



HAL
open science

Cinétiques d'hydrolyse des protéines et des lipides lors de digestions in vitro d'aliments modèles : influence des paramètres de structure des matrices

Damien Mat

► **To cite this version:**

Damien Mat. Cinétiques d'hydrolyse des protéines et des lipides lors de digestions in vitro d'aliments modèles : influence des paramètres de structure des matrices. Génie des procédés. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLA007 . tel-03123323

HAL Id: tel-03123323

<https://theses.hal.science/tel-03123323>

Submitted on 27 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.

NNT : ~~2017SACLAY007~~ 2017SACLAY007

THÈSE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY
PRÉPARÉE À AGROPARISTECH
(INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT
ET DE L'ENVIRONNEMENT)

ÉCOLE DOCTORALE N°581
Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

Spécialité de doctorat : Génie des Aliments

Par

M. Damien Mat

Cinétiques d'hydrolyse des protéines et des lipides lors de digestions *in vitro*
d'aliments modèles : influence des paramètres de structure des matrices

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 27 février 2017 :

Composition du Jury :

M. Dupont, Didier
Mme Turgeon, Sylvie
M. Carrière, Frédéric
Mme Michalski, Marie-Caroline
Mme Davila, Anne-Marie
Mme Souchon, Isabelle
Mme Michon, Camille
M. Le Feunteun Steven
Mme Gaudichon Claire

Directeur de recherche, INRA
Professeure de l'Université Laval
Directeur de recherche, CNRS
Directrice de recherche, INRA
Maître de conférence, AgroParisTech
Directrice de recherche, INRA
Professeure, AgroParisTech
Chargé de recherche, INRA
Professeure, AgroParisTech

Rapporteur
Rapporteuse
Examinateur, Président
Examinatrice
Examinatrice
Directrice de thèse
Co-directrice de thèse
Encadrant de thèse, Invité
Invitée

« So many people today – and even professional scientists – seem to me like somebody who has seen thousands of trees but has never seen a forest. »

Albert Einstein

Remerciements

La réussite de ce projet est bien sûr le fruit d'un effort collectif, d'une synergie entre les membres de la communauté qui m'a accueillie. Au-delà des compétences acquises la thèse est un moment particulier pour mûrir sa pensée, mais cela n'aurait pas été possible sans l'appui, l'ouverture, l'envie de transmettre et enfin la bienveillance de tant de personnes.

Ainsi, sans pouvoir être exhaustif :

Merci à mes encadrants, Isabelle Souchon, Camille Michon et Steven Le Feunteun. Trois profils différents dans lesquels j'ai pu me retrouver à tour de rôle. Nos échanges ont toujours été fructueux, pleins de respect et de ces petites choses qui m'ont donné à voir les qualités humaines que je chéris tant chez des scientifiques.

Merci à l'ensemble des personnes qui ont pu m'aider au sein de mes deux laboratoires d'accueil. Tout spécialement merci à Brigitte Deau et Anne-Marie Gibon, nos 'mamans' du labo ; à Gérard Cuvelier, sans qui je ne serais pas là aujourd'hui et qui a réussi le tour de force de joindre deux de mes passions, la nutrition et la physique ; à Thomas Cattenoz, ce puit de connaissances qui m'a mis sur les rails de la digestion et dont la sérénité est contagieuse ; à Dominique Swennen, qui a rendu les trajets vers Grignon si agréables ; à Pablo Granda et Gabrielle Moulin pour votre précieuse aide mais surtout votre humour, à Véronique Bosc, Delphine Huc, Marie-Noëlle Maillard, David Forest, Stéphanie Passot, et à tant d'autres.

Merci à ceux qui ont collaboré avec nous, ou qui on vu évoluer ma thèse jusqu'à la juger : les membre d'ALIAS, de mon comité et de mon jury de thèse. Vos apports ont toujours été bienveillants et m'ont fait me sentir partie intégrante de la recherche dès le départ du projet, et tout son long.

Merci aussi à mes co-doctorants. Notre situation d'apprentis chercheurs était toujours facilitée par le fait qu'on se serrait les coudes. Tout spécialement merci à Cassandra Leverrier, une compagne de science depuis déjà 4 ans et demi, nous nous ressemblons sur plusieurs

points qui font de nous les scientifiques que nous serons ; à mes compagnes de bureau Marine Moussier et Anne-Flore Monnet, nous formions un joyeux trio toujours prêt à vider nos sacs, et à se recharger à bloc ensuite, même s'il fallait perdre la boule pour ça ! Anne-Flore, je chéris ces moments, sois-en convaincue, d'ailleurs ils ne font que commencer...

Merci enfin à mes amis 'hors labo' : Jérémie, mon frère de cœur, et de vices ; Cécile et Hélène, mes sœurs de vadrouille ; Xavier, pour ta sensibilité infinie ; Nagy et Loïc, toujours fidèles à eux-mêmes et donc toujours à même de me sortir de mon monde, à toute heure ; Ernest, pour tes corrections, mais surtout ta jovialité ; et enfin ma belle-famille. Un merci tout spécial à Sylvie et Claire, pour ce formidable projet qui a donné naissance à Thomas, ce petit bonhomme qui ne cesse de grandir.

Et puis enfin merci à Thibaut, mon compagnon, pour ton soutien et ta compréhension au quotidien. Nos rébellions et nos exigences nous relient dans les sciences comme dans nos vies.

Table des matières

Introduction générale	1
1 Revue bibliographique	5
1 Les aliments, sources structurées de nutriments	7
2 Les émulsions huile dans eau et les protéines de lactosérum	14
3 La digestion des aliments chez l'Homme	24
4 Étude de la digestion : les principales approches	36
5 Effets de structure observés sur la digestion des émulsions	49
Objectifs et Stratégie	63
2 Digestions <i>in vitro</i> avec suivi pH-stat : effets de la structure de la matrice alimentaire sur l'hydrolyse intestinale des protéines et des lipides	67
Présentation de l'article	68
Abstract	69
1 Introduction	71
2 Materials and method	73
3 Results and discussion	79
4 Conclusion	84
Acknowledgments	84
À retenir	86
3 Digestion <i>in vitro</i> d'aliments solides : taille des particules et cinétiques des hydrolyses protéiques et lipidiques	87
Présentation de l'article	88
Abstract	89
1 Introduction	91
2 Materials and method	93
3 Results and discussion	97
4 Conclusions	106
Acknowledgments	107
À retenir	108
4 La titration par pH-stat pour suivre les cinétiques d'hydrolyse des protéines par la pepsine en conditions de pH statique et dynamique	109
Présentation de l'article	110
Abstract	111
1 Introduction	113
2 Theoretical considerations	115

3	Materials and method	117
4	Results and discussion	121
5	Conclusions	130
	Acknowledgments	130
	À retenir	131
5	Digestion <i>in vitro</i> séquentielle avec suivis pH-stat : influence des paramètres de structure et interaction entre protéolyse et lipolyse	133
	Présentation de l'article	134
	Abstract	135
1	Introduction	137
2	Materials and method	139
3	Results and discussion	145
4	Conclusions	155
	Acknowledgments	155
	À retenir	156
6	Discussion générale	157
1	Conception des émulsions et préparation de l'étude <i>in vivo</i>	157
2	Digestion <i>in vivo</i> des émulsions de différentes structures	162
3	Structure des aliments et digestion des protéines et des lipides	165
4	Des avancées méthodologiques	171
	Conclusions et Perspectives	175
	Le mot de la fin	179
	Références bibliographiques	181
	Annexes	197
A	Liste des communications	198
B	Liste des figures	199
C	Liste des tableaux	202
D	Article publié dans <i>Food Research International</i>	203
E	Posters	212

Introduction générale

La maîtrise de la santé par l'alimentation est conçue comme un apport adéquat de nutriments à l'organisme, de façon à optimiser les processus physiologiques. Les enquêtes récentes sur la population et la meilleure compréhension des mécanismes en jeu ont permis de relier un nombre important de maladies chroniques telles que l'obésité, la sarcopénie, le diabète de type 2, des maladies cardio-vasculaires et des cancers, à une alimentation inadaptée, associée à un manque d'activité physique. Ces maladies pointent vers un dérèglement de certains mécanismes métaboliques et soulignent le rôle préventif d'une bonne alimentation (Fardet and Boirie, 2013). Ainsi, une santé optimisée par l'alimentation passe en premier lieu par le choix avisé de ses aliments et l'adhésion à un régime équilibré. Preuve en est la conduite de 2001 à 2015 du Programme National Nutrition Santé (PNNS) qui scrute les comportements alimentaires en France et porte la mission sanitaire de diffuser des repères nutritionnels facilement identifiables parmi la population (Grandgury and Ministère du travail, de l'emploi et de la santé, 2011).

