. Bioaccessibility of carotenoids

As illustrated in Figure 2, the bioaccessibility of β -cryptoxanthin in WPIP was increased by 26 % compared to that of BP and CASP. On the other hand, no significant difference ($p < 0.05$) was observed between the β -carotene and lycopene bioaccessibilities of WPIP and BP. Conversely, sodium caseinates reduced β -carotene and lycopene bioaccessibilities by 26 and 51 % respectively, in CASP compared to BP.

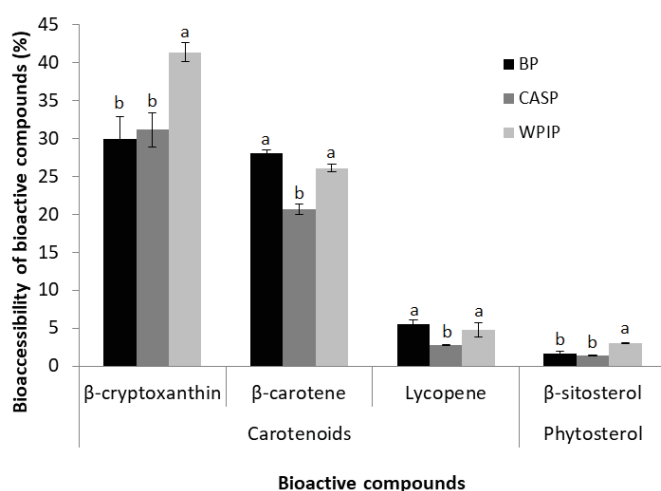


Figure 2: Bioaccessibility of bioactive compounds according to the different products

Thanks to their emulsifying properties and their specific amphiphilic properties, whey proteins improve oil-in-water emulsions (Adjou et al. 2014) and can work as a carrier or vehicle (de Castro et al. 2017). Indeed, β -lactoglobulin from whey proteins can bind with hydrophobic molecules such as fat-soluble vitamins (de Castro et al. 2017). Emulsifiers are actually known to enhance the bioaccessibility of carotenoids (Fernández-García, Rincón, and Pérez-Gálvez 2008). β -cryptoxanthin, an oxygenated carotenoid, is located at the surface of lipid droplets, whereas the more apolar β -carotene and lycopene are solubilized in the core of lipid droplets (Borel et al. 1996). Consequently, β -cryptoxanthin was more bioaccessible in the WPIP because whey proteins stabilized emulsions and facilitated the adsorption to

lipid droplets and the incorporation in mixed micelles.

The lower bioaccessibilities of β -carotene and lycopene in the CASP than in WPIP could be explained by the droplet size, which is generally bigger in emulsions formed by caseins than by whey proteins. Indeed, the smaller the particle diameter of an emulsion or micelle, the higher the bioaccessibility (Yi et al. 2014). The *in vitro* digestions of BP, CASP and WPIP led to a better understanding of how the proteins act on the bioaccessibility of β -cryptoxanthin, β -carotene and lycopene.

We note that the β -sitosterol bioaccessibility was very low, from 1.4 to 3 %. This result suggested that a very slight fraction of β -sitosterol added to the formulation was micellarized. We suppose that a high amount of the β -sitosterol was not micellarized because of the vehicle of dispersible phytosterols (mainly maltodextrin), which made it water-dispersible and consequently not micellarized. Interestingly, the micellarization of β -sitosterol in the WPIP was higher ($p < 0.05$) than that of BP and CASP by 50 %, as well as the better micellarization of β -cryptoxanthin from WPIP. Finally, whey protein isolates were the best protein hydrolysate to use in the formulation of this product to enhance the bioaccessibility of Bcx up to 41.4 ± 1.2 %, without decreasing those of β -carotene and lycopene compared to BP.

4. Conclusion

This study aimed to optimize a previously developed functional product in terms of nutritional and organoleptical properties. The process did not significantly alter the set compositions of micronutrients and macronutrients, demonstrating that it could be managed and guided to obtain a target composition and even a sensorial and nutritional global idea. Thanks to their emulsifying properties, whey protein isolates were the best protein hydrolysates to use in a formulation of this type of product to enhance the bioaccessibility of β -cryptoxanthin, one of

the provitamin A carotenoids, which reached 41.4 %. Because of their buffering capacity, these specific protein hydrolysates are able to increase the organoleptical value of the product. They also brought bioactive peptides which can be linked with polyphenols, decreasing the TPC but maintaining the antioxidant capacity. The antioxidant compounds such as polyphenols came mostly from papaya and melon, providing the whole antioxidant capacity of the product. These results together showed that the WPIP was the “best” product in terms of organoleptic properties and nutritional functionality such as carotenoid bioaccessibility and antioxidant capacity for the shelf life of the product. Overall, this study demonstrated that this functional product can be sensorially and nutritionally optimized by incorporation of whey protein isolates, taking into account its composition of macro- and micronutrients. Further studies should be carried out in order to understand the complexation which happens between polyphenols and whey proteins, and to characterize the bioactive peptides coming from whey proteins. It could also be interesting to validate the carotenoid bioaccessibility results with *in vivo* clinical studies.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Adjonu, Randy, Gregory Doran, Peter Torley, and Samson Agboola. 2014a. "Whey Protein Peptides as Components of Nanoemulsions: A Review of Emulsifying and Biological Functionalities." *Journal of Food Engineering* 122 (February): 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.034>.
- Akhtar, Mahmood, and Eric Dickinson. 2007. "Whey Protein–Maltodextrin Conjugates as Emulsifying Agents: An Alternative to Gum Arabic." *Food Hydrocolloids* 21 (4): 607–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.07.014>.
- Almajano, M. Pilar, M. Eugenia Delgado, and Michael H. Gordon. 2007. "Changes in the Antioxidant Properties of Protein Solutions in the Presence of Epigallocatechin Gallate." *Food Chemistry* 101 (1): 126–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.009>.
- ANSES. 2017. "Table Ciqual." <https://ciqual.anses.fr/>.
- Arnous, Anis, Dimitris P. Makris, and Panagiotis Kefalas. 2001. "Effect of Principal Polyphenolic Components in Relation to Antioxidant Characteristics of Aged Red Wines." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (12): 5736–42. <https://doi.org/10.1021/jf010827s>.
- Baumgartner, Sabine, Rouyanne T. Ras, Elke A. Trautwein, Ronald P. Mensink, and Jogchum Plat. 2017. "Plasma Fat-Soluble Vitamin and Carotenoid Concentrations after Plant Sterol and Plant Stanol Consumption: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials." *European Journal of Nutrition* 56 (3): 909–23. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1289-7>.
- Benzie, Iris F.F., and J.J. Strain. 1996. "The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of 'Antioxidant Power': The FRAP Assay." *Analytical Biochemistry* 239 (1): 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
- Bohn, Torsten, Qingguo Tian, Chureeporn Chitchumroonchokchai, Mark L. Failla, Steven J. Schwartz, Richard Cotter, and Joel A. Waksman. 2007. "Supplementation of Test Meals with Fat-Free Phytosterol Products Can Reduce Cholesterol Micellarization during Simulated Digestion and Cholesterol Accumulation by Caco-2 Cells." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2): 267–72. <https://doi.org/10.1021/jf061829l>.
- Borel, Patrick, P Grolier, M Armand, A Partier, H Lafont, D Lairon, and V Azais-Braesco. 1996. "Carotenoids in Biological Emulsions: Solubility, Surface-to-Core Distribution, and Release from Lipid Droplets," 12.
- Cano, Antonio, Manuel Acosta, and Marino B Arnao. 2003. "Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Activity Changes during On-Vine Ripening of Tomatoes (*Lycopersicon Esculentum* Mill.)." *Postharvest Biology and Technology* 28 (1): 59–65. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00141-2](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00141-2).
- Castro, Ruann Janser Soares de, Maria Aliciane Fontenele Domingues, André Ohara, Paula Kiyomi Okuro, Jessika Gonçalves dos Santos, Ramon Peres Brexó, and Hélia Harumi Sato. 2017. "Whey Protein as a Key Component in Food Systems: Physicochemical Properties, Production Technologies and Applications." *Food Structure* 14 (October): 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2017.05.004>.

- Dhuique-Mayer, Claudie, Adrien Servent, Adriana Descalzo, Claire Mouquet-Rivier, Marie-Josèphe Amiot, and Nawel Achir. 2016. "Culinary Practices Mimicking a Polysaccharide-Rich Recipe Enhance the Bioaccessibility of Fat-Soluble Micronutrients." *Food Chemistry* 210 (November): 182–88. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.037>.
- Drewnowski, Adam, and Carmen Gomez-Carneros. 2000. "Bitter Taste, Phytonutrients, and the Consumer: A Review." *The American Journal of Clinical Nutrition* 72 (6): 1424–35. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.6.1424>.
- Ellong, Emy Njoh, Corinne Billard, Sandra Adenet, and Katia Rochefort. 2015. "Polyphenols, Carotenoids, Vitamin C Content in Tropical Fruits and Vegetables and Impact of Processing Methods." *Food and Nutrition Sciences* 06 (03): 299–313. <https://doi.org/10.4236/fns.2015.63030>.
- Etcheverry, Paz, Michael A. Grusak, and Lisa E. Fleige. 2012. "Application of in Vitro Bioaccessibility and Bioavailability Methods for Calcium, Carotenoids, Folate, Iron, Magnesium, Polyphenols, Zinc, and Vitamins B6, B12, D, and E." *Frontiers in Physiology* 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00317>.
- Fardet, Anthony, Anne Morise, Esther Kalonji, Irène Margaritis, and François Mariotti. 2017. "Influence of Phytosterol and Phytostanol Food Supplementation on Plasma Liposoluble Vitamins and Provitamin A Carotenoid Levels in Humans: An Updated Review of the Evidence." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 00–00. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1033611>.
- Fardet, Anthony, and Edmond Rock. 2018. "In Vitro and in Vivo Antioxidant Potential of Milks, Yoghurts, Fermented Milks and Cheeses: A Narrative Review of Evidence." *Nutrition Research Reviews* 31 (01): 52–70. <https://doi.org/10.1017/S0954422417000191>.
- Fernández-García, Elisabet, Francisco Rincón, and Antonio Pérez-Gálvez. 2008. "Developing an Emulsifier System To Improve the Bioaccessibility of Carotenoids." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (21): 10384–90. <https://doi.org/10.1021/jf801910y>.
- Gies, Magali, Adriana Maria Descalzo, Adrien Servent, and Claudie Dhuique-Mayer. 2019. "Incorporation and Stability of Carotenoids in a Functional Fermented Maize Yogurt-like Product Containing Phytosterols." *LWT* 111 (August): 105–10. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.103>.
- Gylling, Helena, Jogchum Plat, Stephen Turley, Henry N. Ginsberg, Lars Ellegård, Wendy Jessup, Peter J. Jones, et al. 2014. "Plant Sterols and Plant Stanols in the Management of Dyslipidaemia and Prevention of Cardiovascular Disease." *Atherosclerosis* 232 (2): 346–60. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.11.043>.
- Iddir, Mohammed, Celal Degerli, Giulia Dingo, Charles Desmarchelier, Thomas Schlee, Patrick Borel, Yvan Larondelle, and Torsten Bohn. 2019. "Whey Protein Isolate Modulates Beta-Carotene Bioaccessibility Depending on Gastro-Intestinal Digestion Conditions." *Food Chemistry* 291 (September): 157–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.003>.
- Ishiwata, K., T. Yamaguchi, H. Takamura, and T. Matoba. 2004. "DPPH Radical-Scavenging Activity and Polyphenol Content in Dried Fruits." *Food Science and Technology Research* 10 (2): 152–56. <https://doi.org/10.3136/fstr.10.152>.
- Kailasapathy, K, D Supriadi, and J.A Hourigan. 1996. "Effect of Partially

Replacing Skim Milk Powder with Whey Protein Concentrate on Buffering Capacity of Yoghurt” 51 (2): 89–93.

Kandyli, Panagiotis, Katerina Pissaridi, Argyro Bekatorou, Maria Kanellaki, and Athanasios A Koutinas. 2016. “Dairy and Non-Dairy Probiotic Beverages.” *Current Opinion in Food Science* 7 (February): 58–63.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.012>.

Kaur, Navdeep, and Devinder Pal Singh. 2017. “Deciphering the Consumer Behaviour Facets of Functional Foods: A Literature Review.” *Appetite* 112 (May): 167–87.
<https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.01.033>

Lam, Ricky S.H., and Michael T. Nickerson. 2013. “Food Proteins: A Review on Their Emulsifying Properties Using a Structure–Function Approach.” *Food Chemistry* 141 (2): 975–84.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.038>.

Landete, J. M. 2013. “Dietary Intake of Natural Antioxidants: Vitamins and Polyphenols.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53 (7): 706–21.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2011.555018>.

Lopez-Martinez, Leticia X., Rosa M. Oliart-Ros, Gerardo Valerio-Alfaro, Chen-Hsien Lee, Kirk L. Parkin, and Hugo S. Garcia. 2009. “Antioxidant Activity, Phenolic Compounds and Anthocyanins Content of Eighteen Strains of Mexican Maize.” *LWT - Food Science and Technology* 42 (6): 1187–92.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.10.010>.

Mcfeters, R. F. 2004. “Fermentation Microorganisms and Flavor Changes in Fermented Foods.” *Journal of Food Science* 69 (1): FMS35–37.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb17876.x>.

Niseteo, Tena, Draženka Komes, Ana Belščak-Cvitanović, Dunja Horžić, and Maja Budeč. 2012. “Bioactive Composition and Antioxidant Potential of Different Commonly Consumed Coffee Brews Affected by Their Preparation Technique and Milk Addition.” *Food Chemistry* 134 (4): 1870–77.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.095>.

Noakes, Manny, Peter Clifton, Fady Ntanios, William Shrapnel, Ian Record, and Jenny McInerney. 2002. “An Increase in Dietary Carotenoids When Consuming Plant Sterols or Stanols Is Effective in Maintaining Plasma Carotenoid Concentrations.” *The American Journal of Clinical Nutrition* 75 (1): 79–86.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/75.1.79>.

Ozidal, Tugba, Esra Capanoglu, and Filiz Altay. 2013. “A Review on Protein–Phenolic Interactions and Associated Changes.” *Food Research International* 51 (2): 954–70.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>.

Re, Roberta, Nicoletta Pellegrini, Anna Proteggente, Ananth Pannala, Min Yang, and Catherine Rice-Evans. 1999. “Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay.” *Free Radical Biology and Medicine* 26 (9–10): 1231–37.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).

Reboul, Emmanuelle, Myriam Richelle, Eloïse Perrot, Christiane Desmoulin-Malezet, Victor Pirisi, and Patrick Borel. 2006. “Bioaccessibility of Carotenoids and Vitamin E from Their Main Dietary Sources.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (23): 8749–55.
<https://doi.org/10.1021/jf061818s>.

Ryan, Lisa, and Sheera Sutherland. 2011. “Comparison of the Effects of Different Types of Soya Milk on the Total

Antioxidant Capacity of Black Tea Infusions.” *Food Research International* 44 (9): 3115–17.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.003>.

Salaün, Françoise, Bernard Mietton, and Frédéric Gaucheron. 2005. “Buffering Capacity of Dairy Products.” *International Dairy Journal* 15 (2): 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.06.007>.

Salmerón, I. 2017. “Fermented Cereal Beverages: From Probiotic, Prebiotic and Synbiotic towards Nanoscience Designed Healthy Drinks.” *Letters in Applied Microbiology* 65 (2): 114–24. <https://doi.org/10.1111/lam.12740>.

Schäfer, Klaus. 1998. “Accelerated Solvent Extraction of Lipids for Determining the Fatty Acid Composition of Biological Material.” *Analytica Chimica Acta* 358 (1): 69–77. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00587-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00587-4).

Serafini, Mauro, Alessandra Stanzione, and Sebastiano Foddai. 2012. “Functional Foods: Traditional Use and European Legislation.” *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 63 (sup1): 7–9. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.637488>.

Shahzad, Naiyer, Wajahatullah Khan, Shadab Md, Asgar Ali, Sundeep Singh Saluja, Sadhana Sharma, Faisal A. Al-Allaf, et al. 2017. “Phytosterols as a Natural Anticancer Agent: Current Status and Future Perspective.” *Biomedicine & Pharmacotherapy* 88 (April): 786–94. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.068>.

Siró, István, Emese Kápolna, Beáta Kápolna, and Andrea Lugasi. 2008. “Functional Food. Product Development, Marketing and Consumer Acceptance—A Review.” *Appetite* 51 (3): 456–67. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.05.060>

Soares, Susana, Susann Kohl, Sophie Thalmann, Nuno Mateus, Wolfgang Meyerhof, and Victor De Freitas. 2013. “Different Phenolic Compounds Activate Distinct Human Bitter Taste Receptors.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (7): 1525–33. <https://doi.org/10.1021/jf304198k>.

Soukoulis, Christos, and Torsten Bohn. 2018. “A Comprehensive Overview on the Micro- and Nano-Technological Encapsulation Advances for Enhancing the Chemical Stability and Bioavailability of Carotenoids.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58 (1): 1–36. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.971353>.

Staszewski, Mariana von, Ana M.R. Pilosof, and Rosa J. Jagus. 2011. “Antioxidant and Antimicrobial Performance of Different Argentinean Green Tea Varieties as Affected by Whey Proteins.” *Food Chemistry* 125 (1): 186–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.059>.