Au-delà de sa composition, l'aliment se caractérise par une organisation de ses constituants aux différentes échelles, obtenue grâce à différentes étapes de transformation des matières premières. Il en résulte une structure qui contribue, en complémentarité avec la composition, aux propriétés nutritionnelles et organoleptiques des produits (Aguilera, 2006; Donald, 2004; Fardet *et al.*, 2013). Lors de la mastication et de l'ingestion, l'aliment connaît un certain nombre de transformations (mécaniques, biochimiques) dans l'appareil digestif, dont le but est la métabolisation des nutriments. Elles provoquent une déconstruction de la matrice alimentaire de départ qui va influencer la cinétique de libération des nutriments et celle de leur métabolisation. Une meilleure prise en compte de ces effets devrait permettre d'orienter les procédés de fabrication afin d'obtenir des aliments au comportement au cours de la digestion en adéquation avec des objectifs bien identifiés et contribuant à la santé (Norton *et al.*, 2014).

Cette thèse s'inscrit dans l'un des trois projets soutenus par le Lidex ALIAS (Aliments Alimentation Santé) labélisé et financé par l'Idex Université Paris-Saclay. Ce projet rassemble des acteurs de l'INRA et d'AgroParisTech à travers quatre unités de recherche : **GMPA** (Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, UMR782, Thiverval-Grignon, France), **GENIAL** (Ingénierie Procédés Aliments, UMR1145, Massy, France), **PNCA** (Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, UMR914, Paris, France) et **MICALIS** (Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé, UMR1319, Jouy-en-Josas, France). Lors de la digestion, l'arrivée des nutriments à différents étages du tube digestif, ainsi que la prise en charge par l'écosystème microbien implanté au niveau du côlon d'une partie des nutriments non digérés, jouent sur le fonctionnement et la physiologie du tube digestif (motricité, sécrétions exocrines et endocrines, renouvellement épithélial, etc.), le comportement (satiété, prise alimentaire, etc.) et modifient la composition et l'activité du microbiote. Si ce postulat est établi, la relation aliment-physiologie-microbiote-santé demande encore à être explorée et mieux comprise. Les quatre partenaires impliqués dans le projet se sont donc intéressés à mettre en évidence à quel point, et par quels mécanismes, la structure de l'aliment, au-delà de sa composition, permet d'influencer le devenir des nutriments ingérés, le comportement et la physiologie de l'hôte, et de modifier le microbiote. Trois sujets de thèses complémentaires ont été définis (Figure 1). Le premier avait pour but de mettre au point des émulsions de même composition protéique et lipidique mais de structures différentes, permettant d'obtenir des comportements différents lors de la digestion. Ce manuscrit présente l'ensemble des résultats obtenus dans ce cadre. Le deuxième sujet s'est intéressé à l'évolution du microbiote induite par l'absorption des émulsions de structures différentes par des rats. Le troisième a abordé la modification de la physiologie des rats nourris avec ces émulsions.

Structure du document

Ce manuscrit débute par un état de l'art sur les différents aspects fondamentaux du sujet (Chapitre 1). L'aliment comme source structurée de nutriments est d'abord introduit, avant de se focaliser sur les émulsions protéinées. Le système digestif de l'Homme est alors décrit, ainsi que les moyens expérimentaux de le simuler. Enfin les facteurs d'influence de la structure des émulsions sur la libération des lipides et des protéines sont identifiés et discutés.

Le travail expérimental est ensuite exposé sous forme d'articles ou de projets d'articles, pour publications dans des revues à comité de lecture, en langue anglaise. Le chapitre 2 reproduit un premier article écrit et publié en 2015 dans *Food Research International*. Il présente

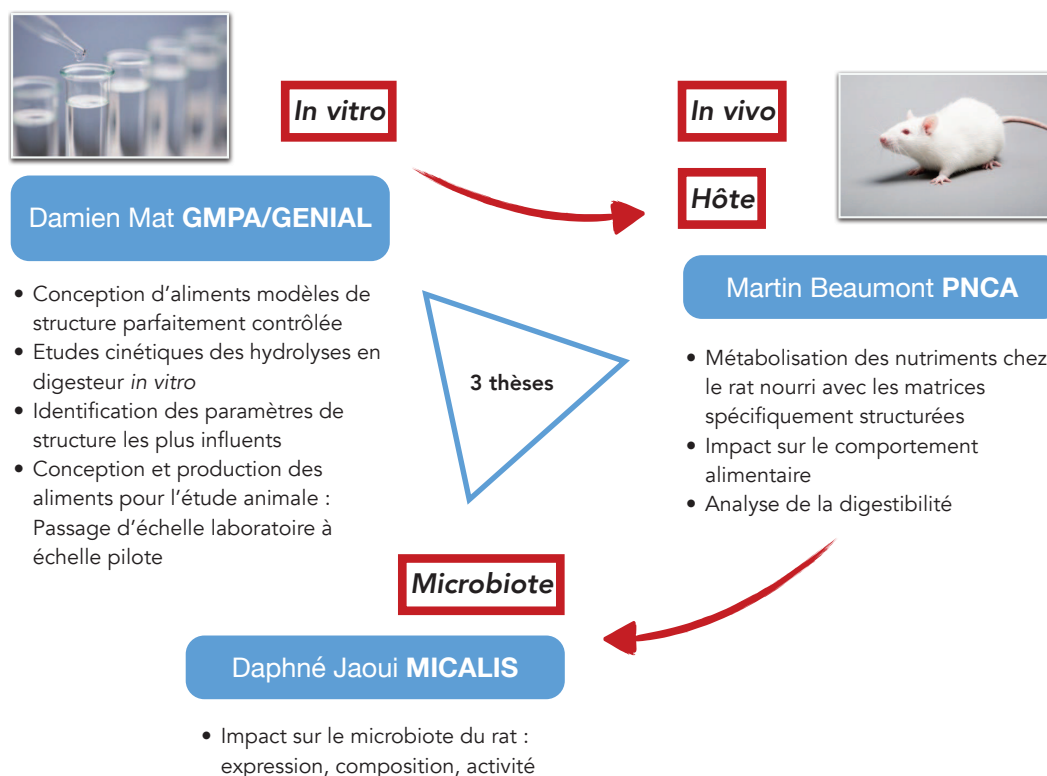


FIGURE 1 – Synergie entre les 3 thèses démarrant le projet ALIAS.

la mise au point d'une méthode de digestion *in vitro* couplée à une titration pH-stat durant la phase intestinale, et son application à l'étude de la digestion de 2 émulsions de structures bien différenciées. Le chapitre 3 se concentre sur l'effet de la taille des morceaux d'une émulsion gélifiée sur la digestion gastro-intestinale et sur la manière de mener le protocole avec une titration par pH-stat. Le chapitre 4 est un travail essentiellement méthodologique, réalisé avec une émulsion liquide. Il s'agit d'étendre l'usage du pH-stat à la phase gastrique pour suivre l'hydrolyse des protéines par la pepsine, à pH constant mais aussi au cours d'une acidification progressive du milieu. Le principal objectif de l'article final (Chapitre 5) est d'améliorer la compréhension des effets de structures, en essayant de les découpler et d'identifier des synergies protéolyse-lipolyse. Dans ce travail, un nombre plus important de matrices a été conçu pour avoir des niveaux de structuration intermédiaires par rapport aux 2 émulsions digérées dans les trois premières études. Le protocole de digestion a encore été raffiné et procède séquentiellement à des titrations pH-stat durant la phase gastrique puis la phase intestinale.

Une discussion générale permet de d'examiner à nouveau et de discuter l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce projet de thèse au regard des conclusions deux autres thèses du projet ALIAS et de proposer des perspectives de recherche.

Chapitre 1

Revue bibliographique

Sommaire

1	Les aliments, sources structurées de nutriments	7
1.1	Définir l'aliment	7
1.1.1	La composition d'un aliment	7
1.1.2	L'aliment comme produit structuré	7
1.2	Les macronutriments	10
1.2.1	Les lipides dans les aliments : définition et fonctions	10
1.2.2	Les protéines dans les aliments : définition et fonctions	12
2	Les émulsions huile dans eau et les protéines de lactosérum	14
2.1	Les émulsions huile dans eau	14
2.1.1	Définitions	14
2.1.2	Fabrication des émulsions	15
2.1.3	Stabilité des émulsions	16
2.2	Les protéines de lactosérum pour la structuration des émulsions	20
2.2.1	Composition et structure	21
2.2.2	Propriétés gélifiantes	22
2.2.3	Propriétés émulsifiantes	23
3	La digestion des aliments chez l'Homme	24
3.1	Les différentes phases de la digestion : anatomie, physiologie et fonctions	24
3.1.1	La bouche	25
3.1.2	L'estomac	27
3.1.3	L'intestin grêle	29
3.1.4	Le côlon	31
3.2	La digestion des lipides	32
3.2.1	La phase gastrique	32
3.2.2	La phase intestinale	34
3.3	La digestion des protéines	35
3.3.1	La phase gastrique	35
3.3.2	La phase intestinale	35
4	Étude de la digestion : les principales approches	36
4.1	Les approches <i>in vivo</i>	36
4.2	Les approches <i>in vitro</i>	37
4.2.1	Les modèles dynamiques	38
4.2.2	Les modèles statiques	40
4.2.3	Suivi d'hydrolyse par pH-stat	41
5	Effets de structure observés sur la digestion des émulsions	49

5.1	Taille des gouttelettes d'huile	50
5.2	Déstabilisation dans la bouche et l'estomac	52
5.3	Influence des émulsifiants	53
5.4	État de la phase dispersée	56
5.5	État de la phase continue	56
5.6	Interaction lipides-protéines : le cas des émulsions avec des protéines de lactosérum	58

1 Les aliments, sources structurées de nutriments

1.1 Définir l'aliment

1.1.1 La composition d'un aliment

Un aliment fabriqué est une association de matières premières et de constituants, transformés par différents traitements (mécaniques, thermiques, chimiques ou biologiques) dont les buts sont de lui conférer des fonctions d'usage recherchées. Apporter des nutriments à l'organisme est la première fonction des aliments. Ils se caractérisent donc par leur composition en substances nutritives qui peuvent être classés en **macronutriments** d'une part, et en **micronutriments** d'autre part, chacun pouvant être plus ou moins essentiel au fonctionnement de l'organisme. Les micronutriments comprennent les vitamines et les minéraux. Les macronutriments sont les glucides, les lipides et les protéines. Ils constituent la majorité de la diète en poids et en énergie. Ils proviennent de sources très diverses (animales, végétales...) et regroupent des molécules variées. Au-delà de leur fonction nutritive, les aliments fournissent aussi d'autres fonctions d'usage dont celle du plaisir.

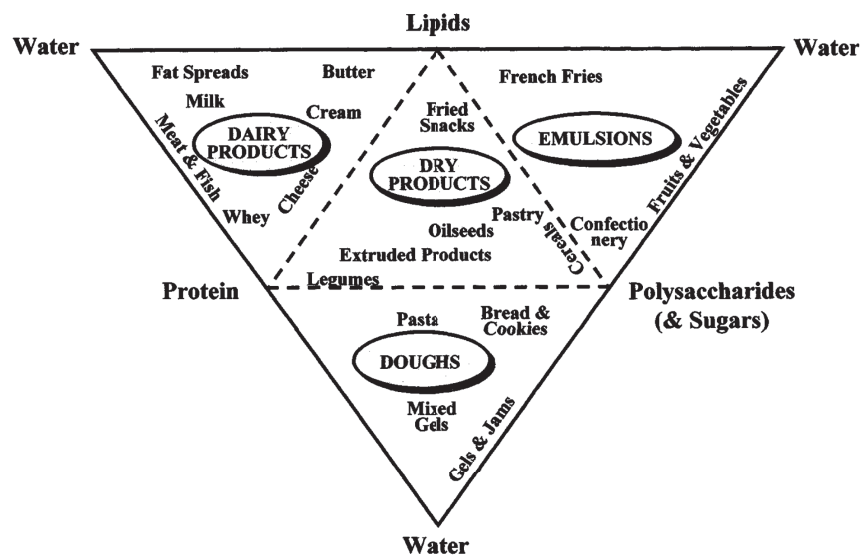


FIGURE 1.1 – Pyramide dépliée de la composition de produits alimentaires en lipides, glucides et protéines (Aguilera and Stanley, 1999).

1.1.2 L'aliment comme produit structuré

Décrire un aliment en listant ses composants est cependant très insuffisant (Aguilera, 2012; Aguilera *et al.*, 2000; Donald, 2004). Pour l'illustrer, les produits alimentaires de consommation courante peuvent être placés dans une pyramide en fonction de leur composition en eau,

en protéines, en lipides et en glucides (pyramide dépliée Fig. 1.1) (Aguilera and Stanley, 1999). Dans ce type de représentation, on trouvera dans un domaine réduit le lait, le fromage, la crème et le beurre, pour ne citer que des systèmes de la filière laitière. Pourtant, ils sont structurellement très éloignés, de sorte que la composition seule n'est pas toujours une manière pertinente de les comparer les uns par rapport aux autres.

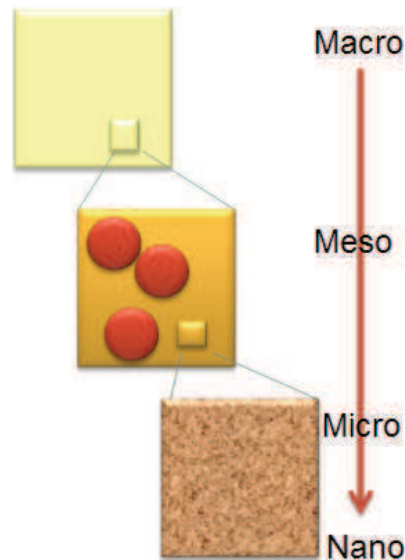


FIGURE 1.2 – Schéma de la structure de l'aliment à différentes échelles permettant de définir la notion de phases continues identifiables à différentes échelles et de phases dispersées constituées d'éléments dont il faut prendre en compte les interactions entre eux et avec la phase continue environnante.

Un aliment est un matériau composite structuré à différentes échelles spatiales allant du nanomètre au centimètre. Les constituants déjà préassemblés naturellement lorsqu'ils sont produits forment des objets de complexité et de taille extrêmement variées. Ils interagissent entre eux et avec le milieu qui les entoure et sont modifiés au cours de l'application du procédé pour donner les structures du produit fini. Les procédés, qui incluent souvent des traitements mécaniques et/ou thermiques, permettent de modifier la taille, la composition et les interactions de ces objets entre eux mais également avec la phase qui les entoure, dite phase continue, et dans laquelle ils sont dispersés. En fonction de l'échelle considérée, il est possible de définir plusieurs phases continues et plusieurs phases dispersées (Fig. 1.2 et Fig. 1.3). Ainsi, une phase qui apparaît continue et homogène à l'échelle mésoscopique peut se révéler constituée d'une phase dispersée dans une phase continue lorsque l'on zoome à l'échelle microscopique. Les propriétés rhéologiques du produit dépendent des propriétés des phases continues ainsi que du nombre, de la taille et des interactions des éléments dispersés (entre eux et vis-à-vis de la phase continue qui les entoure) distinguables à chacune des échelles mésoscopique et microscopique.

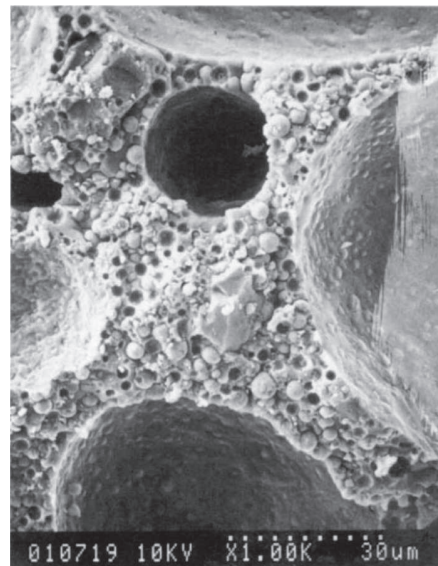


FIGURE 1.3 – Microscopie électronique d’une crème fouettée. Les espaces vides sont des bulles d’air de la structure en mousse. Des gouttelettes d’huile, plus petites et partiellement cristallisées et coalescées, sont dispersées dans le milieu entre les bulles d’air et stabilisent la structure (Aguilera and Stanley, 1999).

Les propriétés d’une matrice alimentaire découlent de la composition mais également de l’agencement et des interactions des constituants aux différentes échelles spatiales. Ce sont ces différentes propriétés qui contribuent au plaisir ou au déplaisir ressenti par le consommateur lorsqu’il déguste le produit. La connaissance de la construction de la matrice alimentaire au cours du procédé permet, de plus, de concevoir à façon des aliments pour qu’ils aient certaines propriétés recherchées, par un processus d’ingénierie inverse. Ainsi, il est possible de chercher à moduler l’apport de nutriments à l’organisme lors de la déconstruction de la matrice alimentaire dans le tube digestif en jouant sur la structure (Fig. 1.4) (Fardet *et al.*, 2013; Norton *et al.*, 2015, 2014; Turgeon and Rioux, 2011).