Suárez-Estrella, Diego, Luisa Torri, Maria Ambrogina Pagani, and Alessandra Marti. 2018. “Quinoa Bitterness: Causes and Solutions for Improving Product Acceptability: Quinoa Bitterness: Causes and Solutions.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98 (11): 4033–41. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8980>.

Tlili, Imen, Chafik Hdider, Marcello Salvatore Lenucci, Riadh Ilahy, Hager Jebari, and Giuseppe Dalessandro. 2011. “Bioactive Compounds and Antioxidant Activities during Fruit Ripening of Watermelon Cultivars.” *Journal of Food Composition and Analysis* 24 (7): 923–28. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.03.016>.

Tomaschunas, Maja, Jörg Hinrichs, Ehrhard Köhn, and Mechthild Busch-Stockfisch. 2012. “Effects of Casein-to-Whey Protein Ratio, Fat and Protein

Content on Sensory Properties of Stirred Yoghurt.” *International Dairy Journal* 26 (1): 31–35.

<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.04.005>.

Toor, Ramandeep K., and Geoffrey P. Savage. 2005. “Antioxidant Activity in Different Fractions of Tomatoes.” *Food Research International* 38 (5): 487–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.10.016>.

Tsai, Pi-Jen, and Chen-Hue She. 2006. “Significance of Phenol–Protein Interactions in Modifying the Antioxidant Capacity of Peas.Pdf,” no. 54: 8491–94.

Yadav, Madhav P., Nicholas Parris, David B. Johnston, Charles I. Onwulata, and Kevin B. Hicks. 2010. “Corn Fiber Gum and Milk Protein Conjugates with Improved Emulsion Stability.” *Carbohydrate Polymers* 81 (2): 476–83. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.003>.

Yamauchi, Kunio, Makoto Shimizu, and Takamoto Kamiya. 1980. “EMULSIFYING PROPERTIES OF WHEY PROTEIN.” *Journal of Food Science* 45 (5): 1237–42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb06529.x>.

Yi, Jiang, Yue Li, Fang Zhong, and Wallace Yokoyama. 2014. “The Physicochemical Stability and in Vitro Bioaccessibility of Beta-Carotene in Oil-in-Water Sodium Caseinate Emulsions.” *Food Hydrocolloids* 35 (March): 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.025>.

Zhu, Dan, Srinivasan Damodaran, and John A. Lucey. 2010. “Physicochemical and Emulsifying Properties of Whey Protein Isolate (WPI)–Dextran Conjugates Produced in Aqueous Solution.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (5):

2988–94.

<https://doi.org/10.1021/jf903643p>.

Zhu, Qin Yan, Yu Huang, David Tsang, and Zhen-Yu Chen. 1999. “Regeneration of α -Tocopherol in Human Low-Density Lipoprotein by Green Tea Catechin.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (5): 2020–25. <https://doi.org/10.1021/jf9809941>.

**Travaux effectués
dans le cadre d'une
collaboration
franco-argentine,
en vue de l'obtention
du Label d'Excellence
de l'EIR-Agreenium**

Travaux effectués dans le cadre d'un stage à l'INTA de Buenos Aires dans l'équipe d'Adriana DESCALZO

L'École Internationale de Recherche Agreenium (EIR-A) délivre le Label d'Excellence sous réserve d'effectuer un stage de 3 mois minimum dans un laboratoire étranger (Annexe 5). Grâce aux collaborations franco-argentines antérieures, l'opportunité de réaliser ce stage à l'Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA de Buenos Aires) s'est présentée. Une étude de faisabilité de la mise à l'échelle pilote industrielle du produit développé a ainsi été menée. Les quantités de produit final ont été multipliées par 10, passant de 500 mL à l'échelle laboratoire, à 5 L à l'échelle pilote. Les produits réalisés ont été le produit initial à base de lait en poudre (BP) et le produit optimisé avec les protéines sériques (WPIP).

Plusieurs adaptations du procédé de fabrication ont dû avoir lieu, compte tenu du matériel et des matières premières disponibles. Ainsi, le broyeur utilisé donnait une granulométrie plus élevée du broyat de maïs en début de procédé, tandis que la cuve de pasteurisation/fermentation, non hermétique, induisait des pertes en eau, inexistantes dans les fermenteurs double enveloppe utilisés en laboratoire. De plus, la papaye *Carica papaya* var. *Formosa* a été remplacée par *Carica papaya* var. *Red Lady*, tandis que le *Cucumis melo* var. *escrito* (piel de sapo) s'est substitué au *Cucumis melo* var. *Cantalupensis*. L'Argentine étant en pleine crise du lait au moment des expérimentations, le lait en poudre demi-écrémé a été remplacé par du lait en poudre entier et du lait en poudre écrémé. Ces changements de procédé ou de matériaux montrent bien que ce produit peut être déclinable et s'adapter aux conditions socio-économiques du pays de production.

Le rendement du procédé de fabrication peut se calculer à différents stades. Les résultats d'absorption en eau des grains de maïs lors du trempage n'ont pas montré de différence significative ($p < 0,05$) entre l'échelle laboratoire et l'échelle pilote, avec $45,7 \pm 0,4$ % et $45,6 \pm 0,1$ % respectivement, malgré l'utilisation de variétés différentes de maïs. Cela montre que les 15 h de trempage fixées peuvent s'appliquer quel que soit le maïs employé : elles avaient en effet été calculées afin de réduire la charge bactérienne de la matière première, de ramollir le péricarpe et d'augmenter la gélatinisation des granules d'amidon.

Le rendement intermédiaire en jus de maïs équivalait à $73,1 \pm 2,4$ % pour les productions faites en laboratoire (CIRAD) et à $68,5 \pm 1,1$ % et pour les productions à l'échelle pilote. Cette différence significative ($p < 0,05$) de rendement en jus peut ici s'expliquer par la différence en matière première et en matériel. En effet, toutes les variétés de maïs ne possèdent pas les mêmes propriétés (épaisseur du péricarpe, taux de mitadinage, taille du germe etc.) tandis qu'un broyage plus fin induira une meilleure solubilisation des grains d'amidon et donc un rendement plus élevé.

À l'échelle laboratoire, le rendement final tend vers les 100 % puisque la pasteurisation et la fermentation sont effectuées en batch hermétique. Le rendement final a pu être calculé à l'échelle pilote et correspond à $71,2 \pm 1,9$ % avec une perte en eau due à une cuve non-hermétique établie à $28,9 \pm 1,9$ %. Si ce rendement final est additionné aux pertes en eau, le rendement produit atteint les 100 %, comme observé en fermenteur.

Une analyse sensorielle hédonique a été effectuée sur un panel naïf de 91 personnes. Le goût, la texture et le degré d'acceptation de BP et WPIP ont été notés sur une échelle à 9 points, de "me dégoûte complètement" à "j'adore complètement" correspondant aux notes de 1 à 9. Des questions sur leurs habitudes de consommation leur ont aussi été posées (Annexe 4). Cette étude a permis de compléter le test d'analyse sensorielle descriptif et le test de classement menés au CIRAD.

Des analyses physico-chimiques, nutritionnelles et microbiologiques ont également été effectuées sur place sur BP et WPIP en comparaison avec un Contrôle sans fruit. Ces résultats sont en cours d'exploitation et concernent le potentiel probiotique et la stérilité en fin de procédé de fabrication, mais aussi les teneurs en macronutriments (protéines et lipides), le taux de cendres, les acides aminés totaux et libres, les acides gras, les teneurs en caroténoïdes/phytostérols/tocophérols, l'oxydation lipidique et la capacité antioxydante des produits (TBARS/FRAP/ABTS). De plus, la technique SDS-PAGE a permis d'évaluer les changements de structure protéique dans le produit durant son procédé. La spectroscopie en fluorescence frontale a également été utilisée afin d'évaluer les empreintes fluorescentes globales associées à la chimométrie pour suivre les évolutions biochimiques du produit au cours du procédé de fabrication.

DISCUSSION GÉNÉRALE



Discussion générale

De la conception d'un aliment fonctionnel... jusqu'à la biodisponibilité de ses composés, en passant par son évaluation sensorielle

Ces travaux de thèse ont permis de concevoir un nouvel aliment "exploratoire" dit fonctionnel, à base de céréales fermentées, contenant des phytostérols et enrichi en caroténoïdes. Le produit optimisé pourrait être une alternative aux produits laitiers déjà commercialisés : il présente un potentiel probiotique et hypocholestérolémiant, et ne contient ni gluten ni lactose.

Le développement de ce type d'aliment fonctionnel est primordial, en considérant le contexte mondial de croissance exponentielle du syndrome métabolique et des maladies dérivées (maladies cardiovasculaires et diabète de type 2), en particulier dans les pays du Sud (Saklayen 2018). De plus, un manque évident de données dans la littérature concernant des aliments fonctionnels fermentés non-laitiers enrichis à la fois en caroténoïdes et en phytostérols est à souligner.

L'aliment développé doit être considéré comme un générique, et l'ajout de phytostérols ne peut être qu'une déclinaison de ce produit destiné à être utilisé en nutrition préventive pour des maladies chroniques liées à la cholestérolémie. En effet, les bénéfices/risques à long terme d'un tel produit ne sont pas recommandés aux sujets normocholestérolémiques, ni aux enfants ou aux femmes enceintes (Amiot, Coxam, et Strigler 2012). Ces travaux proposent donc un aliment générique adaptable aux populations cibles. Il est possible d'en moduler le procédé de fabrication et les matières premières pour en faire un produit "à la carte". Sans phytostérols, l'apport de caroténoïdes peut par exemple aider à pallier les carences en vitamine A de certaines populations du Sud, 125 g de ce produit pouvant apporter jusqu'à 20 % des Apports Journaliers Recommandés en vitamine A pour un adulte et 40 % pour un enfant de moins de 6 ans. D'autres fruits riches en caroténoïdes peuvent aussi être employés, tels que la mangue, la goyave, la pastèque ou l'abricot, et d'autres céréales peuvent se substituer au maïs, comme le sorgho (Maiani *et al.* 2009).

Le développement de cet aliment a été inspiré d'un aliment traditionnel africain, désigné sous le nom de "Akpan" au Bénin, et dont la qualité sanitaire et l'acceptabilité ont

été étudiées dans le cadre du Projet AFTER (African Food Tradition Revisited by Research, 2010-2014) porté par le CIRAD (Sacca *et al.* 2012; Akissoé *et al.* 2015). L'Akpan est un produit de type yaourt, préparé à partir d'une bouillie de maïs fermenté (Ogi), très consommé en Afrique de l'Ouest. Le principe d'une fermentation sur céréales ainsi que quelques ingrédients de la recette originale ont été repris. Dans ces travaux, le procédé de fabrication a été modifié, reformulé, standardisé, et optimisé d'un point de vue organoleptique et nutritionnel. Le produit final correspond alors à un aliment fonctionnel de type "yaourt" et a une composition en macronutriments et une valeur énergétique comparable à celles un yaourt aux fruits.

Ce produit a été rendu fonctionnel, par la production de biomasse bactérienne probiotique ainsi que par l'ajout de caroténoïdes, pour leurs bénéfices santé sur l'organisme d'une part, et d'autre part pour équilibrer l'aliment par rapport à sa teneur en phytostérols. En effet, si les phytostérols permettent à l'aliment un potentiel hypocholestérolémiant, ils peuvent également entrer en compétition avec les caroténoïdes et diminuer leur absorption (Noakes *et al.* 2002; Clifton *et al.* 2004; Fardet *et al.* 2017; Kopec et Failla 2018). L'ajout conjoint de caroténoïdes et de phytostérols dans un aliment à faible teneur en matière grasse n'est actuellement pas réalisé dans des aliments fermentés à base de céréales. Les interactions entre composés liposolubles lors de la digestion gastro-duodénale n'ont donc pas encore été prises en considération dans ce type de matrice. Ainsi, l'étude de la bioaccessibilité de ces molécules s'avère être une question de recherche originale dans la conception de cet aliment fonctionnel, qui représente un véritable challenge technologique et nutritionnel.

- **Standardisation microbiologique de l'aliment fonctionnel**

La standardisation microbiologique et le potentiel probiotique ont été mis au point par le choix de souches bactériennes mésophiles, starters de fermentation. Le choix des souches starters de fermentation joue un rôle primordial dans la saveur et la texture du produit, mais aussi dans son potentiel probiotique. Un aliment est dit "probiotique" si, au moment de l'ingestion, il contient entre 10^8 et 10^9 cellules vivantes par gramme (Kandylis *et al.* 2016), ce qui n'est pas le cas de tous les aliments fermentés. En effet, de nombreux aliments traditionnels sont fermentés, mais ne sont pas probiotiques (Prado *et al.* 2008;

Rivera-Espinoza et Gallardo-Navarro 2010; Marsh *et al.* 2014; Puerari, Magalhães-Guedes, et Schwan 2015; Ghosh *et al.* 2015; Bhardwaj *et al.* 2016; Kandylis *et al.* 2016).

Les souches bactériennes utilisées comme starters de fermentation de cet aliment à base de maïs sont des bactéries lactiques. Comme reporté par Kedia *et al.* (2007), l'utilisation de ferments probiotiques pour la fabrication d'aliments fonctionnels à base de céréales n'est pas commune : elle est mieux connue et exploitée dans les produits laitiers. Les céréales sont néanmoins de bons substrats pour les souches probiotiques, dû à la présence de composés non-digestibles pouvant servir de prébiotiques (non présents dans le lait) : on parle alors d'aliment symbiotique (Salmerón 2017).

L'aliment développé dans ces travaux a été fermenté par deux souches de bactéries lactiques *L. plantarum* et *L. casei* en ratio 50 % /50 %, qui ont été sélectionnées pour leur ubiquité (notamment sur les plantes) et leur statut probiotique déjà démontré dans les produits laitiers (Rivera-Espinoza et Gallardo-Navarro 2010). Ce ratio a permis une augmentation de 3 log de la biomasse bactérienne pour atteindre plus de 10^9 UFC/g en fin de fermentation, démontrant ainsi que cette matrice complexe apporte tous les éléments et facteurs de croissance nécessaires au développement de souches probiotiques dans un produit céréalier supplémenté. De plus, cette co-fermentation a montré des aspects bénéfiques sur les paramètres de fermentation, que ce soit une vitesse spécifique de croissance à $0,94 \text{ h}^{-1}$, un temps de génération élevé à 0,74 h, un temps de latence de 3 h plus faible que les fermentations testées en mono-souches, et une différence de pH plus importante entre le pH initial du produit et le pH final, bénéfique à une conservation plus longue du produit avec un pH final en moyenne compris entre 3,9 et 4,3.

- **Stabilisation des composés liposolubles au cours du procédé**

Après avoir formulé l'aliment et développé son procédé de fabrication, l'objectif de ces travaux a été de vérifier la stabilité des caroténoïdes, phytostérols et tocophérols durant les étapes de production. La β -cryptoxanthine, le β -carotène, le lycopène, les α - et γ -tocophérols et le β -sitostérol ont été quantifiés avant et après pasteurisation et fermentation, afin de vérifier l'impact de chacune de ces opérations unitaires.

Afin d'évaluer l'effet de la fermentation lactique sur la teneur en caroténoïdes, le produit a tout d'abord subi des fermentations mono-souches par *L. plantarum* et *L. casei*.

Après fermentation par *L. casei*, le β -carotène a significativement augmenté ($p < 0,05$) de 7 %, le lycopène de 33 % et les tocophérols de 30 %. En revanche, après fermentation par *L. plantarum*, seule une augmentation significative de la teneur en lycopène a été observée (13 %). Ces résultats suggèrent une meilleure extraction des caroténoïdes et des tocophérols, en particulier avec une fermentation par *L. casei*. Cela pourrait être dû à la production d'enzymes par les bactéries, comme des lipases ou des protéases, qui libèrent les caroténoïdes des complexes protéiques ou lipidiques, augmentant ainsi leur extractabilité. Il est également possible que ces souches démontrent une caroténogénèse (production de caroténoïdes), même en mono-culture, bien que Kot *et al.* (2016; 2018) parlent d'une caroténogénèse bactérienne en multi-souches (association levures/lactobacilles). Ces résultats confirment alors l'intérêt du choix d'une co-fermentation avec un ratio 50 %/50 % de *L. plantarum* et *L. casei*.

La co-fermentation n'a pas d'impact significatif sur la stabilité des caroténoïdes, ni sur les autres composés liposolubles. Cela peut être lié à la libération de peptides bioactifs par les bactéries, notamment des antioxydants, qui améliorent ainsi la capacité antioxydante de l'aliment, et assurent la protection des composés liposolubles (Septembre-Malaterre, Remize, et Poucheret 2018; Fardet et Rock 2018). Les pertes en caroténoïdes (20 à 27 %) observées lors du procédé de fabrication sont donc entièrement dues à l'étape de pasteurisation. Le β -carotène est le caroténoïde le plus thermosensible (27 % de pertes), tandis que le lycopène est le moins dégradé (20 % de pertes). Le lycopène de la papaye est accumulé sous forme de cristaux, associés aux membranes des plastes dans des complexes protéiques. Il est donc généralement plus stable, car protégé par ces liaisons (Schweiggert *et al.* 2011). Compte-tenu des pertes relativement faibles en caroténoïdes durant l'ensemble du procédé de fabrication, tous les composés liposolubles présentent un taux de rétention élevé supérieur à 73 %.