La grande majorité des aliments courants n’est pas constituée d’un seul type de nutriment. Par exemple, les produits céréaliers sont consommés principalement pour leur apport en glucides (amidon) et en protéines (protéines du gluten). Ils peuvent également contenir une part non négligeable de matière grasse comme dans les biscuits ou les gâteaux moelleux. Les produits laitiers, quant à eux, comprennent souvent des protéines et des lipides (plus rarement des glucides). Matière grasse et eau sont immiscibles. Tous les produits contenant des protéines et des lipides sont donc des émulsions « huile dans eau » ou « eau dans huile » en fonction de la proportion entre la phase aqueuse et la phase grasse mais également du procédé d’émulsification et de l’ordre d’incorporation des ingrédients. Ainsi le lait, les sauces,

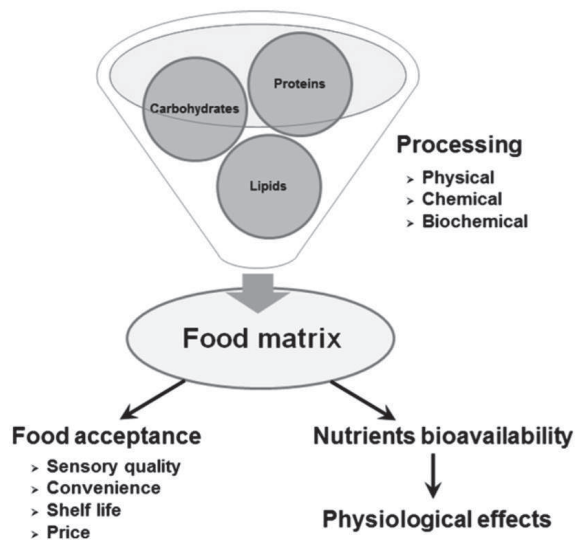


FIGURE 1.4 – Le procédé de fabrication de l'aliment permet, à partir d'une composition en nutriments, d'obtenir une structure aux propriétés d'intérêt : acceptabilité/perception de l'aliment et mise à disposition des nutriments lors de la digestion (Turgeon and Rioux, 2011).

les mayonnaïses, les yaourts, ou encore les pâtes à tartiner sont des émulsions huiles dans eau. L'organisation de la phase grasse (nombre, taille et lien à la phase continue) mais également les propriétés de la phase continue influencent très certainement le devenir des nutriments lors du passage de l'aliment dans le tube digestif.

1.2 Les macronutriments

Les lipides et les protéines sont présentés dans la suite. Ils sont associés ensemble dans les émulsions sur lesquelles porte le travail expérimental de cette thèse. Les glucides ne sont ici que brièvement abordés. Ils apportent de l'énergie (autant que les protéines) à l'organisme. Ce sont des molécules de type hydrates de carbone $(\text{CH}_2\text{O})_n$ assemblées en chaînes plus ou moins longues, et plus ou moins ramifiées (Nelson and Cox, 2012). Ils sont classés en sucres simples (dit rapides, apportant notamment le goût sucré aux aliments) et en polysaccharides (Norton *et al.*, 2015). Les polysaccharides digestibles sont les amidons, ou sucres lents, tandis que les indigestibles correspondent aux fibres alimentaires dont le rôle est important pour la fermentation dans les étages plus bas du tube digestif (Partie 3.1.4).

1.2.1 Les lipides dans les aliments : définition et fonctions

Les lipides regroupent par définition des composés insolubles ou très peu solubles dans l'eau (Christie and Han, 2012; Damodaran *et al.*, 2007; McClements, 2015). Les termes

huile, graisse, beurre ou cire désignent par convention l'état physique à température ambiante d'un corps lipidique sans être une description précise de sa composition chimique. Les lipides regroupent un certain nombre de molécules : mono-, di- et tri-acylglycérol (ou plus communément appelés glycérides), acides gras libres, stérols (cholestérols, phytostérols), phospholipides, etc. Certaines molécules sont entièrement apolaires tandis que d'autres sont amphiphiles, grâce à une tête polaire liée à une chaîne apolaire.

Les lipides sont une source majeure d'énergie métabolique dans la diète humaine en raison de leur haute densité énergétique de 37 kJ/g (Charrondière *et al.*, 2015). Ils sont appréciés pour leur rôle dans la texture des aliments et la perception des arômes (Dickinson, 1996). Ils sont indispensables à l'organisme car ils fournissent le matériau de base des parois cellulaires et entrent dans nombre de réactions physiologiques. Les lipides servent aussi de milieu de transport aux micronutriments liposolubles : caroténoïdes, antioxydants (tocophérols, flavonoïdes, polyphénols), vitamines (A, D) ((Damodaran, 1997; Damodaran *et al.*, 2007; McClements and Li, 2010b). La très grande majorité des lipides dans l'alimentation sont des **triacylglycérols (TAG)** : 97 % des 20 à 120 g/jour ingérés (Carey *et al.*, 1983; Lairon, 2009). On les trouve généralement à l'état dispersé au sein des cellules animales ou végétales, ou encore dans des émulsions alimentaires telles que le lait et les crèmes. Ils peuvent toutefois être consommés à l'état concentré comme dans des huiles végétales ou animales.

Chimiquement, un TAG est un triester d'une molécule de glycérol et de trois acides gras (Fig. 1.5). Les **acides gras (AG)** sont des acides carboxyliques R-COOH dont le radical R est une chaîne aliphatique de type hydrocarbure (Damodaran *et al.*, 2007). Les AG en position externe sont dits en position sn-1 et sn-3, tandis que l'AG central est en position sn-2 (Christie and Han, 2012). Les acides gras peuvent être classés selon leur taille de chaîne, correspondant au nombre d'atomes de carbone dans la chaîne aliphatique : courte (<8), moyenne (8 à 14) ou longue (> 14). Dans la nature, la majorité des AG ont une longueur de 14 à 24 carbones. On les distingue également par leur degré d'insaturation, qui correspond au nombre de doubles liaisons entre carbones dans la chaîne aliphatique : AG saturés (0 double liaison), monoinsaturés (1 double liaison) et polyinsaturés (2 et plus). De plus, les AG insaturés sont subdivisés en fonction de la position de la première double liaison en comptant à partir de la fin de la chaîne carbonée (la terminaison méthylique), identifiée par la notation ω (parfois n). Par exemple, les AG ω -3 présentent une double liaison en 3^{ème} position mais les AG ω -6, ω -7 et ω -9 sont aussi courants. Les AG ω -3 ont été identifiés comme ayant un intérêt nutritionnel, notamment en lien avec un risque amoindri de développer des maladies cardiovasculaires (Lairon, 2009). La composition finale de l'alimentation en acides gras dépend

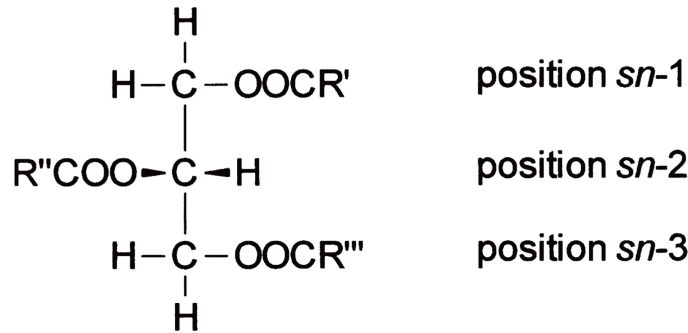


FIGURE 1.5 – Formule chimique d'un triacylglycérol (Lairon, 2009).

largement de l'origine biologique des lipides ingérés, ou de leur traitement technologique (McClements, 2015). L'organisme est capable de synthétiser la plupart des AG, sauf les AG dit indispensables, dont les ω -3. Il faut donc les apporter par l'alimentation. Les acides gras métabolisés par l'organisme sont utilisés dans le corps entier en plusieurs endroits : dans le cœur et les muscles comme substrat énergétique, dans le foie pour constituer des transporteurs biochimiques (lipoprotéines), dans les tissus adipeux comme réserve d'énergie, dans les glandes mammaires en période de lactation, et enfin dans les membranes de toutes les cellules.

1.2.2 Les protéines dans les aliments : définition et fonctions

Les protéines constituent également une classe indispensable de nutriments dans l'alimentation humaine. On en trouve dans diverses sources : viandes, produits animaux non carnés (œufs, lait), plantes (céréales et légumineuses), graines protéagineuses, ou encore dans les organismes unicellulaires (micro-algues) et les insectes (Berdanier *et al.*, 2013; Dumas, 2007).

Les protéines se définissent comme un enchaînement macromoléculaire de résidus d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques, qui sont des liaisons covalentes (Fig. 1.6). Parmi les quelques centaines d'acide aminés connus, une partie seulement est présente dans les protéines et seuls 22 sont utilisés dans les organismes vivants, dont 20 chez l'humain. Un **acide aminé (AA)** est un acide carboxylique ($-\text{COOH}$) également doté d'un groupe fonctionnel amine ($-\text{NH}_2$), relié par le même carbone (le carbone α). Les acides aminés diffèrent entre eux par leur chaîne latérale (groupe R) qui varie en structure, en taille, et en charge électrique (Nelson and Cox, 2012). Le nombre important de combinaisons possibles d'acides aminés, programmées par l'origine biologique de la protéine, explique leur grande diversité moléculaire. Les protéines sont donc des polymères d'acides aminés (ou polypeptides) dont la structure primaire est définie par leur séquence en acides aminés. Les repliements locaux

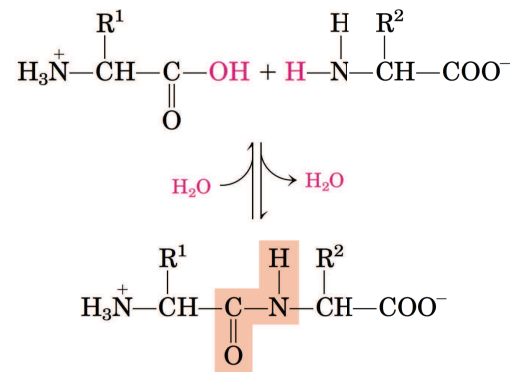


FIGURE 1.6 – Réaction de formation d’une liaison peptidique entre 2 acides aminés. L’amine NH_2 porté par le carbone α du second acide aminé (chaîne R^2) s’associe au groupe carboxyle du premier acide aminé (chaîne R^1) pour former la liaison peptidique tout en libérant une molécule d’eau. Dans le sens inverse il s’agit d’une hydrolyse (Nelson and Cox, 2012).

de cette chaîne, induits par des liaisons hydrogènes, forment leur structure secondaire, dont les trois principales catégories sont les hélices, les feuillets, et les coudes. La structure tridimensionnelle des protéines, dite structure tertiaire, correspond au repliement des structures secondaires dans l’espace par le jeu d’interactions électrostatiques, de ponts disulfures, de forces de van der Waals, de répulsions stériques et par la formation de poches hydrophobes. Il existe également des protéines, dites multimériques, formées par l’association d’au moins deux polypeptides par des liaisons faibles. On parle alors de structure quaternaire. Cette structuration donne la conformation spatiale adoptée par les protéines et explique nombre de leurs propriétés physico-chimiques (solubilité, réaction à la chaleur, capacité gélifiante, émulsifiante et moussante. . .).

Les protéines ont deux principales fonctions biologiques. D’une part, elles sont une source importante d’énergie avec une densité énergétique de 17 kJ/g (Charrondière *et al.*, 2015). D’autre part, les acides aminés et l’azote absorbés par l’organisme lors de la digestion permettent la synthèse de protéines endogènes. Ces dernières sont impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la fabrication de tissus, d’enzymes, d’hormones ou d’anticorps par exemple. De plus, l’équilibre entre la protéosynthèse et la protéolyse est dynamique et doit être maintenu par l’apport régulier de protéines via l’alimentation.

Qualitativement, la composition en acides aminés des protéines alimentaires est importante. Certains acides aminés ne sont pas synthétisables *de novo* par l’organisme et doivent donc être apportés par l’alimentation (Dumas, 2007). Ceux-ci sont dénommés acides aminés essentiels, et sont au nombre de huit chez l’homme. Les protéines animales sont en général considérées comme ayant une composition plus équilibrée en acides aminés que les protéines

végétales, qui peuvent être pauvres en lysine (céréales) ou en acides aminés soufrés (légumineuses). Par ailleurs, si les acides aminés sont utilisés par l'organisme pour la synthèse de protéines corporelles, ils peuvent avoir d'autres effets biologiques, comme celui de précurseurs de la protéosynthèse (Dumas, 2007; Fouillet *et al.*, 2009). Par exemple, il est établi que la leucine sert de signal stimulant spécifiquement les voies de l'anabolisme des protéines musculaires (Mosoni and Dardevet, 2013). Chez la personne âgée, une résistance à ce signal se développe et peut provoquer la sarcopénie, ou fonte musculaire, entraînant une perte de mobilité. Le rehaussement de l'apport recommandé en protéines a été d'ailleurs été donné par l'AFSSA pour répondre aux besoins spécifiques de cette population.

2 Les émulsions huile dans eau et les protéines de lactosérum comme émulsifiants et gélifiants

2.1 Les émulsions huile dans eau

2.1.1 Définitions

Les émulsions sont un système physique qui a été extensivement exploré par Dickinson et ses collaborateurs dans le cadre des émulsions alimentaires sur des questions de formulation et de stabilité (Chen and Dickinson, 1999; Dickinson, 1996, 1997, 2005; Dickinson and Leser, 2007; Dickinson and Miller, 2001; Dickinson and van Vliet, 2003), mais aussi plus récemment par McClements en ajoutant des questions de design prenant en compte la digestion (McClements, 2015; McClements and Decker, 2009). Comme toute émulsion, les **émulsions huile dans eau (H/E)** sont un système physique dispersé dans lequel deux phases immiscibles sont mélangées de manière métastable. En particulier, il s'agit de la dispersion colloïdale de gouttelettes d'une phase huileuse (la **phase dispersée**) dans une phase aqueuse continue (la **phase continue**). L'**interface** entre les deux est composée d'**émulsifiants**, des molécules amphiphiles placées à la surface de la gouttelette, capables d'assurer une certaine stabilité. Les émulsions H/E peuvent être macroscopiquement stables durant un certain temps mais des phénomènes à l'échelle microscopique, notamment à l'interface, viennent déstabiliser le système à une vitesse plus ou moins grande. Thermodynamiquement, l'énergie libre des deux phases séparées est plus basse que l'énergie libre de ces deux phases émulsifiées, l'instabilité est donc inhérente et une séparation de phase apparaîtra inexorablement. Les rayons de gouttelettes sont généralement compris entre 100 nm et 100µm.

2.1.2 Fabrication des émulsions

Le processus d'émulsification nécessite d'ajouter de l'énergie mécanique au système afin de briser un volume d'huile en fines gouttelettes. Pour stabiliser les émulsions et limiter la coalescence des gouttelettes, des émulsifiants sont utilisés. Du fait de leur caractère amphiphile, ils ont suffisamment d'affinité pour l'interface qu'ils colonisent, contribuant à la diminution de l'énergie de l'interface. Une variété d'outils permet de réaliser cette opération à différentes échelles (Li, 2012; McClements, 2015) :

- Les mélangeurs à hélice, un type de rotor-stator, sont très communs et adaptable à différentes échelles (Fig. 1.7 (a)). Une hélice est mise directement dans un récipient contenant les phases aqueuse et huileuse non mélangées et les émulsifiants. La puissante rotation atteinte permet de générer des mouvements de cisaillements suffisants pour briser la phase huileuse et ainsi créer de l'interface.
- Les moulins colloïdaux, un autre type de rotor-stators, sont un autre dispositif, utilisé à différentes échelles de production (Fig. 1.7 (b)). Un cylindre interne plongeant dans la préparation à émulsifier tourne à grande vitesse à l'intérieur d'un cylindre coaxial externe. La différence de pression et le cisaillement créés par la rotation permettent de former les gouttelettes d'huile ou d'affiner une émulsion préexistante. Les cylindres peuvent être lisses ou crantés pour créer plus de turbulence.
- L'homogénéisateur à haute pression (Fig. 1.7 (c)). Cet instrument, souvent utilisé en industrie agro-alimentaire pour de gros volume (quelques dizaines de litres par heure), fait passer dans un compartiment sous une haute pression (quelques centaines de bars) une pré-émulsion à travers une petite ouverture. La différence de pression entre l'entrée et la sortie crée des forces disruptives qui vont réduire la taille des gouttelettes. Un second compartiment à pression intermédiaire est souvent intercalé (homogénéisateur à double étage). Il permet d'éviter une re-coalescence due à un passage trop brusque à la pression atmosphérique.
- Les homogénéisateurs à ultrasons (Fig. 1.7 (d)) sont particulièrement adaptés à l'échelle laboratoire. Une tige plongeante contient un cristal piézoélectrique capable, par son oscillation à des fréquences de plusieurs kHz, de délivrer des ondes ultrasonores. Les ondes de pression générées sont suffisamment puissantes pour créer une rupture des gouttelettes d'huile par phénomène de cavitation. Cette méthode permet de travailler sur de très petits volumes (quelques cm^3 à 100 cm^3) et de fabriquer des émulsions très fines (nano-émulsion).
- Les circuits micro-fluidiques consistent à faire passer une pré-émulsion (Fig. 1.7 (e)) ou

les deux phases à mélanger dans des canaux de largeur submillimétrique creusés dans une matrice polymère. En les faisant se rejoindre, les flux générés suffisent à former des gouttelettes de diamètre inférieur à 100 nm. Ils produisent de très petits volumes et sont donc indiqués pour un usage en laboratoire. La géométrie des circuits est facilement adaptable (nombre d'embranchements, de coudes, de passages) et permet de créer des émulsions avec des caractéristiques précises (émulsion mono-disperses, émulsions multiples) difficilement obtenues par d'autres moyens de production.