L'aliment fonctionnel a donc été formulé et son procédé de fabrication optimisé afin de limiter les pertes en composés liposolubles d'intérêt, par une fermentation multi-souches et une pasteurisation haute à temps court. Cela dit, c'est un produit très acide contenant une proportion de lait (2,4 % de lait en poudre), héritage de la recette originale de l'aliment traditionnel africain. L'intolérance au lactose comme la teneur en matière grasse et la tendance grandissante du végétarisme sont des éléments clés de la demande croissante en

produits fonctionnels non-laitiers (Prado *et al.* 2008; Kandylis *et al.* 2016). Ainsi, il a été nécessaire d'optimiser cet aliment, d'un point de vue nutritionnel mais aussi organoleptique.

Afin de d'éliminer le lactose et les matières grasses du produit, le lait en poudre a été éliminé des ingrédients. Il s'est avéré qu'après protéolyse par les enzymes bactériennes, il libérait également des peptides amers, laissant une saveur désagréable en bouche (Suárez-Estrella *et al.* 2018). Afin de compenser la perte de texture et de diminuer la perception de l'acidité en bouche, le lait en poudre a été substitué par des hydrolysats de protéines à fort pouvoir tampon, à savoir des caséinates de sodium ou des protéines sériques (Salaün, Mietton, et Gaucheron 2005).

- **Évaluation sensorielle de l'aliment**

L'analyse sensorielle descriptive des trois aliments (le produit de base contenant le lait en poudre (BP), le produit avec des caséinates de sodium (CASP) et le dernier contenant des protéines sériques (WPIP)) a confirmé que le produit initial BP était très acide avec une note acide de 6,5/10, contre 5,2 et 3,7 pour CASP et WPIP respectivement. Le pouvoir tampon maximal des protéines sériques s'exprime à un pH situé entre 3 et 4, tandis que celui des caséinates est autour de 5,6 et celui du lait en poudre au-dessus de 5 (Kailasapathy, Supriadi, et Hourigan 1996; Salaün, Mietton, et Gaucheron 2005). Le pH de l'aliment étant situé entre 3,9 et 4,3 il est cohérent que le pouvoir tampon des protéines sériques soit le plus exprimé. L'acidité de BP couvre également l'arôme de melon, qui est alors mieux ressenti dans WPIP (2.9/10 contre 4.25/10 respectivement). BP contenant également plus de protéines et de lipides que ses homologues, il est le plus granuleux, mais aussi le plus homogène, onctueux et brillant.

Les protéines sériques sont connues pour être de bons émulsifiants. Elles peuvent s'hydrolyser en peptides bioactifs qui ont la capacité de se lier aux polyphénols en formant des complexes protéines-polyphénols : cela diminue alors la teneur en polyphénols totaux, avec l'amertume et l'astringence qui leur sont associées (Ozdal, Capanoglu, et Altay 2013; Drewnowski et Gomez-Carneros 2000). Dans notre étude, la capacité antioxydante du produit est maintenue malgré ces complexations. Il a aussi été démontré que les composés antioxydants de l'aliment, et principalement les polyphénols, provenaient en quasi-totalité des fruits ajoutés à la formulation, à savoir la papaye et le melon.

Un jury expert en analyse sensorielle a donné les notes de qualité globale des produits : WPIP présente une note plus élevée mais non-significative avec $6,12 \pm 0,99/10$ contre $6,05 \pm 1,36/10$ et $5,26 \pm 1,24/10$ pour CASP et BP respectivement. Un test de classement par le même panel a également placé WPIP en première position.

Le WPIP a donc été retenu pour une analyse sensorielle hédonique et comparative avec BP. Elle a été réalisée en Argentine à l'INTA de Buenos Aires, par un panel naïf de consommateurs potentiels. Le produit WPIP a recueilli une note plus élevée que le produit BP dans 79,1 %, 82,4 % et 82,4 % des cas pour le goût, la texture et le degré d'acceptation respectivement. Ces résultats issus d'une analyse sensorielle hédonique confirment les résultats préliminaires de classement des aliments, à savoir que WPIP serait le plus accepté par les consommateurs.

Après avoir optimisé le développement de l'aliment et vérifié son acceptabilité par les consommateurs, il a été nécessaire de s'intéresser à son aspect nutritionnel, et en particulier de comprendre les interactions possibles entre les composés liposolubles lors de la digestion gastro-duodénale.

- **Bioaccessibilité et absorption des composés liposolubles**

La co-adjonction de caroténoïdes et de phytostérols dans l'aliment fonctionnel développé dans ces travaux a posé la question de leurs interactions lors de leur digestion et absorption intestinale. De plus, la présence simultanée de cholestérol alimentaire peut complexifier ces interactions. Depuis les années 2000, il est connu que lorsque les phytostérols diminuent le taux de cholestérol sanguin, ils affectent également les teneurs plasmatiques en caroténoïdes (Katan *et al.* 2003; Richelle *et al.* 2004; Clifton *et al.* 2004). Récemment, des études de méta-analyses ont confirmé que les phytostérols induisaient une baisse significative des taux plasmatiques de β -carotène ; les carotènes étant d'ailleurs plus impactés que les xanthophylles (Fardet *et al.* 2017; Baumgartner *et al.* 2017).

Ces interactions peuvent avoir lieu lors de leur transfert micellaire, ou au moment de leur captage entérocytaire par les transporteurs membranaires (SR-BI ; CD36 ; NPC1L1), puisque ces trois transporteurs sont communs aux cholestérol, aux caroténoïdes et aux phytostérols (Kopec et Failla 2018).

Le premier objectif de cette étude a donc été d'étudier la bioaccessibilité des différents types de caroténoïdes en présence de phytostérols dans l'aliment développé. Cela correspond à suivre le transfert micellaire de la β -cryptoxanthine, du β -carotène, du lycopène et du β -sitostérol au cours de la phase gastrique et duodénale. Dans un deuxième temps, il a été nécessaire de valider l'effet hypocholestérolémiant potentiel de cet aliment en présence de cholestérol exogène au produit. Ensuite, afin d'évaluer l'absorption intestinale des composés liposolubles, le modèle de digestion *in vitro* a été couplé au modèle cellulaire de type Caco-2.

À l'inverse de la littérature, les résultats de ces travaux ont montré que la bioaccessibilité du β -carotène (caroténoïde majoritaire) de l'aliment était augmentée de 40 % en présence de phytoD. Les constituants d'encapsulation des phytoD jouaient alors un rôle non suspecté jusqu'à présent. Le manque d'information à ce sujet dans les publications récentes indique que les véhicules d'encapsulation des phytostérols ne sont souvent pas examinés, et que leurs effets sur l'absorption des caroténoïdes sont peu discutés. Cela représente pourtant un point critique influant sur l'absorption des caroténoïdes. Les résultats de cette étude ont démontré que le véhicule des phytoD, principalement la maltodextrine, augmentait la bioaccessibilité du β -carotène. La maltodextrine, est un polysaccharide produit à partir d'amidon hydrolysé couramment utilisé comme agent d'encapsulation pour les procédés d'atomisation (Medeiros *et al.* 2019). Cet additif est connu pour sa capacité d'enrobage, et a l'avantage de présenter une faible viscosité en solution, tout en participant à la stabilisation des émulsions (Parikh, Agarwal, et Raut 2014; Hofman, van Buul, et Brouns 2016). Nos résultats suggèrent que la maltodextrine, en favorisant les nano-émulsions, permet la formation d'une plus grande interface huile/eau et améliore ainsi la micellarisation des caroténoïdes, en particulier des carotènes apolaires (Liang *et al.* 2013). En effet, après digestion *in vitro*, le diamètre moyen des gouttelettes lipidiques dispersées dans la phase aqueuse était de 51 nm en présence de phytoD, donc de maltodextrine, contre 189 nm sans phytoD.

Bien que la β -cryptoxanthine soit quantitativement le caroténoïde minoritaire dans le produit, la présence de phytoD diminue sa bioaccessibilité de 36 à 30 %, à l'inverse de l'effet observé sur le β -carotène. Un effet antagoniste des phytoD est donc constaté en fonction du type de caroténoïde présent. Cette différence est probablement liée à la polarité des

molécules : les xanthophylles, plus polaires, sont plutôt localisées à la surface des gouttelettes lipidiques et, d'une manière générale, s'incorporent plus facilement que les carotènes dans les micelles mixtes (Patrick Borel *et al.* 1996). Granado-Lorencio *et al.* (2011) rapportent que la bioaccessibilité de la β -cryptoxanthine n'est pas affectée en présence de phytostérols encapsulés après digestion *in vitro* de boisson à base de lait et de jus de fruit. Cela dit, aucun véhicule n'est mentionné pour ces phytoD et la matrice alimentaire est différente. Pour le même type de laitage mais enrichi en membrane de globule gras du lait (structure biologique constituée d'une bicouche de phospholipides et de protéines ayant des propriétés tensioactives), la même équipe montre une diminution de la bioaccessibilité de la β -cryptoxanthine en présence de phytostérols encapsulés (Hernandez-Alvarez *et al.* 2016).

Les précédents auteurs ont constaté une augmentation de la bioaccessibilité des phytostérols en présence de β -cryptoxanthine, suggérant une compétition pour la micellarisation entre ces deux molécules. De plus, il a été rapporté dans une étude d'intervention que la β -cryptoxanthine semble améliorer le pouvoir hypocholestérolémiant des phytostérols lorsqu'elle est ingérée simultanément (Granado-Lorencio *et al.* 2014). Dans nos expérimentations, la bioaccessibilité du β -sitostérol encapsulé est faible (1,6 %), indiquant que la forme dispersible gêne sa micellarisation mais également que le β -sitostérol pourrait être en compétition avec la β -cryptoxanthine. D'autres auteurs ont observé une faible bioaccessibilité des phytostérols encapsulés dans les boissons à base de lait, et ont donc suggéré une interaction entre la β -cryptoxanthine et le β -sitostérol (Alemany *et al.* 2013; Garcia-Llatas *et al.* 2015).

Ces résultats indiquent donc que la bioaccessibilité du β -carotène, provitaminique et majoritaire de cet aliment fonctionnel, augmente de 40 % grâce aux phytoD, alors que la substitution de ces phytoD par du β -sitostérol standard montre une diminution de la bioaccessibilité du β -carotène, conformément à la littérature. Cette expérimentation met en évidence l'intérêt du véhicule de type maltodextrine des phytoD.

Un effet hypocholestérolémiant potentiel de l'aliment a également été mis en évidence, testé en présence de cholestérol exogène au produit, imitant un apport en cholestérol alimentaire. Les phytoD de l'aliment ont permis de diminuer significativement ($p < 0,05$) la micellarisation du cholestérol de plus de 50 %, sans affecter la bioaccessibilité du β -carotène. Seule la bioaccessibilité de la β -cryptoxanthine a diminué de 1,5 fois, mais

cette diminution a été considérée comme minime, puisque cette xanthophylle ne représente que 7 % des caroténoïdes totaux de l'aliment.

L'optimisation de l'aliment par l'incorporation de protéines sériques a également conduit à une étude de la bioaccessibilité des composés liposolubles. Il a été mis en évidence que ces protéines permettaient d'augmenter la bioaccessibilité de la β -cryptoxanthine, mais qu'elles n'avaient pas d'effet sur les carotènes. Il semblerait que les protéines sériques, aux propriétés émulsifiantes, améliorent la micellarisation de la β -cryptoxanthine, contrairement à la maltodextrine qui n'est pas, à proprement parler, un émulsifiant. Ce ne sont donc pas les mêmes mécanismes qui sont en jeu. En effet, la maltodextrine agirait plutôt en réduisant la taille des gouttelettes lipidiques, et donc en augmentant leur nombre. Cela favoriserait ainsi la quantité de carotènes solubilisés au cœur de ces gouttelettes et augmenterait la surface de l'interface huile/eau exposée aux sels biliaires et aux lipases (Liang *et al.* 2013). Les protéines sériques, émulsifiantes, favoriseraient quant à elles le transfert des caroténoïdes des gouttelettes vers les micelles mixtes, renforçant ainsi l'action de la lipase aux interfaces. Les protéines sériques, émulsifiantes, favoriseraient le transfert des caroténoïdes des gouttelettes vers les micelles mixtes, grâce à leur capacité de liaison par des liaisons hydrophobes, ainsi qu'à leur conformation moléculaire (Soukoulis et Bohn 2018). C'est pourquoi la β -cryptoxanthine, qui se situe en surface, se micellise mieux que les carotènes.

L'étape suivante a été d'évaluer le devenir des caroténoïdes de l'aliment au niveau intestinal, en particulier en présence ou en absence de phytoD. Ainsi, les micelles physiologiques obtenues suite à la digestion *in vitro* ont été incubées sur les cellules intestinales humaines (Caco-2 TC7) afin d'étudier les mécanismes d'absorption.

Dans un premier temps, les résultats ont donné des préférences d'absorption entérocytaires pour les 3 caroténoïdes en présence et pour les deux types de micelles, avec ou sans phytoD. Ainsi, le β -carotène et β -cryptoxanthine libres ont été mieux absorbés que le lycopène, conformément à la littérature (Kopec et Failla 2018).

Ensuite, la présence de phytoD semble diminuer le captage des caroténoïdes de 25 % en moyenne pour la β -cryptoxanthine et le β -carotène. Plusieurs hypothèses peuvent être

formulées pour expliquer ce résultat. Soit le β -sitostérol lui-même entre en compétition avec les caroténoïdes pour l'absorption, soit c'est son véhicule qui entrave son absorption. Le fait que les caroténoïdes soient moins absorbés en présence de β -sitostérol pourrait s'expliquer par des mécanismes impliquant les transporteurs intestinaux. En effet, les transporteurs d'entrée comme le NPC1L1 et SR-BI (localisés dans la membrane de la bordure en brosse des entérocytes) sont communs aux phytostérols, caroténoïdes et cholestérol (Nakano, Inoue, et Murakoshi 2019). Par ailleurs, les résultats ont montré qu'en présence de phytoD ou celle du véhicule seul, la taille des micelles mixtes a augmenté significativement ($p < 0,05$). Dans ce cas, l'absorption des caroténoïdes serait étroitement liée à la taille des micelles, les micelles de plus petite taille étant plus facilement absorbées (Soukoulis et Bohn 2018). Un effet inverse de celui observé lors de la micellisation a été constaté, c'est-à-dire que les phytoD ont amélioré la bioaccessibilité des caroténoïdes, mais ont limité le captage des molécules par les cellules Caco-2.

Les phytoD de l'aliment fonctionnel ont réduit l'absorption du cholestérol exogène ajouté. En effet, aucune accumulation de cholestérol n'est détectée pour l'aliment formulé avec les phytoD, alors que 2 % de cholestérol sont captés par les cellules intestinales pour l'aliment sans phytoD. Même si cette absorption est relativement faible, elle correspond à 3 047 pmoles de cholestérol/mg de protéines cellulaires et représente donc une quantité cellulaire du même ordre que celle du β -sitostérol (4365 pmole/mg de protéines). À noter que dans cette étude, le ratio cholestérol:phytostérol est de 1:2,5 alors que dans les études chez l'Homme, il est préconisé 1:5. Ce ratio chez l'Homme correspond à un apport alimentaire de cholestérol de 160 à 400mg/jour (Bohn *et al.* 2007). Pour rappel, l'apport journalier de 1,5 à 2 g de phytostérols permet de diminuer l'absorption de 7 % d'un apport de 300 mg de cholestérol. *In fine*, la réduction de l'absorption du β -sitostérol de 7,9 % à 5,8 % dans l'aliment en présence de cholestérol démontre la compétition entre ces deux molécules.

Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle clé des véhicules d'encapsulation des phytoD dans l'absorption des caroténoïdes et du cholestérol au niveau gastro-duodéal. La conception et la fabrication des phytoD est assez récente, mais leur utilisation dans les aliments à faible teneur en matière grasse commence à se développer.

CONCLUSION & PERSPECTIVES



Conclusion & Perspectives

Ces travaux de thèse ont permis la conception d'un aliment à base de maïs fermenté potentiellement probiotique et hypocholestérolémiant, et présentant des teneurs et une bioaccessibilité relativement élevées des caroténoïdes provitaminiques A. C'est un produit générique qui permettrait de répondre de manière préventive aux critères socio-démographiques de malnutrition ou de sous-nutrition mondiaux. Compte tenu de son procédé de fabrication simple et relativement peu coûteux selon ses déclinaisons, cet aliment pourrait être produit dans les pays en voie de développement, comme les pays latino-américains (où la prévalence du syndrome métabolique est élevée), tout en impliquant les producteurs locaux, et les industries de transformation déjà implantées.

Bien que développé et optimisé dans ces travaux, cet aliment pourrait encore être amélioré dans sa formulation, notamment pour s'adapter aux différents consommateurs cibles.

Les protéines laitières (protéines sériques) pourraient être remplacées par d'autres constituants, pour des consommateurs allergiques aux protéines de lait. Pour cela, il serait envisageable d'effectuer une recherche d'ingrédients au fort pouvoir tampon et aux propriétés texturantes intéressantes pouvant se substituer aux protéines sériques.