2.1.3 Stabilité des émulsions

La **stabilité** décrit la façon dont le système maintient dans le temps son état émulsifié alors que le système est thermodynamiquement instable. On parle donc de stabilité cinétique. Les gouttelettes d'une émulsion au repos sont soumises au mouvement Brownien et à la gravité. Le mouvement Brownien est responsable d'un mélange par agitation thermique inhérent aux gouttelettes de quelques dizaines de μm et devient de plus en plus important si la taille diminue. En général, les gouttelettes d'huile ont une densité inférieure à celle de la phase aqueuse. La différence des deux crée une poussée d'Archimède, ascendante. Dans le même temps une gouttelette remontant dans le liquide est soumise à une force de friction, descendante. Dans l'hypothèse d'un modèle de sphère dure, la vitesse de la gouttelette à l'équilibre est alors donnée par la loi de Stokes :

$$V_{Stokes} = -\frac{2gr^2(\rho_2 - \rho_1)}{2\eta_1} \quad (1.1)$$

où g est l'accélération due à la gravité, r est le rayon de la gouttelette, ρ_2 est la densité de la phase dispersée et ρ_1 celle de la phase continue, η_1 est la viscosité de la phase continue. Le signe de V_{Stokes} détermine si la gouttelette remonte (on parle de **crémage**) ou descend (on parle de **sédimentation**).

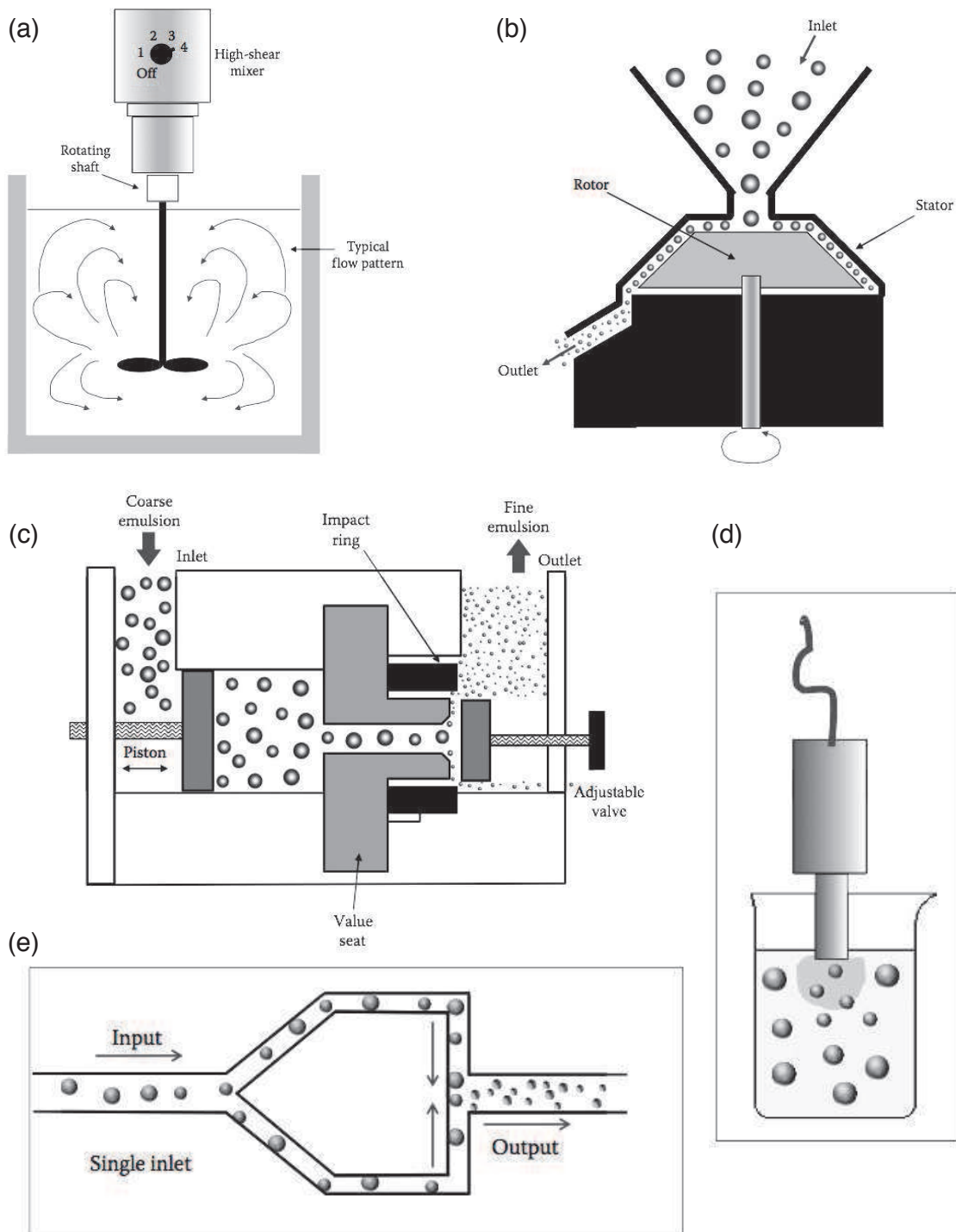


FIGURE 1.7 – Différents procédés d'émulsification (adapté de (McClements 2015)). (a) mélangeur à hélice ; (b) moulin colloïdal ; (c) homogénéisateur à haute pression (un seul étage est figuré) ; (d) homogénéisateur à ultrasons plongeant dans un bécher ; (e) circuit micro-fluidique avec une pré-émulsion en entrée. (McClements, 2015)

Plusieurs formes de déstabilisation sont possibles pour une émulsion :

- La **séparation gravitationnelle**. En vertu de la loi de Stokes, les gouttelettes dans l'émulsion au repos vont remonter (ou descendre) au fur et à mesure du temps si leur taille n'est pas suffisamment petite pour que le mouvement Brownien la contrebalance. Au bout d'un certain temps une crème (ou un sédiment dans le cas contraire) va se former. En outre, plus la gouttelette est grosse, plus elle remonte vite. Il y'a donc une séparation sélective qui apparaît dans la crème formée (Fig. 1.8). Le crémage peut être limité par plusieurs moyens : réduire la taille des gouttelettes, réduire la différence de densité des deux phases, accroître la viscosité de la phase continue.
- Par le simple mouvement ou le crémage/sédimentation, les collisions entre les gouttelettes sont fréquentes. La **coalescence** correspond à la fusion de gouttelettes en contact en une seule gouttelette plus grande, par formation d'une interface unique. Ce processus est irréversible. Si le phénomène se poursuit, il mène le système à une séparation totale des deux phases avec une couche huileuse au-dessus de la phase aqueuse (phase finale dans Fig. 1.9)
- La **floculation** correspond à l'agglomération de plusieurs gouttelettes lors de leur rencontre par le jeu de forces d'attraction. La floculation peut précéder la coalescence mais pas nécessairement. Elle peut être réversible ou irréversible, en fonction de la résistance des interfaces à la rupture, qui va dépendre des émulsifiants présents. Le phénomène de floculation amène les gouttelettes à un état regroupé de particules plus grosses, d'où une accélération du phénomène de crémage/sédimentation. En particulier, la **floculation par pontage** correspond à un accrochage des gouttelettes par l'intermédiaire des émulsifiants, ou de molécules (souvent des biopolymères chargés) qui viennent s'adsorber à l'interface directement ou s'associer aux émulsifiants déjà présents. On peut aussi observer une **floculation par déplétion**. Dans ce cas, la présence dans la phase continue d'une forte concentration en certains composés qui n'interagissent pas avec l'interface peut créer un gradient de pression osmotique dans le milieu autour des gouttelettes. La cause est une zone d'exclusion de ces composés autour de l'interface : la concentration en composés est légèrement plus faible entre deux gouttelettes que dans le reste du milieu aqueux. L'effet net est une attraction des deux gouttelettes.

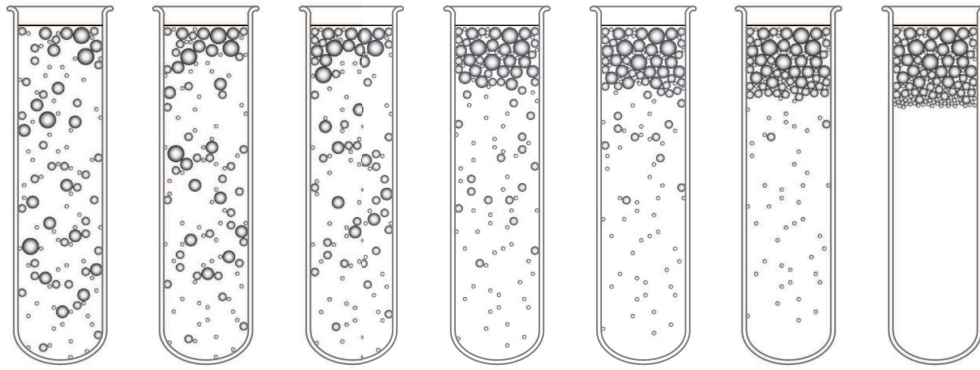


FIGURE 1.8 – La séparation gravitationnelle. De gauche à droite, les gouttelettes de l'émulsion crèment avec le temps lorsque l'émulsion est au repos. Les plus grosses atteignent le haut du contenant avant les plus petites, d'où une sélection dans la crème formée au temps final. Adapté de [McClements \(2015\)](#).

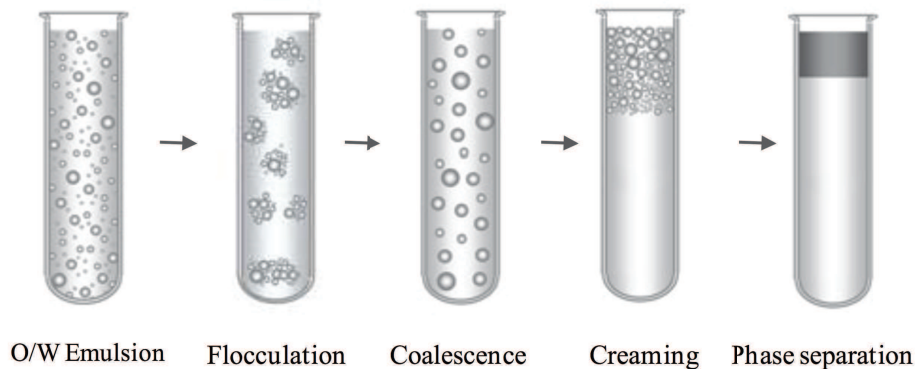


FIGURE 1.9 – Suite de déstabilisations qu'une émulsion peut subir ([Li, 2012](#)). De gauche à droite : l'émulsion dans son état initial ; les gouttelettes s'agrègent entre elles par flocculation ; s'ensuit un certain degré de coalescence ; une crème se forme ; au bout d'un certain temps la coalescence s'est poursuivie au point d'avoir une séparation complète des deux phases.

Les propriétés physico-chimiques des lipides jouent un rôle dans la formation et la stabilité des émulsions ([McClements, 2015](#)). Leur densité et leur viscosité par rapport à la phase continue, la température de fusion de l'huile, la relation température-viscosité sont des exemples de propriétés qui vont participer, pour un procédé d'émulsification donné (conditions de pression, température, cisaillement), à produire une émulsion avec certaines caractéristiques qui vont jouer sur la stabilité finale. De plus, la composition de l'huile participe avec les émulsifiants à développer la tension superficielle de l'interface, qui joue sur la résistance de celle-ci à la rupture et donc à la coalescence.

Le choix du ou des émulsifiant(s) composant l'interface est primordial dans la stabilité d'une émulsion, qui va déterminer si la collision des gouttelettes sera suivie d'une fusion ou non et si la flocculation sera réversible ou non. Une grande variété d'émulsifiants peut être utilisée pour composer les émulsions alimentaires (Fig. 1.10) : tensioactifs, phospholipides,

polysaccharides, protéines (de lait, de plantes, de viande), ainsi que des complexes de ces deux derniers ou un mélange protéines-tensioactifs (Wilde *et al.*, 2004).

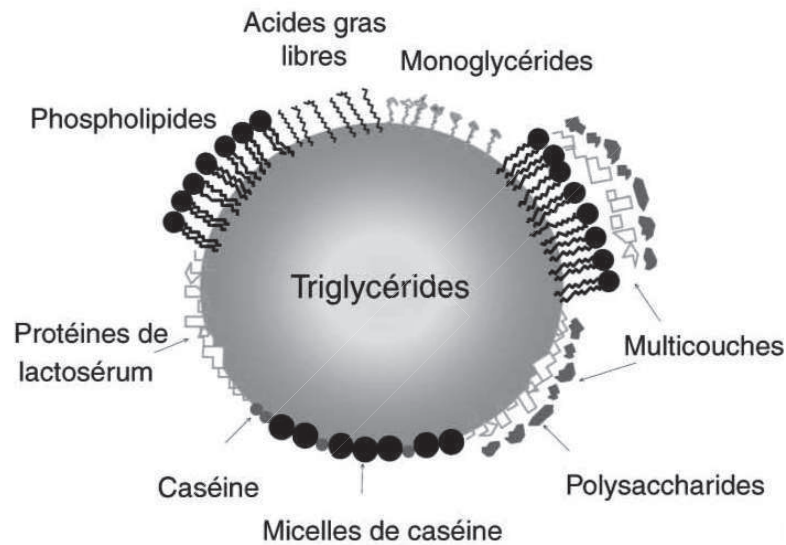


FIGURE 1.10 – Émulsifiants pouvant être utilisés pour la stabilisation d'émulsions alimentaires : des surfactants de petit poids moléculaire tels les monoglycérides, acides gras libres, ou phospholipides (lécithine d'œuf ou de soja par exemple), des protéines (protéines de lactosérum ou caséines par exemple), des agrégats protéiques (micelles de caséines par exemple), des polysaccharides, ou des multicouches (Armand, 2013). Non figurées ici, des particules solides peuvent aussi être utilisées (émulsions dites de Pickering, grains d'amidon par exemple) (Singh *et al.*, 2009).

La phase continue peut elle aussi jouer sur la stabilité au travers de sa viscosité et de ses interactions avec l'interface des gouttelettes. Si ces composants n'interagissent pas avec l'interface et sont en concentration suffisante, la floculation par déplétion peut être promue. Ils peuvent aussi être utilisés comme viscosifiants ou gélifiants : polysaccharides tels que les carraghénanes, agars, alginates, gomme guar, etc. ou protéines telles que les caséines, les protéines de lactosérum ou la gélatine. Ces biopolymères peuvent aussi être des émulsifiants et peuvent donc s'adsorber aux interfaces et créer une floculation par pontage. Ils peuvent aussi former des complexes avec les émulsifiants initiaux et donc enrichir les interfaces et possiblement les protéger de la coalescence. Dans le cas d'émulsions gélifiées (hydrogels continus ou particules d'hydrogels dispersées dans une phase aqueuse liquide), les gouttelettes peuvent être piégées dans le réseau de biopolymères ce qui empêche leur mouvement.

2.2 Les protéines de lactosérum pour la structuration des émulsions

Les **protéines de lactosérum** (*whey proteins* en anglais), ou protéines sériques, sont couramment mises en œuvre dans l'industrie alimentaire car elles offrent diverses propriétés fonctionnelles (Cayot and Lorient, 1998; Guyomarc'h *et al.*, 2014). Elles sont épaississantes,

ont une bonne rétention à l'eau, sont solubles sur toute la gamme de pH alimentaires et même à faible force ionique, sont capables de former des gels par traitement thermique, et de former des agrégats protéiques divers (fibrilles, sphérules) en fonction de leur concentration et du pH, tout en étant moussantes et émulsifiantes grâce à leur adsorption aux interfaces (air-eau et huile-eau). Ces protéines sont utilisées dans l'alimentation animale en majorité mais aussi dans la formulation d'aliments courants comme les laits infantiles (le lait humain contient 60 % de protéines du lactosérum et 40 % de caséines (Luhovyy *et al.*, 2007) contre 20 % et 80 % respectivement dans le lait de vache), des préparations fromagères, chocolatées, pâtisseries, ainsi que dans la nutrition sportive pour leur qualité de protéine dite d'assimilation rapide.

Les protéines du lactosérum représentent la partie protéique soluble restante après séparation des autres protéines du lait (caséines), extraites par coagulation acide à pH 4,6 ou par action enzymatique comme avec la présure (Cayot and Lorient, 1998; Singh, 2005; Singh *et al.*, 2014a). La filtration membranaire du lactosérum, obtenu comme co-produit de la fabrication de fromage, ou directement du lait écrémé (par ultrafiltration avec ou sans diafiltration), suivie d'une concentration par séchage, permet d'obtenir des concentrés (whey protein concentrate) à des taux de 30 à 80 %. La filtration par chromatographie d'échange d'ions permet d'atteindre 80-95 % dans les isolats (whey protein isolate).

Dans le cadre du travail expérimental de cette thèse, les protéines de lactosérum constituent la source de protéines choisie pour les émulsions produites. En effet, ses propriétés émulsifiantes et gélifiantes, présentées ici, sont telles qu'elles permettent la conception de matrices de structures variées à partir du même ingrédient de base utilisé dans le procédé. Elles sont aussi intéressantes nutritionnellement. Elles sont considérées comme des protéines dites rapides par rapport aux caséines et elles peuvent ainsi apporter une satiété plus rapidement suite au repas (Boirie *et al.*, 1997). De plus, elles sont mises en avant pour leur profil particulièrement équilibré en acides aminés essentiels et en acides aminés ramifiés tels que la leucine, ce qui en fait une source d'intérêt dans le contexte de la sarcopénie (Barbé *et al.*, 2014). En tant que protéines laitières, elles sont aussi des précurseurs de peptides servant de signaux bioactifs impliqués dans plusieurs fonctions biologiques (Korhonen, 2009).