Par ailleurs, diminuer la teneur en sucre serait une autre priorité. Des analyses exploratoires ont été effectuées durant ces travaux sur cet aliment sans sucre ajouté (3,6 % de sucre en moins). La teneur finale en sucres (hors amidon) du WPIP était équivalente à environ 12 % de sucres, provenant donc uniquement des fruits. Néanmoins, les sucres des fruits sont associés à des fibres, et leur impact sur la santé est très différent, voire antagoniste, de celui des sucres dits "ajoutés". Ces essais n'ont montré aucun effet sur la biomasse finale bactérienne par rapport à l'aliment initial. Le potentiel probiotique restait donc inchangé, et le goût n'en était pas réellement modifié (analyse sensorielle en interne). Il serait donc nécessaire de continuer les expérimentations dans ce sens. Peut-être serait-il possible d'hydrolyser les sucres, ou de les faire flocculer afin de les éliminer de la matrice, ou encore d'utiliser des techniques de filtration membranaire (micro-filtration, nano-filtration). Cette opération unitaire pourrait être ajoutée dans le procédé de fabrication, après tamisage/rinçage et ajout des lyophilisats de fruits, mais avant l'ajout des autres ingrédients.

Cela permettrait d'éliminer la majorité des sucres, tout en conservant les macronutriments et micronutriments d'intérêt, rendant ce nouvel aliment plus adapté au contexte actuel de malnutrition.

Afin de mieux comprendre cette nouvelle matrice céréalière complexe, une étude structurale et cellulaire par microscopie confocale par exemple, permettrait de localiser les composés d'intérêt au sein du produit (associations de protéines ou complexes protéines-polyphénols, associations cellulodiques, distribution bactérienne etc.). Il est en effet possible de repérer certains composés par complexation avec des fluorophores ou de concevoir des sondes spécifiques à un composé avec l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH).

La conservation du produit n'a pas fait l'objet de ces travaux de thèse mais cette étude a été abordée dans le cadre d'une collaboration franco-argentine. Les résultats sont en cours d'écriture (travaux réalisés à l'UMR QualiSud par Mariana Lingua Soledad en post-doctorat). Brièvement, le stockage de ce produit a été estimé à 28 jours, soit 4 semaines, à + 4 °C. Ce travail s'est basé sur le nombre de bactéries fermentaires viables en fin de stockage, qui s'élève à plus de 10⁸ UFC/g, préservant le potentiel probiotique, mais aussi sur l'oxydation lipidique et la capacité antioxydante de l'aliment au cours de son stockage. Ces données viennent compléter l'étude de l'aliment fonctionnel et permettront d'optimiser les paramètres des conditions de conservation (publication en tant que co-auteur en cours).

La dernière partie de ce travail sur les interactions entre caroténoïdes et phytostérols dispersibles lors de la digestion gastro-duodénale a également permis de répondre à plusieurs questions, mais en a soulevé d'autres. La connaissance de la biodisponibilité des caroténoïdes en présence de phytostérols dispersibles pourrait être approfondie, à la fois par des modèles *in vitro* et des études cliniques *in vivo*. Il serait intéressant de pouvoir tester l'effet de véhicules différents sur la bioaccessibilité et l'absorption des caroténoïdes.

Nos résultats ont montré que le véhicule des phytoD influençait différemment la bioaccessibilité des caroténoïdes suivant leur type (xanthophylle ou carotène). La β -cryptoxanthine est impactée par le véhicule et/ou par une compétition avec les phytoD. D'autres études à différents niveaux (*in vitro* et *in vivo*) mettent effectivement en avant le comportement particulier de la β -cryptoxanthine en présence de phytostérols encapsulés.

Dans l'étude avec les protéines sériques, la bioaccessibilité de la β -cryptoxanthine est améliorée alors qu'elle est diminuée dans le produit initial BP contenant les phytoD. Ainsi, une expérimentation supplémentaire sur WPIP sans phytoD aurait été intéressante pour vérifier si la bioaccessibilité de la β -cryptoxanthine aurait été plus élevée en l'absence de phytoD.

De même, au niveau de l'entérocyte, il aurait été intéressant d'incuber les digestats de WPIP afin d'étudier leur impact sur le captage des caroténoïdes par les cellules avec ou sans phytoD. D'autres expérimentations liant la taille des micelles, le potentiel zeta, et le captage des caroténoïdes et des phytostérols, auraient permis d'approfondir la compréhension des mécanismes cellulaires.

In fine, il serait nécessaire de confirmer les potentiels hypocholestérolémiant et probiotique par des études *in vivo*, dans un premier temps chez l'animal, et de les valider dans un second temps chez l'Homme. Une étude clinique sur des sujets normo- et hypercholestérolémiques permettrait de confirmer le pouvoir hypocholestérolémiant de l'aliment mais aussi de vérifier que la biodisponibilité des caroténoïdes de l'aliment fonctionnel n'est pas affectée. Par ailleurs, il serait intéressant de valoriser ce produit par une preuve de concept du potentiel probiotique sur rats "humanisés", c'est-à-dire des rats auxquels un microbiote intestinal humain aurait été implanté. Les effets santé associés pourraient ainsi être étudiés, et cela validerait le potentiel fonctionnel de cet aliment avant de prévoir des études chez l'Homme.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- Aherne, S. Aisling, Trevor Daly, Marvin A. Jiwan, Laurie O'Sullivan, et Nora M. O'Brien. 2010. « Bioavailability of β -Carotene Isomers from Raw and Cooked Carrots Using an in Vitro Digestion Model Coupled with a Human Intestinal Caco-2 Cell Model ». *Food Research International* 43 (5): 1449 - 54. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.026>.
- Akissoé, Noël H, Carole Sacca, Anne-Laure Declémy, Aurelie Bechoff, Victor B Anihouvi, Générose Dalodé, Dominique Pallet, et al. 2015. « Cross-Cultural Acceptance of a Traditional Yoghurt-like Product Made from Fermented Cereal: Cross-Cultural Acceptance of Cereal Yoghurt ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95 (9): 1876-84. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6892>.
- Alemany, Laia, Antonio Cilla, Guadalupe Garcia-Llatas, Maria T. Rodriguez-Estrada, Vladimiro Cardenia, et Amparo Alegría. 2013. « Effect of Simulated Gastrointestinal Digestion on Plant Sterols and Their Oxides in Enriched Beverages ». *Food Research International* 52 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.024>.
- Alemany-Costa, Laia, Marina González-Larena, Guadalupe García-Llatas, Amparo Alegría, Reyes Barberá, Luis Manuel Sánchez-Siles, et María Jesús Lagarda. 2012. « Sterol Stability in Functional Fruit Beverages Enriched with Different Plant Sterol Sources ». *Food Research International* 48 (1): 265 - 70. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.005>.
- Amengual, Jaume, M. Airanthi K. Widjaja-Adhi, Susana Rodriguez-Santiago, Susanne Hessel, Marcin Golczak, Krzysztof Palczewski, et Johannes von Lintig. 2013. « Two Carotenoid Oxygenases Contribute to Mammalian Provitamin A Metabolism ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (47): 34081-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.501049>.
- Amiot, Marie-Josèphe, Véronique Coxam, et Florence Strigler. 2012. *Les phytomicronutriments*. Lavoisier-Tec & Doc.
- Amir Shaghghi, Mandana, Scott V. Harding, et Peter J.H. Jones. 2014. « Water Dispersible Plant Sterol Formulation Shows Improved Effect on Lipid Profile Compared to Plant Sterol Esters ». *Journal of Functional Foods* 6 (janvier): 280 - 89. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.10.017>.
- Andersson, Henrik, Nils-Georg Asp, Åke Bruce, Stefan Roos, Torkel Wadström, et Agnes E. Wold. 2001. « Health Effects of Probiotics and Prebiotics A Literature Review on Human Studies ». *Näringsforskning* 45 (1): 58 - 75. <https://doi.org/10.3402/fnr.v45i0.1790>.
- Annunziata, Azzurra, et Riccardo Vecchio. 2011. « Functional Foods Development in the European Market: A Consumer Perspective ». *Journal of Functional Foods* 3 (3): 223-28. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.03.011>.
- ANSES. 2014. « OPINION of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety on Assessment of the risks and benefits of consuming food products fortified with phytosterols and phytostanols ». 2010-SA-0057. Maisons-Alfort: ANSES.
- Arpaia, Mary Lu, et Adel A. Kader. 2002. « Fruit Produce Facts - Papaya ». http://postharvest.ucdavis.edu/Commodity_Resources/Fact_Sheets/Datastores/Fruit_French/?uid=42&ds=806.

B

- Baumgartner, Sabine, Rouyanne T. Ras, Elke A. Trautwein, Ronald P. Mensink, et Jogchum Plat. 2017. « Plasma Fat-Soluble Vitamin and Carotenoid Concentrations after Plant Sterol and Plant Stanol Consumption: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials ». *European Journal of Nutrition* 56 (3): 909 - 23. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1289-7>.
- Bechoff, Aurélie, et Claudie Dhuique-Mayer. 2017. « Factors Influencing Micronutrient Bioavailability in Biofortified Crops: Biofortified Crops: Micronutrient Bioavailability ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1390 (1): 74 - 87. <https://doi.org/10.1111/nyas.13301>.
- Bengtsson, Anton, Christian Brackmann, Annika Enejder, Marie Larsson Alminger, et Ulf Svanberg. 2010. « Effects of Thermal Processing on the in Vitro Bioaccessibility and Microstructure of β -Carotene in Orange-Fleshed Sweet Potato ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (20): 11090 - 96. <https://doi.org/10.1021/jf1024104>.
- Berg, Henk van den. 1999. « Carotenoid Interactions » 57 (1): 1 - 10. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1999.tb01769.x>.
- Berger, Alvin, Peter JH Jones, et Suhad S Abumweis. 2004. « Plant Sterols: Factors Affecting Their Efficacy and Safety as Functional Food Ingredients ». *Lipids in Health and Disease*, 19.
- Bhardwaj, Kailash N., Kavish Kumar Jain, Sandeep Kumar, et Ramesh Chander Kuhad. 2016. « Microbiological Analyses of Traditional Alcoholic Beverage (Chhang) and Its Starter (Balma) Prepared by Bhotiya Tribe of Uttarakhand, India ». *Indian Journal of Microbiology* 56 (1): 28-34. <https://doi.org/10.1007/s12088-015-0560-6>.
- Bietrix, Florence, Daoguang Yan, Michel Nauze, Corinne Rolland, Justine Bertrand-Michel, Christine Coméra, Stephane Schaak, et al. 2006. « Accelerated Lipid Absorption in Mice Overexpressing Intestinal SR-BI ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (11): 7214 -19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508868200>.
- Blandino, A., M.E. Al-Aseeri, S.S. Pandiella, D. Cantero, et C. Webb. 2003. « Cereal-Based Fermented Foods and Beverages ». *Food Research International* 36 (6): 527-43. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00009-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00009-7).
- Bohn, Torsten, Charles Desmarchelier, Lars O. Dragsted, Charlotte S. Nielsen, Wilhelm Stahl, Ralph Rühl, Jaap Keijer, et Patrick Borel. 2017. « Host-Related Factors Explaining Interindividual Variability of Carotenoid Bioavailability and Tissue Concentrations in Humans ». *Molecular Nutrition & Food Research* 61 (6): 1600685. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600685>.
- Bohn, Torsten, Qingguo Tian, Chureeporn Chitchumroonchokchai, Mark L. Failla, Steven J. Schwartz, Richard Cotter, et Joel A. Waksman. 2007. « Supplementation of Test Meals with Fat-Free Phytosterol Products Can Reduce Cholesterol Micellarization during Simulated Digestion and Cholesterol Accumulation by Caco-2 Cells ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2): 267 - 72. <https://doi.org/10.1021/jf061829l>.
- Borel, P., J. Draï, V. Fayol, C. Galabert, M. Laromiguière, et G. Le Moël. 2005. « Recent knowledge about intestinal absorption and cleavage of carotenoids » 63 (2): 165-77.

- Borel, Patrick, Charles Desmarchelier, Marion Nowicki, et Romain Bott. 2015a. « Lycopene Bioavailability Is Associated with a Combination of Genetic Variants ». *Free Radical Biology and Medicine* 83 (juin): 238 - 44. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.033>.
- . 2015b. « A Combination of Single-Nucleotide Polymorphisms Is Associated with Interindividual Variability in Dietary β -Carotene Bioavailability in Healthy Men ». *The Journal of Nutrition* 145 (8): 1740-47. <https://doi.org/10.3945/jn.115.212837>.
- Borel, Patrick, P Grolier, M Armand, A Partier, H Lafont, D Lairon, et V Azais-Braesco. 1996. « Carotenoids in Biological Emulsions: Solubility, Surface-to-Core Distribution, and Release from Lipid Droplets », 12.
- Borel, Patrick, Georg Lietz, Aurélie Goncalves, Fabien Szabo de Edelenyi, Sophie Lecompte, Peter Curtis, Louisa Goumidi, et al. 2013. « CD36 and SR-BI Are Involved in Cellular Uptake of Provitamin A Carotenoids by Caco-2 and HEK Cells, and Some of Their Genetic Variants Are Associated with Plasma Concentrations of These Micronutrients in Humans ». *The Journal of Nutrition* 143 (4): 448 - 56. <https://doi.org/10.3945/jn.112.172734>.
- Breithaupt, Dietmar E, Ameneh Bamedi, et Ursula Wirt. 2002. « Carotenol Fatty Acid Esters: Easy Substrates for Digestive Enzymes? » *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 132 (4): 721 - 28. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00096-9](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00096-9).
- Breithaupt, Dietmar E., Philipp Weller, Maike Wolters, et Andreas Hahn. 2003. « Plasma Response to a Single Dose of Dietary β -Cryptoxanthin Esters from Papaya (*Carica Papaya* L.) or Non-Esterified β -Cryptoxanthin in Adult Human Subjects: A Comparative Study ». *British Journal of Nutrition* 90 (4): 795 - 801. <https://doi.org/10.1079/BJN2003962>.
- Büyükkaragöz, Aylin, Murat Bas, Duygu Sağlam, et Şaziye Ecem Cengiz. 2014. « Consumers' Awareness, Acceptance and Attitudes towards Functional Foods in Turkey: Functional Food and Consumers ». *International Journal of Consumer Studies* 38 (6): 628-35. <https://doi.org/10.1111/ijcs.12134>.

C

- Castenmiller, JJ, et CE West. 1998. « Bioavailability and bioconversion of carotenoids », n° 18: 19-38.
- Charalampopoulos, D, S.S Pandiella, et C Webb. 2003. « Evaluation of the Effect of Malt, Wheat and Barley Extracts on the Viability of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria under Acidic Conditions ». *International Journal of Food Microbiology* 82 (2): 133-41. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00248-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00248-9).
- Chen, Bingcan, David Julian McClements, et Eric Andrew Decker. 2013a. « Design of Foods with Bioactive Lipids for Improved Health ». *Annual Review of Food Science and Technology* 4 (1): 35-56. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032112-135808>.
- . 2013b. « Design of Foods with Bioactive Lipids for Improved Health ». *Annual Review of Food Science and Technology* 4 (1): 35-56. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032112-135808>.

- Cilla, Antonio, Amparo Alegría, Begoña de Ancos, Concepción Sánchez-Moreno, M. Pilar Cano, Lucía Plaza, Gonzalo Clemente, María J. Lagarda, et Reyes Barberá. 2012. « Bioaccessibility of Tocopherols, Carotenoids, and Ascorbic Acid from Milk- and Soy-Based Fruit Beverages: Influence of Food Matrix and Processing ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (29): 7282 - 90. <https://doi.org/10.1021/jf301165r>.
- CIRAD. 2010. « Projet AFTER ». <https://www.after-fp7.eu/>.
- Clegg, K. M. 1956. « The Application of the Anthrone Reagent to the Estimation of Starch in Cereals ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 7 (1): 40 - 44. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740070108>.
- Clifton, Peter M., Manny Noakes, Donna Ross, Andriana Fassoulakis, Marja Cehun, et Paul Nestel. 2004. « High Dietary Intake of Phytosterol Esters Decreases Carotenoids and Increases Plasma Plant Sterol Levels with No Additional Cholesterol Lowering ». *Journal of Lipid Research* 45 (8): 1493-99. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400074-JLR200>.
- Commission Européenne. 2002. « General View of the Scientific Committee on Food on the Long-Term Effects of the Intake of Elevated Levels of Phytosterols from Multiple Dietary Sources, with Particular Attention to the Effects on β -Carotene », 23.
- . 2004. « RÈGLEMENT (CE) No 608/2004 DE LA COMMISSION concernant l'étiquetage des aliments et ingrédients alimentaires avec adjonction de phytostérols, esters de phytostérol, phytostanols et/ou esters de phytostanol ». <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004R0608&from=FR>.

D

- Dash, S, C Xiao, C Morgantini, et GF Lewis. 2015. « New Insights into the Regulation of Chylomicron Production » 35.
- Davis, Harry R., et Scott W. Altmann. 2009. « Niemann–Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an Intestinal Sterol Transporter ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791 (7): 679-83. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.01.002>.
- Descalzo, Adriana María, Sergio Aníbal Rizzo, Adrien Servent, Luciana Rossetti, Marc Lebrun, Carolina Daiana Pérez, Renaud Boulanger, Christian Mestres, Dominique Pallet, et Claudie Dhuique-Mayer. 2018. « Oxidative Status of a Yogurt-like Fermented Maize Product Containing Phytosterols ». *Journal of Food Science and Technology* 55 (5): 1859-69. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3102-5>.
- Desmarchelier, Charles, et Patrick Borel. 2017. « Overview of Carotenoid Bioavailability Determinants: From Dietary Factors to Host Genetic Variations ». *Trends in Food Science & Technology* 69 (novembre): 270 - 80. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.002>.
- . 2018. « Bioavailability of Vitamin E ». In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 1181-96. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809954-4.00052-9>.
- Dhuique-Mayer, Claudie, Patrick Borel, Emmanuelle Reboul, Bertrand Caporiccio, Pierre Besancon, et Marie-Josèphe Amiot. 2007. « β -Cryptoxanthin from Citrus Juices: Assessment of Bioaccessibility Using an in Vitro Digestion/Caco-2 Cell Culture

- Model ». *British Journal of Nutrition* 97 (05): 883. <https://doi.org/10.1017/S0007114507670822>.
- Dhuique-Mayer, Claudie, Adrien Servent, Adriana Descalzo, Claire Mouquet-Rivier, Marie-Josèphe Amiot, et Nawel Achir. 2016. « Culinary Practices Mimicking a Polysaccharide-Rich Recipe Enhance the Bioaccessibility of Fat-Soluble Micronutrients ». *Food Chemistry* 210 (novembre): 182 - 88. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.037>.
- Dhuique-Mayer, Claudie, Adrien Servent, Charlotte Messan, Nawel Achir, Manuel Dornier, et Yery Mendoza. 2018. « Bioaccessibility of Biofortified Sweet Potato Carotenoids in Baby Food: Impact of Manufacturing Process ». *Frontiers in Nutrition* 5 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00098>.
- Drewnowski, Adam, et Carmen Gomez-Carneros. 2000. « Bitter Taste, Phytonutrients, and the Consumer: A Review ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 72 (6): 1424-35. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.6.1424>.
- Drover, Victor A., David V. Nguyen, Claire C. Bastie, Yolanda F. Darlington, Nada A. Abumrad, Jeffrey E. Pessin, Erwin London, Daisy Sahoo, et Michael C. Phillips. 2008. « CD36 Mediates Both Cellular Uptake of Very Long Chain Fatty Acids and Their Intestinal Absorption in Mice ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (19): 13108 - 15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708086200>.
- During, Alexandrine, George Albaugh, et J Cecil Smith. 1998. « Characterization of B-Carotene 15,15'-Dioxygenase Activity in TC7 Clone of Human Intestinal Cell Line Caco-2 ». *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 249 (2): 8.
- During, Alexandrine, Harry D. Dawson, et Earl H. Harrison. 2005. « Carotenoid Transport Is Decreased and Expression of the Lipid Transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 Is Downregulated in Caco-2 Cells Treated with Ezetimibe ». *The Journal of Nutrition* 135 (10): 2305-12. <https://doi.org/10.1093/jn/135.10.2305>.
- During, Alexandrine, M. Mahmood Hussain, Diane W. Morel, et Earl H. Harrison. 2002. « Carotenoid Uptake and Secretion by CaCo-2 Cells: β -Carotene Isomer Selectivity and Carotenoid Interactions ». *Journal of Lipid Research* 43 (7): 1086 - 95. <https://doi.org/10.1194/jlr.M200068-JLR200>.

E

- Ellis, Amy C., Tanja Dudenbostel, et Kristi Crowe-White. 2019. « Watermelon Juice: A Novel Functional Food to Increase Circulating Lycopene in Older Adult Women ». *Plant Foods for Human Nutrition* 74 (2): 200-203. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00719-9>.
- Etcheverry, Paz, Michael A. Grusak, et Lisa E. Fleige. 2012. « Application of in Vitro Bioaccessibility and Bioavailability Methods for Calcium, Carotenoids, Folate, Iron, Magnesium, Polyphenols, Zinc, and Vitamins B6, B12, D, and E ». *Frontiers in Physiology* 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00317>.

F

- Fakruddin, Md, Reaz Mohammad Mazumdar, et Khanjada Shahnewaj Bin Mannan. 2012. « Predictive Microbiology: Modeling Microbial Responses in Food ». *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)* 40 (2): 121. <https://doi.org/10.4038/cjsbs.v40i2.3928>.
- Fardet, Anthony, Anne Morise, Esther Kalonji, Irène Margaritis, et François Mariotti. 2017. « Influence of Phytosterol and Phytostanol Food Supplementation on Plasma Liposoluble Vitamins and Provitamin A Carotenoid Levels in Humans: An Updated Review of the Evidence ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 00-00. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1033611>.
- Fardet, Anthony, et Edmond Rock. 2018. « In Vitro and in Vivo Antioxidant Potential of Milks, Yoghurts, Fermented Milks and Cheeses: A Narrative Review of Evidence ». *Nutrition Research Reviews* 31 (01): 52-70. <https://doi.org/10.1017/S0954422417000191>.
- Faure, H, P Preziosi, A-M Roussel, S Bertrais, P Galan, S Hercberg, et A Favier. 2006. « Factors Influencing Blood Concentration of Retinol, α -Tocopherol, Vitamin C, and β -Carotene in the French Participants of the SU.VI.MAX Trial ». *European Journal of Clinical Nutrition*, 12.
- Faustino, Margarida, Mariana Veiga, Pedro Sousa, Eduardo Costa, Sara Silva, et Manuela Pintado. 2019. « Agro-Food Byproducts as a New Source of Natural Food Additives ». *Molecules* 24 (6): 1056. <https://doi.org/10.3390/molecules24061056>.
- Ferdinand Nzie Nzie. 2012. « Syndrome métabolique et traitement antipsychotique de seconde génération ». Nancy: Faculté de Médecine de Nancy.
- Fernandez, ML, et S Vega-Lopez. 2005. « Efficacy and safety of sitosterol in the management of blood cholesterol levels » 23 (1): 57-70.
- Fernández-García, Elisabet, Irene Carvajal-Lérida, Manuel Jarén-Galán, Juan Garrido-Fernández, Antonio Pérez-Gálvez, et Dámaso Hornero-Méndez. 2012. « Carotenoids Bioavailability from Foods: From Plant Pigments to Efficient Biological Activities ». *Food Research International* 46 (2): 438 - 50. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.007>.
- Ferruzzi, Mario G., John L. Lumpkin, Steven J. Schwartz, et Mark Failla. 2006. « Digestive Stability, Micellarization, and Uptake of β -Carotene Isomers by Caco-2 Human Intestinal Cells ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (7): 2780-85. <https://doi.org/10.1021/jf0530603>.
- Fiedor, Joanna, et Květoslava Burda. 2014. « Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease ». *Nutrients* 6 (2): 466 - 88. <https://doi.org/10.3390/nu6020466>.
- Fleshman, Matthew K., Gene E. Lester, Ken M. Riedl, Rachel E. Kopec, Sureshbabu Narayanasamy, Robert W. Curley, Steven J. Schwartz, et Earl H. Harrison. 2011. « Carotene and Novel Apocarotenoid Concentrations in Orange-Fleshed *Cucumis Melo* Melons: Determinations of β -Carotene Bioaccessibility and Bioavailability ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (9): 4448 - 54. <https://doi.org/10.1021/jf200416a>.

G

- García-Cayuela, Tomás, Beatriz Nuño-Escobar, Jorge Welti-Chanes, et M Pilar Cano. 2018. « In Vitro Bioaccessibility of Individual Carotenoids from Persimmon (*Diospyros Kaki* , Cv. Rojo Brillante) Used as an Ingredient in a Model Dairy Food: Carotenoid Bioaccessibility of Persimmon-Based Dairy Products ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98 (9): 3246-54. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8827>.
- García-Llatas, Guadalupe, Antonio Cilla, Amparo Alegría, et María Jesús Lagarda. 2015. « Bioavailability of Plant Sterol-Enriched Milk-Based Fruit Beverages: In Vivo and in Vitro Studies ». *Journal of Functional Foods* 14 (avril): 44 - 50. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.023>.
- García-Llatas, Guadalupe, et María Teresa Rodríguez-Estrada. 2011a. « Current and New Insights on Phytosterol Oxides in Plant Sterol-Enriched Food ». *Chemistry and Physics of Lipids* 164 (6): 607-24. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.06.005>.
- . 2011b. « Current and New Insights on Phytosterol Oxides in Plant Sterol-Enriched Food ». *Chemistry and Physics of Lipids* 164 (6): 607 - 24. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.06.005>.
- Gence, Laura, Adrien Servent, Patrick Poucheret, Abel Hiol, et Claudie Dhuique-Mayer. 2018. « Pectin Structure and Particle Size Modify Carotenoid Bioaccessibility and Uptake by Caco-2 Cells in Citrus Juices vs. Concentrates ». *Food & Function* 9 (6): 3523-31. <https://doi.org/10.1039/C8FO00111A>.
- Gerda, Endemann, Lawrence W. Stantan, Kip S. Madden, Carmen M. Bryant, R. Tyler White, et Andrew A. Protter. 1993. « CD36 Is a Receptor for Oxidized LowDensity Lipoprotein » 268 (16): 6.
- Ghosh, Kuntal, Mousumi Ray, Atanu Adak, Prabuddha Dey, Suman K. Halder, Arpan Das, Arijit Jana, et al. 2015. « Microbial, Saccharifying and Antioxidant Properties of an Indian Rice Based Fermented Beverage ». *Food Chemistry* 168 (février): 196-202. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.042>.
- Gies, Magali, Adriana Maria Descalzo, Adrien Servent, et Claudie Dhuique-Mayer. 2019. « Incorporation and Stability of Carotenoids in a Functional Fermented Maize Yogurt-like Product Containing Phytosterols ». *LWT* 111 (août): 105 - 10. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.103>.
- Giovannucci, E. 1999. « Tomatoes, Tomato-Based Products, Lycopene, and Cancer: Review of the Epidemiologic Literature ». *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 91 (4): 317-31. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.4.317>.
- Gleize, Béatrice, Marion Nowicki, Christophe Daval, Hana Koutnikova, et Patrick Borel. 2016. « Form of Phytosterols and Food Matrix in Which They Are Incorporated Modulate Their Incorporation into Mixed Micelles and Impact Cholesterol Micellarization ». *Molecular Nutrition & Food Research* 60 (4): 749 - 59. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500586>.
- Goncalves, Aurélie, Marielle Margier, Stéphanie Roi, Xavier Collet, Isabelle Niot, Pascale Goupy, Catherine Caris-Veyrat, et Emmanuelle Reboul. 2014. « Intestinal Scavenger Receptors Are Involved in Vitamin K₁ Absorption ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (44): 30743-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.587659>.
- Goncalves, Aurélie, Stéphanie Roi, Marion Nowicki, Isabelle Niot, et Emmanuelle Reboul. 2014. « Cluster-Determinant 36 (CD36) Impacts on Vitamin E Postprandial

- Response ». *Molecular Nutrition & Food Research* 58 (12): 2297 - 2306. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400339>.
- Granado-Lorencio, F., L. de las Heras, C. San Millán, F. J. Garcia-López, I. Blanco-Navarro, B. Pérez-Sacristán, et G. Domínguez. 2014. « β -Cryptoxanthin Modulates the Response to Phytosterols in Post-Menopausal Women Carrying NPC1L1 L272L and ABCG8 A632 V Polymorphisms: An Exploratory Study ». *Genes & Nutrition* 9 (5). <https://doi.org/10.1007/s12263-014-0428-0>.
- Granado-Lorencio, F., M.J. Lagarda, F.J. Garcia-López, L.M. Sánchez-Siles, I. Blanco-Navarro, A. Alegría, B. Pérez-Sacristán, et al. 2014. « Effect of β -Cryptoxanthin plus Phytosterols on Cardiovascular Risk and Bone Turnover Markers in Post-Menopausal Women: A Randomized Crossover Trial ». *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 24 (10): 1090-96. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2014.04.013>.
- Granado-Lorencio, F., B. Olmedilla-Alonso, C. Herrero-Barbudo, I. Blanconavarro, B. Perezsacristan, et S. Blazquezgarcia. 2007. « In Vitro Bioaccessibility of Carotenoids and Tocopherols from Fruits and Vegetables ». *Food Chemistry* 102 (3): 641-48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.043>.
- Granado-Lorencio, Fernando, Encarnación Donoso-Navarro, Luis Manuel Sánchez-Siles, Inmaculada Blanco-Navarro, et Belen Pérez-Sacristán. 2011. « Bioavailability of β -Cryptoxanthin in the Presence of Phytosterols: In Vitro and in Vivo Studies ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (21): 11819 - 24. <https://doi.org/10.1021/jf202628w>.
- Granato, Daniel, Gabriel F. Branco, Filomena Nazzaro, Adriano G. Cruz, et José A.F. Faria. 2010. « Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9 (3): 292-302. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00110.x>.
- Grune, Tilman, Georg Lietz, Andreu Palou, A. Catharine Ross, Wilhelm Stahl, Guangweng Tang, David Thurnham, Shi-an Yin, et Hans K. Biesalski. 2010. « β -Carotene Is an Important Vitamin A Source for Humans ». *The Journal of Nutrition* 140 (12): 2268S-2285S. <https://doi.org/10.3945/jn.109.119024>.
- Gunathilake, K.D.P.P., H.P. Vasantha Rupasinghe, et Nancy L. Pitts. 2013. « Formulation and Characterization of a Bioactive-Enriched Fruit Beverage Designed for Cardio-Protection ». *Food Research International* 52 (2): 535 - 41. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.051>.
- Guyot, Jean-Pierre. 2012. « Cereal-Based Fermented Foods in Developing Countries: Ancient Foods for Modern Research: Cereal-Based Fermented Foods ». *International Journal of Food Science & Technology* 47 (6): 1109-14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02969.x>.
- Gylling, Helena, Jogchum Plat, Stephen Turley, Henry N. Ginsberg, Lars Ellegård, Wendy Jessup, Peter J. Jones, et al. 2014. « Plant Sterols and Plant Stanols in the Management of Dyslipidaemia and Prevention of Cardiovascular Disease ». *Atherosclerosis* 232 (2): 346 - 60. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.11.043>.
- Gylling, Helena, et Piia Simonen. 2015. « Phytosterols, Phytostanols, and Lipoprotein Metabolism ». *Nutrients* 7 (9): 7965-77. <https://doi.org/10.3390/nu7095374>.

H

- Hauser, Helmut, James H. Dyer, Andreas Nandy, Miguel A. Vega, Moritz Werder, Egle Bieliauskaite, Franz E. Weber, et al. 1998. « Identification of a Receptor Mediating Absorption of Dietary Cholesterol in the Intestine [†] ». *Biochemistry* 37 (51): 17843-50. <https://doi.org/10.1021/bi982404y>.
- Heenan, C.N., M.C. Adams, R.W. Hosken, et G.H. Fleet. 2004. « Survival and Sensory Acceptability of Probiotic Microorganisms in a Nonfermented Frozen Vegetarian Dessert ». *LWT - Food Science and Technology* 37 (4): 461 - 66. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.11.001>.
- Hernández-Alvarez, E., I. Blanco-Navarro, B. Pérez-Sacristán, L.M. Sánchez-Siles, et F. Granado-Lorencio. 2016. « In Vitro Digestion-Assisted Development of a β -Cryptoxanthin-Rich Functional Beverage; in Vivo Validation Using Systemic Response and Faecal Content ». *Food Chemistry* 208 (octobre): 18 - 25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.119>.
- Hofman, Denise L., Vincent J. van Buul, et Fred J. P. H. Brouns. 2016. « Nutrition, Health, and Regulatory Aspects of Digestible Maltodextrins ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56 (12): 2091-2100. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.940415>.

I

- InnoviSCOP. 2016. « Installation pilote -Définition ». <http://www.innoviscop.com/definitions/installation-pilote>.
- INRA. 2016. « Qualité des produits céréaliers ». <http://www.angers-nantes.inra.fr/Toutes-les-actualites/qualite-des-produits-cerealiers>.

J

- Jeffery, Jennifer, Andreas Holzenburg, et Stephen King. 2012. « Physical Barriers to Carotenoid Bioaccessibility. Ultrastructure Survey of Chromoplast and Cell Wall Morphology in Nine Carotenoid-Containing Fruits and Vegetables ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92 (13): 2594 - 2602. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5767>.
- Jomova, Klaudia, et Marian Valko. 2013. « Health Protective Effects of Carotenoids and Their Interactions with Other Biological Antioxidants ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 70 (décembre): 102-10. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.054>.
- Jong, Ariënné de, Jogchum Plat, et Ronald P Mensink. 2003. « Metabolic Effects of Plant Sterols and Stanols (Review) ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 14 (7): 362-69. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(03\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(03)00002-0).

K

- Kailasapathy, K, D Supriadi, et J.A Hourigan. 1996. « Effect of partially replacing skim milk powder with whey protein concentrate on buffering capacity of yoghurt » 51 (2): 89-93.
- Kandylis, Panagiotis, Katerina Pissaridi, Argyro Bekatorou, Maria Kanellaki, et Athanasios A Koutinas. 2016. « Dairy and Non-Dairy Probiotic Beverages ». *Current Opinion in Food Science* 7 (février): 58-63. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.012>.
- Katan, Martijn B., Scott M. Grundy, Peter Jones, Malcolm Law, Tatu Miettinen, et Rodolfo Paoletti. 2003. « Efficacy and Safety of Plant Stanols and Sterols in the Management of Blood Cholesterol Levels » 78 (8): 965-78. <https://doi.org/10.4065/78.8.965>.
- Kaur, Navdeep, et Devinder Pal Singh. 2017. « Deciphering the Consumer Behaviour Facets of Functional Foods: A Literature Review ». *Appetite* 112 (mai): 167 - 87. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.01.033>.
- Kearney, J. 2010. « Food Consumption Trends and Drivers ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365 (1554): 2793 - 2807. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0149>.
- Kedia, Gopal, Ruohang Wang, Hemant Patel, et Severino S. Pandiella. 2007. « Use of Mixed Cultures for the Fermentation of Cereal-Based Substrates with Potential Probiotic Properties ». *Process Biochemistry* 42 (1): 65 - 70. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.07.011>.
- Kiefer, C., E. Sumser, M. F. Wernet, et J. von Lintig. 2002. « A Class B Scavenger Receptor Mediates the Cellular Uptake of Carotenoids in Drosophila ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (16): 10581 - 86. <https://doi.org/10.1073/pnas.162182899>.
- Knockaert, Griet, Lien Lemmens, Sandy Van Buggenhout, Marc Hendrickx, et Ann Van Loey. 2012. « Changes in β -Carotene Bioaccessibility and Concentration during Processing of Carrot Puree ». *Food Chemistry* 133 (1): 60 - 67. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.066>.
- Kopec, Rachel E., et Mark L. Failla. 2018. « Recent Advances in the Bioaccessibility and Bioavailability of Carotenoids and Effects of Other Dietary Lipophiles ». *Journal of Food Composition and Analysis* 68 (mai): 16 - 30. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.06.008>.
- Korpela, R, J Tuomilehto, P Högström, L Seppo, V Piironen, P Salo-Väänänen, J Toivo, et al. 2006. « Safety Aspects and Cholesterol-Lowering Efficacy of Low Fat Dairy Products Containing Plant Sterols ». *European Journal of Clinical Nutrition* 60 (5): 633-42. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602362>.
- Kot, Anna M., Stanisław Błażej, Iwona Gientka, Marek Kieliszek, et Joanna Bryś. 2018. « Torulene and Torularhodin: “New” Fungal Carotenoids for Industry? » *Microbial Cell Factories* 17 (1). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0893-z>.
- Kot, Anna M., Stanisław Błażej, Agnieszka Kurcz, Iwona Gientka, et Marek Kieliszek. 2016. « Rhodotorula Glutinis—Potential Source of Lipids, Carotenoids, and Enzymes for Use in Industries ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (14): 6103 - 17. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7611-8>.
- Krystallis, Athanasios, George Maglaras, et Spyridon Mamalis. 2008. « Motivations and Cognitive Structures of Consumers in Their Purchasing of Functional Foods ». *Food*

Quality and Preference 19 (6): 525 - 38.
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2007.12.005>.

Kyriakoudi, Anastasia, et Maria Z. Tsimidou. 2018. « Properties of Encapsulated Saffron Extracts in Maltodextrin Using the Büchi B-90 Nano Spray-Dryer ». *Food Chemistry* 266 (novembre): 458-65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.038>.

L

Landrum, John T, et Richard A Bone. 2001. « Lutein, Zeaxanthin, and the Macular Pigment ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385 (1): 28 - 40.
<https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2171>.

Lee, Yuan-Ku, et Seppo Salminen. 1995. « The coming of age of probiotics » 6: 241-45.

Lemmens, Lien, Sandy Van Buggenhout, Indrawati Oey, Ann Van Loey, et Marc Hendrickx. 2009. « Towards a Better Understanding of the Relationship between the β -Carotene in Vitro Bio-Accessibility and Pectin Structural Changes: A Case Study on Carrots ». *Food Research International* 42 (9): 1323 - 30.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.04.006>.

Leroy, Frédéric, et Luc De Vuyst. 2004. « Lactic Acid Bacteria as Functional Starter Cultures for the Food Fermentation Industry ». *Trends in Food Science & Technology* 15 (2): 67 -78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>.

Liang, Rong, Charles F. Shoemaker, Xiaoqing Yang, Fang Zhong, et Qingrong Huang. 2013. « Stability and Bioaccessibility of β -Carotene in Nanoemulsions Stabilized by Modified Starches », n° 61: 1249–1257.
<https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/jf303967f>.

Lieshout, Machteld van, Clive E West, et Richard B van Breemen. 2003. « Isotopic Tracer Techniques for Studying the Bioavailability and Bioefficacy of Dietary Carotenoids, Particularly β -Carotene, in Humans: A Review1–3 », n° 77: 12-28.

M

Maiani, Giuseppe, María Jesús Periago Castón, Giovina Catasta, Elisabetta Toti, Isabel Goñi Cambrodón, Anette Bysted, Fernando Granado-Lorencio, et al. 2009. « Carotenoids: Actual Knowledge on Food Sources, Intakes, Stability and Bioavailability and Their Protective Role in Humans ». *Molecular Nutrition & Food Research* 53 (S2): S194-218.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200800053>.

Mapelli-Brahm, Paula, Joana Corte-Real, Antonio J. Meléndez-Martínez, et Torsten Bohn. 2017. « Bioaccessibility of Phytoene and Phytofluene Is Superior to Other Carotenoids from Selected Fruit and Vegetable Juices ». *Food Chemistry* 229 (août): 304-11. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.074>.

Mapelli-Brahm, Paula, Charles Desmarchelier, Marielle Margier, Emmanuelle Reboul, Antonio J. Meléndez-Martínez, et Patrick Borel. 2018. « Phytoene and Phytofluene Isolated from a Tomato Extract are Readily Incorporated in Mixed Micelles and

- Absorbed by Caco-2 Cells, as Compared to Lycopene, and SR-BI is Involved in their Cellular Uptake » 62.
- Marangoni, Franca, et Andrea Poli. 2010. « Phytosterols and Cardiovascular Health ». *Pharmacological Research* 61 (3): 193 - 99. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.01.001>.
- Marchetti, Nicola, Gianpiero Bonetti, Vincenzo Brandolini, Alberto Cavazzini, Annalisa Maietti, Giuseppe Meca, et Jordi Mañes. 2018. « Stinging Nettle (*Urtica Dioica* L.) as a Functional Food Additive in Egg Pasta: Enrichment and Bioaccessibility of Lutein and β -Carotene ». *Journal of Functional Foods* 47 (août): 547 - 53. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.062>.
- Marsh, Alan J., Colin Hill, R. Paul Ross, et Paul D. Cotter. 2014. « Fermented Beverages with Health-Promoting Potential: Past and Future Perspectives ». *Trends in Food Science & Technology* 38 (2): 113-24. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.05.002>.
- McKellar, Robin C., et Xuewen Lu. 2004. *Modeling microbial responses in food*. CRC Press.
- Medeiros, Anny Karoliny de Oliveira Cavalcanti, Camila de Carvalho Gomes, Mary Louize Querino de Araújo Amaral, Luciana Daniela Gurgel de Medeiros, Isaiane Medeiros, Dayanne Lopes Porto, Cícero Flávio Soares Aragão, Bruna Leal Lima Maciel, Ana Heloneida de Araújo Morais, et Thais Souza Passos. 2019. « Nanoencapsulation Improved Water Solubility and Color Stability of Carotenoids Extracted from Cantaloupe Melon (*Cucumis Melo* L.) ». *Food Chemistry* 270 (janvier): 562-72. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.099>.
- Menezes, Aline Galvão Tavares, Cíntia Lacerda Ramos, Disney Ribeiro Dias, et Rosane Freitas Schwan. 2018. « Combination of Probiotic Yeast and Lactic Acid Bacteria as Starter Culture to Produce Maize-Based Beverages ». *Food Research International* 111 (septembre): 187-97. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.065>.
- Mitcham, Elizabeth J., Carlos H. Crisosto, et Adel A. Kader. 2002. « Fruit Produce Facts - Melon Cantaloupe ». http://postharvest.ucdavis.edu/Commodity_Resources/Fact_Sheets/Datastores/Fruit_French/?uid=35&ds=806.
- Montero, P., M.M. Calvo, M.C. Gómez-Guillén, et J. Gómez-Estaca. 2016. « Microcapsules Containing Astaxanthin from Shrimp Waste as Potential Food Coloring and Functional Ingredient: Characterization, Stability, and Bioaccessibility ». *LWT - Food Science and Technology* 70 (juillet): 229-36. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.040>.
- Moussa, Myriam, Jean-François Landrier, Emmanuelle Reboul, Odette Ghiringhelli, Christine Coméra, Xavier Collet, Kati Fröhlich, Volker Böhm, et Patrick Borel. 2008. « Lycopene Absorption in Human Intestinal Cells and in Mice Involves Scavenger Receptor Class B Type I but Not Niemann-Pick C1-Like 1 ». *The Journal of Nutrition* 138 (8): 1432-36. <https://doi.org/10.1093/jn/138.8.1432>.

N

- Nakano, Takanari, Ikuo Inoue, et Takayuki Murakoshi. 2019. « A Newly Integrated Model for Intestinal Cholesterol Absorption and Efflux Reappraises How Plant Sterol Intake Reduces Circulating Cholesterol Levels ». *Nutrients* 11 (2): 310. <https://doi.org/10.3390/nu11020310>.

- Netzel, Michael, Gabriele Netzel, Dimitrios Zabaras, Leif Lundin, Li Day, Rama Addepalli, Simone A. Osborne, et Robert Seymour. 2011. « Release and Absorption of Carotenes from Processed Carrots (*Daucus Carota*) Using in Vitro Digestion Coupled with a Caco-2 Cell Trans-Well Culture Model ». *Food Research International* 44 (4): 868-74. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.058>.
- Niesor, Eric J., Evelyne Chaput, Jean-Luc Mary, Andreas Staempfli, Andreas Topp, Andrea Stauffer, Haiyan Wang, et Alexandre Durrwell. 2014. « Effect of Compounds Affecting ABCA1 Expression and CETP Activity on the HDL Pathway Involved in Intestinal Absorption of Lutein and Zeaxanthin ». *Lipids* 49 (12): 1233 - 43. <https://doi.org/10.1007/s11745-014-3958-8>.
- Noakes, Manny, P. M. Clifton, A. M. E. Doornbos, et E. A. Trautwein. 2005. « Plant Sterol Ester–Enriched Milk and Yoghurt Effectively Reduce Serum Cholesterol in Modestly Hypercholesterolemic Subjects ». *European Journal of Nutrition* 44 (4): 214-22. <https://doi.org/10.1007/s00394-004-0513-z>.
- Noakes, Manny, Peter Clifton, Fady Ntanios, William Shrapnel, Ian Record, et Jenny McInerney. 2002. « An Increase in Dietary Carotenoids When Consuming Plant Sterols or Stanols Is Effective in Maintaining Plasma Carotenoid Concentrations ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 75 (1): 79 - 86. <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.1.79>.

O

- O’Byrne, Sheila M., Nuttaporn Wongsiriroj, Jenny Libien, Silke Vogel, Ira J. Goldberg, Wolfgang Baehr, Krzysztof Palczewski, et William S. Blaner. 2005. « Retinoid Absorption and Storage Is Impaired in Mice Lacking Lecithin:Retinol Acyltransferase (LRAT) ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (42): 35647 - 57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507924200>.
- O’Connell, Orla F., Lisa Ryan, et Nora M. O’Brien. 2007. « Xanthophyll Carotenoids Are More Bioaccessible from Fruits than Dark Green Vegetables ». *Nutrition Research* 27 (5): 258-64. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2007.04.002>.
- Ozdal, Tugba, Esra Capanoglu, et Filiz Altay. 2013. « A Review on Protein–Phenolic Interactions and Associated Changes ». *Food Research International* 51 (2): 954-70. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>.

P

- Palczewski, Grzegorz, Jaume Amengual, Charles L. Hoppel, et Johannes von Lintig. 2014. « Evidence for compartmentalization of mammalian carotenoid metabolism », 2014.
- Parikh, Aakash, Siddharth Agarwal, et Kirtesh Raut. 2014. « A REVIEW ON APPLICATIONS OF MALTODEXTRIN IN PHARMACEUTICAL INDUSTRY ». *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 4 (4): 8.
- Pee, S. de, et CE. West. 1996. « Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency: a review of the literature ».

- Pee, S. de, CE West, D Permaesih, S Martuti, I Muhila, et JG Hautvast. 1998. « Orange fruit is more effective than are dark-green, leafy vegetables in increasing serum concentrations of retinol and beta-carotene in schoolchildren in Indonesia » 68 (5): 1058-67.
- Phan, Cam T, et Patrick Tso. 2001. « Intestinal Lipid Absorption and Transport », n° 6: 21.
- Prado, Flávera C., Jose L. Parada, Ashok Pandey, et Carlos R. Soccol. 2008. « Trends in Non-Dairy Probiotic Beverages ». *Food Research International* 41 (2): 111 - 23. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.010>.
- Puerari, Cláudia, Karina Teixeira Magalhães-Guedes, et Rosane Freitas Schwan. 2015. « Physicochemical and Microbiological Characterization of Chicha, a Rice-Based Fermented Beverage Produced by Umutina Brazilian Amerindians ». *Food Microbiology* 46 (avril): 210-17. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.009>.
- Punthakee, Zubin, Ronald Goldenberg, et Pamela Katz. 2018. « Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome ». *Canadian Journal of Diabetes* 42 (avril): S10-15. <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2017.10.003>.

Q

- Qian, Cheng, Eric Andrew Decker, Hang Xiao, et David Julian McClements. 2012. « Nanoemulsion Delivery Systems: Influence of Carrier Oil on β -Carotene Bioaccessibility ». *Food Chemistry* 135 (3): 1440 - 47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.047>.

R

- Reboul, Emmanuelle. 2013. « Absorption of Vitamin A and Carotenoids by the Enterocyte: Focus on Transport Proteins ». *Nutrients* 5 (9): 3563 - 81. <https://doi.org/10.3390/nu5093563>.
- . 2019. « Mechanisms of Carotenoid Intestinal Absorption: Where Do We Stand? » 11.
- Reboul, Emmanuelle, Aurélie Goncalves, Christine Comera, Romain Bott, Marion Nowicki, Jean-François Landrier, Dominique Jourdeuil-Rahmani, Claire Dufour, Xavier Collet, et Patrick Borel. 2011. « Vitamin D intestinal absorption is not a simple passivediffusion: Evidences for involvement of cholesteroltransporters », n° 55: 691–702. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000553>.
- Reboul, Emmanuelle, Alexis Klein, Florence Bietrix, Béatrice Gleize, Christiane Malezet-Desmoulin, Martina Schneider, Alain Margotat, Laurent Lagrost, Xavier Collet, et Patrick Borel. 2006. « Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) Is Involved in Vitamin E Transport across the Enterocyte ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (8): 4739-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509042200>.
- Reboul, Emmanuelle, Myriam Richelle, Eloïse Perrot, Christiane Desmoulin-Malezet, Victor Pirisi, et Patrick Borel. 2006. « Bioaccessibility of Carotenoids and Vitamin E from Their Main Dietary Sources ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (23): 8749-55. <https://doi.org/10.1021/jf061818s>.

- Ribaya-Mercado, Judy. 2002. « Influence of Dietary Fat on β -Carotene Absorption and Bioconversion into Vitamin A » 60 (4): 104 - 110. <https://doi.org/10.1301/00296640260085831>.
- Richelle, Myriam, Marc Enslem, Corinne Hager, Michel Groux, Isabelle Tavazzi, Jean-Philippe Godin, Alvin Berger, et al. 2004. « Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption.pdf ». *Am J Clin Nutr*, 2004, sect. 80.
- Rigotti, Attilio, Susan L. Acton, et Monty Krieger. 1995. « The Class B Scavenger Receptors SR-BI and CD36 Are Receptors for Anionic Phospholipids » 270 (27).
- Rivera-Espinoza, Yadira, et Yoja Gallardo-Navarro. 2010. « Non-Dairy Probiotic Products ». *Food Microbiology* 27 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.06.008>.
- Roberfroid, Marcel B. 2000. « Prebiotics and Probiotics: Are They Functional Foods? » *The American Journal of Clinical Nutrition* 71 (6): 1682S-1687S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.6.1682S>.
- Rocha, Glaucia Aguiar, Carmen Sílvia Fávaro-Trindade, et Carlos Raimundo Ferreira Grosso. 2012. « Microencapsulation of Lycopene by Spray Drying: Characterization, Stability and Application of Microcapsules ». *Food and Bioprocess Processing* 90 (1): 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.01.001>.
- Rodriguez-Amaya, Delia B. 2015. « Status of Carotenoid Analytical Methods and in Vitro Assays for the Assessment of Food Quality and Health Effects ». *Current Opinion in Food Science* 1 (février): 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.11.005>.
- Rossetti L., Langman L., Grigioni G. M., Biolatto A., Sancho A. M., Comerón E., et Descalzo A. M. 2010. « Antioxidant status and odour profile in milk from silage or lucerne-fed cows ». *Australian Journal of Dairy Technology* 65 (1): 3-9.
- Rosso, L, J R Lobry, S Bajard, et J P Flandrois. 1995. « Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and PH on Microbial Growth ». *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 61: 7.
- Rudkowska, Iwona, Suhad S. AbuMweis, Catherine Nicolle, et Peter J.H. Jones. 2008. « Cholesterol-Lowering Efficacy of Plant Sterols in Low-Fat Yogurt Consumed as a Snack or with a Meal ». *Journal of the American College of Nutrition* 27 (5): 588-95. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719742>.

S

- Sacca, Carole, Laurent Adinsi, Victor Anihouvi, Noel Akissoe, Generose Dalode, Christian Mestres, Annali Jacobs, Nomusa Dlamini, Dominique Pallet, et Djidjoho Joseph Hounhouigan. 2012. « Production, Consumption, and Quality Attributes of Akpan - a Yoghurt-like Cereal Product from West Africa ». *Food Chain* 2 (2): 207 - 220. <https://doi.org/10.3362/2046-1887.2012.018>.
- Sacca, Carole, Noël Akissoe, Djidjoho Joseph Hounhouigan, et Christian Mestres. 2014. « Optimisation du procédé traditionnel de fabrication du Akpan ».
- Saini, Ramesh Kumar, Shivraj Hariram Nile, et Se Won Park. 2015a. « Carotenoids from Fruits and Vegetables: Chemistry, Analysis, Occurrence, Bioavailability and Biological Activities ». *Food Research International* 76 (octobre): 735 - 750. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.047>.

- . 2015b. « Carotenoids from Fruits and Vegetables: Chemistry, Analysis, Occurrence, Bioavailability and Biological Activities ». *Food Research International* 76 (octobre): 735-50. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.047>.
- Saklayen, Mohammad G. 2018. « The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome ». *Current Hypertension Reports* 20 (2): 12. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>.
- Salaün, Françoise, Bernard Mietton, et Frédéric Gaucheron. 2005. « Buffering Capacity of Dairy Products ». *International Dairy Journal* 15 (2): 95 - 109. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.06.007>.
- Salmerón, I. 2017. « Fermented Cereal Beverages: From Probiotic, Prebiotic and Synbiotic towards Nanoscience Designed Healthy Drinks ». *Letters in Applied Microbiology* 65 (2): 114-24. <https://doi.org/10.1111/lam.12740>.
- Salmerón, Ivan, Keith Thomas, et Severino S. Pandiella. 2015. « Effect of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria on the Physicochemical Composition and Acceptance of Fermented Cereal Beverages ». *Journal of Functional Foods* 15 (mai): 106-15. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.012>.
- Sanders, Mary Ellen, et Jos Huis in't Veld. 1999. « Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues ». In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, 293-315. Springer. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-2027-4_15.
- Santos Fernandes, Sibeles, Michele Silveira Coelho, et Myriam De las Mercedes Salas-Mellado. 2019. *Chapter 7 - Bioactive Compounds as Ingredients of Functional Foods: Polyphenols, Carotenoids, Peptides From Animal and Plant Sources New*.
- Sato, Yuki, Risa Suzuki, Masaki Kobayashi, Shirou Itagaki, Takeshi Hirano, Toshihiro Noda, Satoshi Mizuno, Mitsuru Sugawara, et Ken Iseki. 2012. « Involvement of Cholesterol Membrane Transporter Niemann-Pick C1-Like 1 in the Intestinal Absorption of Lutein ». *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 15 (2): 256. <https://doi.org/10.18433/J38K56>.
- Scarmo, Stephanie, Brenda Cartmel, Haiqun Lin, David J. Leffell, Erin Welch, Prakash Bhosale, Paul S. Bernstein, et Susan T. Mayne. 2010. « Significant Correlations of Dermal Total Carotenoids and Dermal Lycopene with Their Respective Plasma Levels in Healthy Adults ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 504 (1): 34 - 39. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.07.004>.
- Schäfer, Klaus. 1998. « Accelerated Solvent Extraction of Lipids for Determining the Fatty Acid Composition of Biological Material ». *Analytica Chimica Acta* 358 (1): 69-77. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00587-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00587-4).
- Schmitz, Harold H., Christopher L. Poor, R. B. Wellman, et John W. Erdman Jr. 1991. « Concentrations of Selected Carotenoids and Vitamin A in Human Liver, Kidney and Lung Tissue » 121 (10): 1613-21. <https://doi.org/10.1093/jn/121.10.1613>.
- Schweiggert, Ralf M., Dominik Mezger, Franziska Schimpf, Christof B. Steingass, et Reinhold Carle. 2012. « Influence of Chromoplast Morphology on Carotenoid Bioaccessibility of Carrot, Mango, Papaya, and Tomato ». *Food Chemistry* 135 (4): 2736 - 42. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.035>.
- Schweiggert, Ralf M., Christof B. Steingass, Annerose Heller, Patricia Esquivel, et Reinhold Carle. 2011. « Characterization of Chromoplasts and Carotenoids of Red- and Yellow-Fleshed Papaya (*Carica Papaya* L.) ». *Planta* 234 (5): 1031 - 44. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1457-1>.

- Seña, Carlo dela, Kenneth M. Riedl, Sureshbabu Narayanasamy, Robert W. Curley, Steven J. Schwartz, et Earl H. Harrison. 2014. « The Human Enzyme That Converts Dietary Provitamin A Carotenoids to Vitamin A Is a Dioxygenase ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (19): 13661-66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.557710>.
- Septembre-Malaterre, Axelle, Fabienne Remize, et Patrick Poucheret. 2018. « Fruits and Vegetables, as a Source of Nutritional Compounds and Phytochemicals: Changes in Bioactive Compounds during Lactic Fermentation ». *Food Research International* 104 (février): 86-99. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.031>.
- Serafini, Mauro, Alessandra Stanzione, et Sebastiano Foddai. 2012. « Functional Foods: Traditional Use and European Legislation ». *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 63 (sup1): 7-9. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.637488>.
- Shahzad, Naiyer, Wajahatullah Khan, Shadab Md, Asgar Ali, Sundeep Singh Saluja, Sadhana Sharma, Faisal A. Al-Allaf, et al. 2017. « Phytosterols as a Natural Anticancer Agent: Current Status and Future Perspective ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 88 (avril): 786-94. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.068>.
- Sherwood, Lauralee. 2015. *Physiologie humaine*. 3^e éd. De Boeck. <https://books.google.fr/books?id=96qqDgAAQBAJ&pg=PR27&lpg=PR27&dq=fundamentals+of+human+physiology+lauralee+sherwood+traduction&source=bl&ots=iO7mZaxn1C&sig=ACfU3U0aliQAPrZP2kQnhJ8tmXpot4a87A&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKEwid9pr-06fkAhVoVBUIHWgbDxAQ6AEwA3oECAkQAQ#v=onepage&q=digestion&f=false>.
- Siró, István, Emese Kápolna, Beáta Kápolna, et Andrea Lugasi. 2008. « Functional Food. Product Development, Marketing and Consumer Acceptance—A Review ». *Appetite* 51 (3): 456-67. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.05.060>.
- Soukoulis, Christos, et Torsten Bohn. 2018. « A Comprehensive Overview on the Micro- and Nano-Technological Encapsulation Advances for Enhancing the Chemical Stability and Bioavailability of Carotenoids ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58 (1): 1-36. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.971353>.
- Stanbury, Peter F., Allan Whitaker, et Stephen J. Hall. 1995. *Principles of Fermentation Technology*. Pergamon.
- Stephensen, Charles B. 2001. « VITAMIN A, INFECTION, AND IMMUNE FUNCTION * ». *Annual Review of Nutrition* 21 (1): 167 - 92. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.167>.
- Suárez-Estrella, Diego, Luisa Torri, Maria Ambrogina Pagani, et Alessandra Marti. 2018. « Quinoa Bitterness: Causes and Solutions for Improving Product Acceptability: Quinoa Bitterness: Causes and Solutions ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98 (11): 4033-41. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8980>.

T

- Tanumihardjo, Sherry A. 2002. « Factors Influencing the Conversion of Carotenoids to Retinol: Bioavailability to Bioconversion to Bioefficacy ». *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 72 (1): 40 - 45. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.72.1.40>.
- Terpstra, Valeska, Edwin S. van Amersfoort, Agnes G. van Velzen, Johan Kuiper, et Theo J. C. van Berkel. 2000. « Hepatic and Extrahepatic Scavenger Receptors: Function in

- Relation to Disease ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (8): 1860 - 72. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.8.1860>.
- Thomsen, A B, H B Hansen, C Christiansen, H Green, et A Berger. 2004. « Effect of Free Plant Sterols in Low-Fat Milk on Serum Lipid Profile in Hypercholesterolemic Subjects ». *European Journal of Clinical Nutrition* 58 (6): 860 - 70. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601887>.
- Toti, Elisabetta, C.-Y. Oliver Chen, Maura Palmery, Débora Villaño Valencia, et Ilaria Peluso. 2018. « Non-Provitamin A and Provitamin A Carotenoids as Immunomodulators: Recommended Dietary Allowance, Therapeutic Index, or Personalized Nutrition? » *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018: 1 - 20. <https://doi.org/10.1155/2018/4637861>.
- Trautwein, Elke A., Guus S. M. J. E. Duchateau, Yuguang Lin, Sergey M. Mel'nikov, Henri O. F. Molhuizen, et Fady Y. Ntanios. 2003. « Proposed Mechanisms of Cholesterol-Lowering Action of Plant Sterols ». *European Journal of Lipid Science and Technology* 105 (34): 171-85. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200390033>.

V

- Van den Berg, H. (1999). Carotenoid Interactions. *Nutrition Reviews* 57 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1999.tb01769.x>
- Van Loo-Bouwman, Carolien A., Ton H. J. Naber, Richard B. van Breemen, Dongwei Zhu, Heleen Dicke, Els Siebelink, Paul J. M. Hulshof, Frans G. M. Russel, Gertjan Schaafsma, et Clive E. West. 2010. « Vitamin A Equivalency and Apparent Absorption of β -Carotene in Ileostomy Subjects Using a Dual-Isotope Dilution Technique ». *British Journal of Nutrition* 103 (12): 1836 - 43. <https://doi.org/10.1017/S0007114509993849>.
- Van Soest, P.J., J.B. Robertson, et B.A. Lewis. 1991. « Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition ». *Journal of Dairy Science* 74 (10): 3583 - 97. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- Vecchio, Riccardo, Ellen J. Van Loo, et Azzurra Annunziata. 2016. « Consumers' Willingness to Pay for Conventional, Organic and Functional Yogurt: Evidence from Experimental Auctions: Consumer WTP for Conventional, Organic and Functional Yogurt ». *International Journal of Consumer Studies* 40 (3): 368 - 78. <https://doi.org/10.1111/ijcs.12264>.
- Vinderola, C.G., et J.A. Reinheimer. 2003. « Lactic Acid Starter and Probiotic Bacteria: A Comparative "in Vitro" Study of Probiotic Characteristics and Biological Barrier Resistance ». *Food Research International* 36 (9 - 10): 895 - 904. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00098-X).
- Volpe, Robert, Leena Niittynen, Riitta Korpela, Cesare Sirtori, Antonello Bucci, Nadia Fraone, et Franco Pazzucconi. 2001. « Effects of Yoghurt Enriched with Plant Sterols on Serum Lipids in Patients with Moderate Hypercholesterolaemia ». *British Journal of Nutrition* 86 (02): 233. <https://doi.org/10.1079/BJN2001395>.

W

- Wang, Chung-Yi, Sz-Jie Wu, et Yuan-Tay Shyu. 2013. « Antioxidant Properties of Certain Cereals as Affected by Food-Grade Bacteria Fermentation ». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117 (4): 449-56. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.10.002>.
- Wang, Lu, J Michael Gaziano, Edward P Norkus, Julie E Buring, et Howard D Sesso. 2008. « Associations of Plasma Carotenoids with Risk Factors and Biomarkers Related to Cardiovascular Disease in Middle-Aged and Older Women ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 88 (3): 747-54. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.3.747>.
- Wang, Taoran, Shin Soyama, et Yangchao Luo. 2016. « Development of a Novel Functional Drink from All Natural Ingredients Using Nanotechnology ». *LWT* 73 (novembre): 458-66. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.050>.
- Wongsiriroj, Nuttaporn, Roseann Piantedosi, Krzysztof Palczewski, Ira J. Goldberg, Thomas P. Johnston, Ellen Li, et William S. Blaner. 2008. « The Molecular Basis of Retinoid Absorption: A Genetic Dissection ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (20): 13510-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800777200>.
- Woyengo, T A, V R Ramprasath, et P J H Jones. 2009. « Anticancer Effects of Phytosterols ». *European Journal of Clinical Nutrition* 63 (7): 813 - 20. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.29>.

Y

- Yi, Jiang, Yue Li, Fang Zhong, et Wallace Yokoyama. 2014. « The Physicochemical Stability and in Vitro Bioaccessibility of Beta-Carotene in Oil-in-Water Sodium Caseinate Emulsions ». *Food Hydrocolloids* 35 (mars): 19 - 27. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.025>.

Z

- Zhang, Ruojie, Zipei Zhang, Liqiang Zou, Hang Xiao, Guodong Zhang, Eric Andrew Decker, et David Julian McClements. 2016. « Enhancement of Carotenoid Bioaccessibility from Carrots Using Excipient Emulsions: Influence of Particle Size of Digestible Lipid Droplets ». *Food & Function* 7 (1): 93-103. <https://doi.org/10.1039/C5FO01172H>.

ANNEXES

Liste des Annexes

Annexe 1 : Poster présenté aux JFN 2017

Annexe 2 : Fiche des descripteurs – Analyse sensorielle descriptive

Annexe 3 : Fiche de dégustation – Analyse sensorielle descriptive

Annexe 4 : Fiche de dégustation – Analyse sensorielle hédonique

Annexe 5 : Attestation de sélection au Parcours Doctoral Agreenium

Annexe 6 : Prix pour l'internationalisation des thèses, Céréales Vallée – Lauréats 2018

Annexe 7 : Article CIRAD sur le Concours MT180 2018

Annexe 1

Stabilité et bioaccessibilité de phytonutriments liposolubles lors de la fabrication d'un aliment fermenté à base de maïs

Gies Magali¹, Descaizo Adriana-Maria^{1,2}, Servent Adrien¹, Dhuique-Mayer Claudie^{1*}

¹ CIRAD, UMR Qualisud, 73 avenue J.-F. Breton, 34398 Montpellier Cedex 5, France

² Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA-LABINTEX, Argentina

*Corresponding author: claudie.dhuique-mayer@cirad.fr

Introduction et but de l'étude

Le développement d'aliments fonctionnels fermentés à base de céréales est une alternative aux produits laitiers commercialisés. Ces aliments sont rendus fonctionnels par l'ajout de phytonutriments tels que les caroténoïdes, phytostérols et tocophérols.

L'objectif de ce travail est d'étudier le devenir de composés bioactifs (β -cryptoxanthine (bcx), β -carotène (bc), lycopène (lyc), α -tocophérol (atoc) et sitostérol (sit)) ainsi que leur bioaccessibilité au cours de la fabrication d'un aliment fonctionnel fermenté à base de maïs. Cette étude est primordiale pour l'aspect nutritionnel du produit final.



Figure 1. Diagramme de fabrication.

Matériels et méthodes

Le procédé de fabrication de ce produit comprend cinq opérations unitaires (Figure 1). Des phytostérols dispersibles, co-associés à des tocophérols, ont été incorporés, ainsi que des lyophilisats de fruits (melon et papaye), sources de caroténoïdes. Les starters bactériens ajoutés sont *Lactobacillus plantarum* (CNCM I-3069) et *Lactobacillus casei* (CNCM I-4592) en proportion 50-50 et de concentration 1.10⁶ UFC/g. Les phytonutriments ont été analysés par UPLC-DAD-Fluorescence. La bioaccessibilité (i.e. le transfert dans les micelles) a été évaluée à l'aide d'un système de digestion *in vitro* [1].

Résultats

- La co-fermentation a permis d'obtenir une concentration finale minimum de 10⁹ UFC/g, qui est optimale pour un effet probiotique (Figure 2).
- Les pertes en caroténoïdes, dues à la cuisson, sont relativement peu importantes et s'étalent de 19 à 28 % (p < 0,05). La stabilité des atoc et sit est démontrée durant la fabrication, incluant cuisson et fermentation (Figure 3).
- La bioaccessibilité des caroténoïdes après 15 h de fermentation est fonction de leur polarité : bcx 30 % > bc 28 % > lyc 5 %. Les atoc sont micellarisés à 94 %, contrairement aux sit avec 1,6 % (Figure 4). Le bc et le lyc sont significativement plus bioaccessibles lorsque les phytostérols sont présents (28 vs 14,8 % et 5,5 vs 2,9 %), contrairement à la bcx (36,5 vs 29,9 %) (Figure 5).

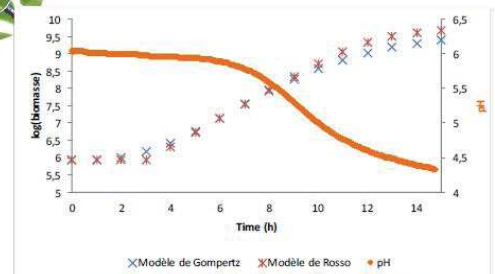


Figure 2. Cinétique de croissance du ratio 50-50 et chute de pH.

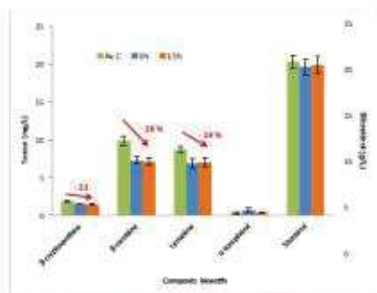


Figure 3. Stabilité des composés bioactifs au cours du procédé de fabrication.

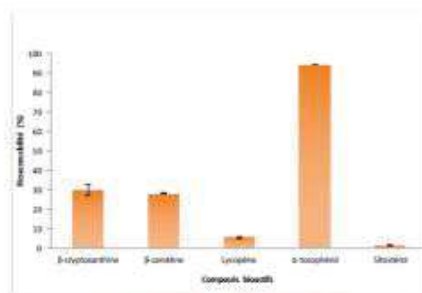


Figure 4. Bioaccessibilité des composés bioactifs du produit fermenté 15 h avec le ratio 50-50.

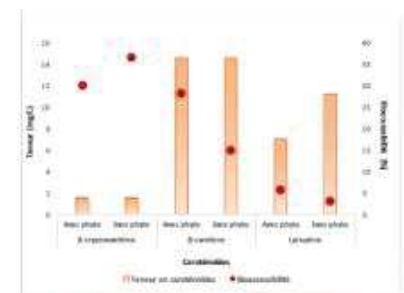


Figure 5. Teneur et bioaccessibilités des caroténoïdes dans le produit fermenté 15 h avec le ratio 50-50 - Avec et sans ajout de phytostérols.

Conclusion

Cette étude a permis de démontrer la stabilité des phytonutriments liposolubles incorporés dans une matrice alimentaire fermentée à base de céréales. Le choix du véhicule dispersif des phytostérols favoriserait la bioaccessibilité des caroténoïdes du produit.



Reference

[1] Dhuique-Mayer C., Servent A., Descaizo A.M., Mouton-Roux C., Boner M.L., Sève N. (2016) culinary practice: mimicking a polysaccharide-rich recipe enhance the bioaccessibility of fat-soluble micronutrients. Food Chemistry, 210, 162-168.



Annexe 2

Evaluation	Descripteur	Définition	Protocole d'évaluation	Echelle
VISUEL	Homogénéité	Formé d'éléments de même nature ou répartis de façon uniforme	A travers le contenant, évaluer l'uniformité du produit	0 : hétérogène (non uniforme) 10 : homogène (uniforme)
	Brillance	Résulte de la tendance d'une surface à réfléchir l'énergie lumineuse	A travers le contenant, évaluer le réfléchissement de la lumière à la surface du produit	0 : mat (pas de réfléchissement) 10 : brillance
ODEUR	Vert	Odeur d'herbe, légumes verts (concombre...)	Soulever le couvercle et évaluer la présence d'odeur verte	0 : Faible 10 : Elevé
	Fruité	Odeur de fruits (ananas, agrumes, pêches, carottes...)	Soulever le couvercle et évaluer la présence d'odeur de fruits frais	0 : Faible 10 : Elevé
	Fermenté	Odeur de fruits ou légumes trop mûrs (ex : choucroute), de céréales fermentées, de bière...	Soulever le couvercle et évaluer la présence d'odeur de fermenté, lait caillé, acide, céréales, voire moisi	0 : Faible 10 : Elevé
SAVEUR	Acide	Saveur fondamentale (acide citrique, tartrique...)	Prendre une partie de l'échantillon à l'aide de la cuillère, le mettre en bouche, le faire tourner en bouche et principalement sur la langue afin de détecter la saveur acide	0 : Faible 10 : Elevé
	Amer	Saveur fondamentale (solution de quinine ou de caféine)	Prendre une partie de l'échantillon à l'aide de la cuillère, le mettre en bouche, le faire tourner en bouche et principalement sur la langue afin de détecter la saveur amer	0 : Faible 10 : Elevé
IMPRESSION	Apreté	Sensation de rugosité en bouche	Prendre une partie de l'échantillon à l'aide de la cuillère, le mettre en bouche, le faire tourner en bouche afin de détecter la sensation d'âpreté	0 : Faible 10 : Elevé
	Astringence	Sensation de sécheresse en bouche provoquée par un phénomène de contraction, de plissement de la peau ou de la muqueuse buccale, produite par des substances telles que les tannins du kaki ou de la prune	Prendre une partie de l'échantillon à l'aide de la cuillère, le mettre en bouche, le faire tourner en bouche afin de détecter la sensation d'astringence	0 : Faible 10 : Elevé
TEXTURE EN BOUCHE	Onctueux	Propriété relative à la viscosité du produit en bouche	Prendre une partie de l'échantillon à l'aide de la cuillère, le mettre en bouche, évaluer l'intensité de la viscosité du produit allant de pâteux (niveau élevé de viscosité) à onctueux (niveau moyen de viscosité)	0 : pâteux 10 : onctueux

	Granuleux	Lié à la perception de la dimension, de la forme et du nombre de particules du produit	Prendre une partie de l'échantillon à l'aide de la cuillère, le mettre en bouche, évaluer la présence, le nombre et la taille de grains/amas/particules	0 : absence totale de particules/grains/amas 10 : présence de particules/grains/amas
AROME	Fruité	Arôme de tous les fruits cuits et frais (compotés ou agrumes, papaye, melon, pêche, mangue...)	Prendre une partie de l'échantillon à l'aide de la cuillère, le mettre en bouche, évaluer l'intensité de l'arôme	0 : Faible 10 : Elevé
	Melon	Arôme de melon	Prendre une partie de l'échantillon à l'aide de la cuillère, le mettre en bouche, évaluer l'intensité de l'arôme	0 : Faible 10 : Elevé
	Fruits Exotiques	Arôme de fruits exotiques (mangue, ananas, papaye...)	Prendre une partie de l'échantillon à l'aide de la cuillère, le mettre en bouche, évaluer l'intensité de l'arôme	0 : Faible 10 : Elevé
	Fermenté	Arôme de fruits ou légumes trop mûrs (ex : choucroute), de céréales fermentées, de bière etc.	Prendre une partie de l'échantillon à l'aide de la cuillère, le mettre en bouche, évaluer l'intensité de l'arôme	0 : Faible 10 : Elevé
	Grillé	Arôme de grillé (noisettes/amandes grillées, grillé du pain...)	Prendre une partie de l'échantillon à l'aide de la cuillère, le mettre en bouche, évaluer l'intensité de l'arôme	oui : présence non : absence
	Vert	Arôme d'herbe, légumes verts (concombre...)	Prendre une partie de l'échantillon à l'aide de la cuillère, le mettre en bouche, évaluer l'intensité de l'arôme	oui : présence non : absence
	Epicé	Arôme d'épice (cannelle, vanille...)	Prendre une partie de l'échantillon à l'aide de la cuillère, le mettre en bouche, évaluer l'intensité de l'arôme	oui : présence non : absence

Annexe 3

VISUEL	Homogénéité				
	Brillance				
ODEUR	Vert				
	Fruité				
	Fermenté				
SAVEUR	Acide				
	Amer				
IMPRESSION	Apreté				
	Astringence				
TEXTURE EN BOUCHE	Onctueux				
	Granuleux				
AROME	Fruité				
	Melon				
	Fruits exotiques				
	Fermenté				
	Grillé				
	Vert				
	Épicé				
Qualité Globale (note/10)					
Commentaire (autres descripteurs)					

Annexe 4



**Prueba de aceptabilidad en yogur de maíz, sabor papaya y melón
Adicionado con fitoesteroles y probióticos**

Edad: _____

Género: F M

¿Le gusta el yogur? Sí No

¿Consumes yogur? frecuentemente de vez en cuando ocasionalmente rara vez nunca

Usted recibió 2 muestras de yogur en recipientes codificados. **Pruebe primero la muestra de la izquierda**, anote el número e indique su opinión en relación a los siguientes atributos mediante una cruz en la frase que considere:

MUESTRA n°: _____

NIVEL DE AGRADO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	muchísimo	Me disgusta mucho	Me disgusta bastante	Me disgusta un poco	ni me gusta ni me disgusta	Me gusta un poco	Me gusta bastante	Me gusta mucho	Me gusta muchísimo
LA TEXTURA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	muchísimo	Me disgusta mucho	Me disgusta bastante	Me disgusta un poco	ni me gusta ni me disgusta	Me gusta un poco	Me gusta bastante	Me gusta mucho	Me gusta muchísimo
EL SABOR	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	muchísimo	Me disgusta mucho	Me disgusta bastante	Me disgusta un poco	ni me gusta ni me disgusta	Me gusta un poco	Me gusta bastante	Me gusta mucho	Me gusta muchísimo

Comentarios: _____

A continuación pruebe la muestra de la derecha, anote el número e indique su opinión en relación a los siguientes atributos mediante una cruz en la frase que considere:

MUESTRA n°: _____

NIVEL DE AGRADO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	muchísimo	Me disgusta mucho	Me disgusta bastante	Me disgusta un poco	ni me gusta ni me disgusta	Me gusta un poco	Me gusta bastante	Me gusta mucho	Me gusta muchísimo
LA TEXTURA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	muchísimo	Me disgusta mucho	Me disgusta bastante	Me disgusta un poco	ni me gusta ni me disgusta	Me gusta un poco	Me gusta bastante	Me gusta mucho	Me gusta muchísimo
EL SABOR	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	muchísimo	Me disgusta mucho	Me disgusta bastante	Me disgusta un poco	ni me gusta ni me disgusta	Me gusta un poco	Me gusta bastante	Me gusta mucho	Me gusta muchísimo

Annexe 5



ATTESTATION

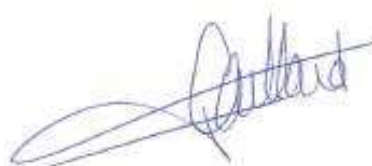
Je soussignée, Isabelle CAILLARD, certifie que :

Magali GIES

a été sélectionnée en janvier 2017 pour suivre le parcours sur 3 ans de l'École Internationale de Recherche d'Agreenium (EIR-A) dans le cadre de sa thèse « Conception d'un nouveau type d'aliment fonctionnel à base de céréales fermentées par ajout de composés bioactifs (caracténoïdes, phytostérols, tocophérols) ».

Le label EIRA valide une formation ouverte aux enjeux globaux du champ des agrosociences qui comprend une période de travail à l'international dans le cadre de la thèse de 3 mois au minimum et permet de développer des capacités d'analyse et d'innovation élargies.

Paris, le 9 mars 2017



Isabelle CAILLARD
Chargée de coopération
formations ingénieur, master, doctorat

Annexe 6



Prix pour l'internationalisation des thèses - 2^{ème} édition

Les lauréats 2018

 <p>Marion GAUTHIER UMR 1402 ECOSYS (Inra – AgroParisTech – Université Paris Saclay) Modélisation de la construction de l'architecture aérienne chez le blé par une approche structure-fonction</p> <p>✈ 6th International Symposium on Plant Growth Modeling, Simulation, Visualization and Applications Chine – 04/11/2018</p>	 <p>Kevin GAUTHIER UMR 385 BGPI (CIRAD – Inra – Montpellier SupAgro) Etude des flux de virus entre graminées sauvages et cultivées</p> <p>✈ APS Annual Meeting Etats-Unis – 04-07/08/2019</p>	 <p>Magali GIES UMR 95Qualisud (CIRAD – Montpellier SupAgro – Université de Montpellier – UAPV Avignon – Université de la Réunion – Université de Guyane) Conception d'un nouveau type d'aliment fonctionnel fermenté à base de maïs, par addition de composés bioactifs (caroténoïdes, phytostérols, tocophérols)</p> <p>✈ Food Science, Nutrition & Probiotics Allemagne – 08/06/2018</p>
 <p>Amélie TRIBOT UMR 6602 Institut Pascal (UCA – CNRS – SIGMA) Valorisation de la « partie lignine » des effluents de prétraitement de biomasse forestière : obtention et caractérisation d'agro-composites</p> <p>✈ Biocomposites Conference Cologne Allemagne – 14-15/11/2019</p>	 <p>Laurent CHAUNIER UMR 6144 GEPEA (CNRS – Université Bretagne Loire) Matériaux thermoplastiques à base de biopolymères pour leur impression 3D par dépôt de fil fondu</p> <p>✈ 34th International Conference of the Polymer Processing Society Taiwan – 21/05/2018</p>	<p>Chaque année, le Conseil Scientifique de Céréales Vallée qui réunit les experts scientifiques des filières grandes cultures récompense les thèses sur les grandes cultures les plus prometteuses.</p> <p>Grâce à un accompagnement financier, le prix Céréales Vallée pour l'internationalisation des thèses permet aux doctorants/docteurs d'aller présenter leurs travaux dans le congrès scientifique de leur choix à l'étranger.</p> <p style="text-align: center;">Pour en savoir plus : www.cereales-vallee.org</p>

Annexe 7



L'intranet du Cirad

Accès direct
Institution
Recherche & stratégie
Ressources humaines

> Les actualités > MA THESE EN 180 SECONDES. Cinq doctorantes du Cirad ont participé au concours

Les rubriques du portail

▼

Les actualités

Quoi de neuf sur les sites

Quoi de neuf dans les DR

Agenda

MA THESE EN 180 SECONDES

Cinq doctorantes du Cirad ont participé au concours



Elles s'appellent Estelle, Emeline, Clara, Magali et Clara ! Leur point commun ? Elles sont doctorantes au Cirad à Montpellier, à la Réunion et en Guyane. Et elles ont participé à la finale du concours régional « Ma thèse en 180 secondes » qui avait lieu le 21 mars à Montpellier, le 29 mars en Guyane et le 30 mars à la Réunion. Visionnez leur prestation.

Cinq doctorantes du Cirad, Magali Gies (QualiSud) et Emeline Ricciuti (BGPI) de Montpellier et Estelle Laboureur (Espace DEV), Clara Rohrlisch (PVBMT) de la Réunion, et Clara Zaremski (Agap) en Guyane ont participé au concours « Ma thèse en 180 secondes ». Si à Montpellier ils étaient 20 candidats, pré-sélectionnés parmi les meilleurs orateurs, ils étaient 12 à la Réunion et 9 en Guyane. Clara Zaremski a remporté le 3e prix dans sa région.

Voir aussi

[La finale du concours régional à Montpellier](#)

[Les interviews des concurrents réunionnais](#)

Bientôt, la vidéo de la concurrente de Guyane.

Toutes les ACTUS

[Filtrer par rubrique](#)

- ✚ Événements
- ✚ Monde
- ✚ Institutionnel
- ✚ Sciences
- ✚ Pratique
- ✚ Entre nous
- ✚ Ca bouge
- ✚ Montpellier
- ✚ Paris - Nogent
- ✚ Réunion - Mayotte
- ✚ Antilles - Guyane
- ✚ Etranger
- ✚ Toutes les actus

Les + lues (30 derniers jours)

MÉDIAS, Incendies en Amazonie et en Afrique: le Cirad sous le feu...

RÉSUMÉ : Face aux pathologies de malnutrition en croissance exponentielle en particulier dans les pays du Sud, le développement d'aliments fonctionnels à base de céréales fermentées représente une alternative aux produits laitiers déjà commercialisés. L'incorporation, la stabilité de composés bioactifs liposolubles tels que les caroténoïdes et les phytostérols, ainsi que leur devenir lors de la digestion gastro-duodénale doivent être étudiés afin de démontrer le potentiel nutritionnel de ce nouvel aliment. En effet, il est connu que les phytostérols diminuent la biodisponibilité des caroténoïdes. Le principal objectif de ces travaux a été de concevoir un aliment fonctionnel probiotique à base de maïs fermenté enrichi en caroténoïdes et phytostérols, et d'étudier la stabilité, la bioaccessibilité et l'absorption intestinale de ces composés liposolubles. La formulation et la standardisation du procédé, incluant la sélection de starters de fermentation afin d'obtenir un aliment probiotique, ont été mis au point. Au cours de la fabrication, la stabilité des composés liposolubles a montré un taux de rétention de 73 %. L'effet des phytostérols dispersibles sur la bioaccessibilité de la β -cryptoxanthine, du β -carotène et du lycopène de l'aliment fonctionnel a été évalué à l'aide d'un modèle de digestion *in vitro* simulant les conditions gastriques et duodénales. L'absorption intestinale des composés a également été mesurée en couplant le modèle de digestion *in vitro* aux cellules de type Caco-2 (TC7). L'étude a démontré que grâce à leur véhicule, les phytostérols dispersibles apportent un potentiel hypocholestérolémiant au produit, sans affecter la bioaccessibilité des carotènes. *In fine*, cet aliment fonctionnel a été optimisé d'un point de vue organoleptique et nutritionnel par l'utilisation de protéines sériques.

TITLE: Design of a probiotic functional cereal-based product, enriched with carotenoids and phytosterols: stability, bioaccessibility and intestinal absorption of fat-soluble compounds

ABSTRACT: Because of the exponential growth of malnutrition pathologies particularly in South countries, the development of functional foods based on fermented cereals represents an alternative to dairy products already marketed. The incorporation, the stability of lipophilic bioactive compounds such as carotenoids and phytosterols, as well as their behavior during the gastro-duodenal digestion have to be studied, in order to demonstrate the nutritional potential of this new product. Indeed, it is known that phytosterols decrease the carotenoid bioavailability. The main objective of this work was to design a probiotic functional food based on maize and enriched with carotenoids and phytosterols, and study the stability, the bioaccessibility and the intestinal absorption of these fat-soluble compounds. The formulation and the standardization of the manufacturing process, including the selection of starters for fermentation in order to obtain a probiotic product, were developed. During the production, the stability of fat-soluble compounds showed a retention level of 73%. The effect on dispersible phytosterols on the β -cryptoxanthine, β -carotene and lycopene bioaccessibilities was evaluated thanks to an *in vitro* digestion model mimicking the gastric and duodenal conditions. The intestinal absorption of these compounds was also estimate by crossing the *in vitro* digestion model with a Caco-2 cells model (TC7). The study demonstrated that thanks to their vehicles, dispersible phytosterols provide a potential cholesterol-lowering effect to this food, without affecting the carotene bioaccessibility. *In fine*, this functional food was optimized in terms of sensory and nutritional levels, by using whey protein isolates.

MOTS-CLÉS : Functional cereal-based product, fermented food, probiotic, carotenoid bioaccessibility, dispersible phytosterols

**ADRESSE DU LABORATOIRE : CIRAD-Persyst-UMR Qualisud TA-B95/16
34398 MONTPELLIER Cedex 5**