2.2.1 Composition et structure

Les protéines de lactosérum du lait bovin sont un mélange de plusieurs protéines globulaires, *i.e.* sphéroïdes compactes, résumé dans le tableau 1.1. Elles se composent en majorité de la β -lactoglobuline (notée β -LG) et de l' α -lactalbumine (notée α -LA) (Brodkorb *et al.*, 2016; Çakır-Fuller, 2015; Cayot and Lorient, 1998). L'albumine de sérum bovin et la lacto-

ferrine sont présentes de façon minoritaire. On trouve également des immunoglobulines au rôle d'anticorps pour le veau allaité. Comparativement aux caséines, qui s'assemblent pour former des édifices supramoléculaires de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres (les micelles de caséines), les protéines sériques présentent des diamètres bien plus petits, de quelques nanomètres (Cayot and Lorient, 1998).

Tableau 1.1 – Quelques données sur les principales protéines du lactosérum bovin. (Cayot and Lorient, 1998; Guyomarc'h *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2014a)

Protéine	Concentration dans le lait de vache (g/l)	Concentration dans les protéines de lactosérum (%)	Poids moléculaire (kDa)	pI
β-lactoglobuline	2 à 4	60	18,3	5,2
α-lactalbumine	1 à 1,5	20	14,2	4,2 à 4,5
Albumine de sérum bovin	0,1 à 0,4	3	66,4	4,9
Lactoferrine	0,2	<0,1	80	8,6 à 8,9
Immunoglobulines	0,4 à 1	10	150 à 1000	5,5 à 8,3

2.2.2 Propriétés gélifiantes

Les protéines de lactosérums sont sensibles à la chaleur. Elles commencent à être dénaturées de façon réversible entre 62 et 78 °C, en fonction de la protéine considérée (Brodkorb *et al.*, 2016; Çakır-Fuller, 2015; Singh, 2005). Ce phénomène a été bien étudié pour les mélanges de protéines et plus particulièrement pour la β -LG et l' α -LA. Lors de la montée en température, la structure tertiaire prend une conformation un peu plus aléatoire. Les replis hydrophobes, formés par des ponts disulfures ainsi que des groupements thiols (groupement sulfhydryle associé à un carbone) libres, se retrouvent plus exposés au milieu aqueux, c'est le déplissement des protéines. Au-dessus de 70 °C s'ensuit l'agrégation définitive des protéines entre elles par des réactions intermoléculaires de réorganisation des ponts disulfures et des groupements sulfhydryles, d'oxydation de thiol libres et d'autres réaction non-covalentes. A concentration suffisante, un réseau continu peut être formé, la solution gélifie. Le gel est défini comme une structure continue tridimensionnelle, autosupportée, constituée d'un réseau, ici de protéines agrégées, piégeant une solution aqueuse et/ou des éléments dispersés. Le gel développe une force maximale lorsqu'un optimum est atteint entre les interactions protéines-protéines (un excès provoquerait la synérèse, *i.e.* une contraction du réseau protéique) et protéines-solvant (un excès donnerait un gel trop faible). La concentration critique au-delà de laquelle le réseau se forme dépend de plusieurs facteurs comme le pH, la force ionique, et

le degré de dénaturation. Les propriétés rhéologiques du gel dépendent également de ces facteurs, ainsi que de la composition du mélange protéique, de la température et de la durée de chauffage, de la concentration en sels (NaCl en CaCl_2 notamment). La rhéologie est contrôlée par l'organisation microscopique du gel sur laquelle on peut jouer en fonction de toutes ces conditions, de la cinétique et la température de chauffage (Fig. 1.11) et d'un éventuel traitement mécanique (Singh *et al.*, 2014b). Le résultat varie d'un réseau particulaire, par agglomération d'agrégats protéiques sphériques (notamment si on se place à un pH plutôt neutre), à un réseau plus homogène fibrillaire (notamment si on se place à un pH proche du pI) fait d'associations hautement réticulées (Brodkorb *et al.*, 2016; Dickinson, 1996; Singh *et al.*, 2014b).

Notons que l'agrégation des protéines de lactosérum peut être promue sans atteindre l'état de gel afin obtenir des solutions de protéines de lactosérum micro-particulées (ou micro-gels) (Çakır-Fuller, 2015; Schmitt *et al.*, 2009, 2010). Des gels prenant à froid peuvent également être réalisés (Brodkorb *et al.*, 2016; Ye and Taylor, 2009). Il s'agit alors de préparer, par un traitement thermique, une solution de protéines dénaturées où l'agrégation est limitée, puis de déclencher la formation du réseau en baissant le pH dans la région acide ou par l'ajout de sels.

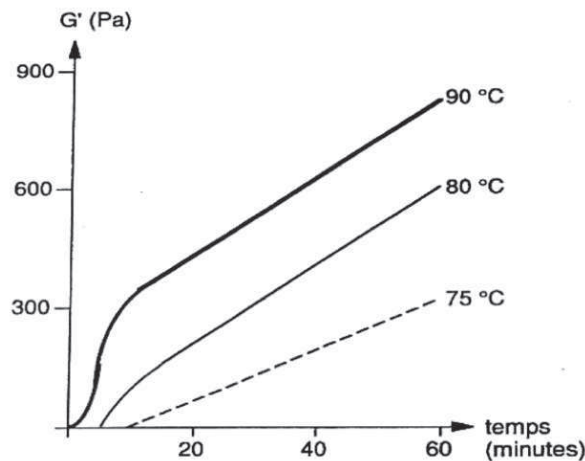


FIGURE 1.11 – Évolution du module d'élasticité G' en fonction de la durée et la température de chauffage lors de la gélification d'une solution de protéines de lactosérum (10 %, pH 7). (Cayot and Lorient, 1998)

2.2.3 Propriétés émulsifiantes

De manière générale, les protéines laitières, dont les protéines de lactosérum, sont d'excellents émulsifiants alimentaires avec un ratio protéine/huile relativement bas (1 :60). Les protéines de lactosérum sont des molécules amphiphiles comme la plupart des protéines. Ceci

leur confère leur propriété émulsifiante par l'orientation de leurs segments ou de leurs restes d'acides aminés polaires et non-polaires dans la phase aqueuse et la phase huileuse respectivement (Singh *et al.*, 2014b). Les protéines ainsi adsorbées ne recouvrent l'interface qu'à hauteur de 30-40 %, contre presque 100 % pour des tensioactifs (petites molécules) (Dickinson, 1996), du fait de leur plus grande taille et de leur conformation plus ou moins rigide. L'interface colonisée par ce type de protéines peut être considérée comme une couche primaire de particules déformables reliées entre elles (Cayot and Lorient, 1998; Dickinson, 1996) ayant une épaisseur d'environ 2 nm pour la β -LG et α -LA (Singh *et al.*, 2014a). Le film protéique peut correspondre, si la concentration est suffisante, à un gel de polymères qui développe un module élastique non nul. Les interactions impliquées sont de type liaisons hydrogènes, liaisons ioniques, interactions hydrophobes, forces de van der Waals, voire ponts disulfures.

Les agrégats de protéines sériques formés par traitement thermique sont aussi émulsifiants (Çakır-Fuller, 2015; Cayot and Lorient, 1998) mais avec une capacité moindre à peupler l'interface à pH 7 que des protéines natives. Le comportement est inverse aux pH extrêmes. Les gels de protéines de lactosérum ont tendance à être plus fermes et à se former à des concentrations de protéines plus faibles lorsque de la matière grasse émulsionnée est incorporée (gel d'émulsions). Ceci serait dû à l'association des protéines de l'interface aux protéines du réseau du gel.

3 La digestion des aliments chez l'Homme

3.1 Les différentes phases de la digestion : anatomie, physiologie et fonctions

La digestion consiste en la déconstruction séquentielle des aliments par différents mécanismes (mécaniques, enzymatiques, chimiques, ou biologiques) et en l'absorption des nutriments par l'organisme. Pour ceci les fonctions principales du système digestif sont de prendre en charge la nourriture, de la dégrader en parties de plus en plus petites, d'extraire des aliments de l'énergie, des nutriments et de l'eau, et d'évacuer les fractions non digérées par les matières fécales. Un système de régulation (système nerveux central et entérique, peptiques digestifs produits par des cellules endocrines, hormones...) permet le contrôle des échanges entre les différents compartiments ainsi que l'expulsion d'aliments que l'organisme ne peut accepter (surplus, intolérance, contamination).

Chez les humains, on distingue 4 compartiments, ou étages, par ordre de dégradation croissante de l'aliment : la bouche (suivie de l'œsophage), l'estomac, l'intestin grêle (ou sim-

plement intestin), et le côlon. Les régions majeures de l'appareil digestif sont décrites dans la Figure 1.12 et leurs principales fonctions sont résumées dans le Tableau 1.2 .

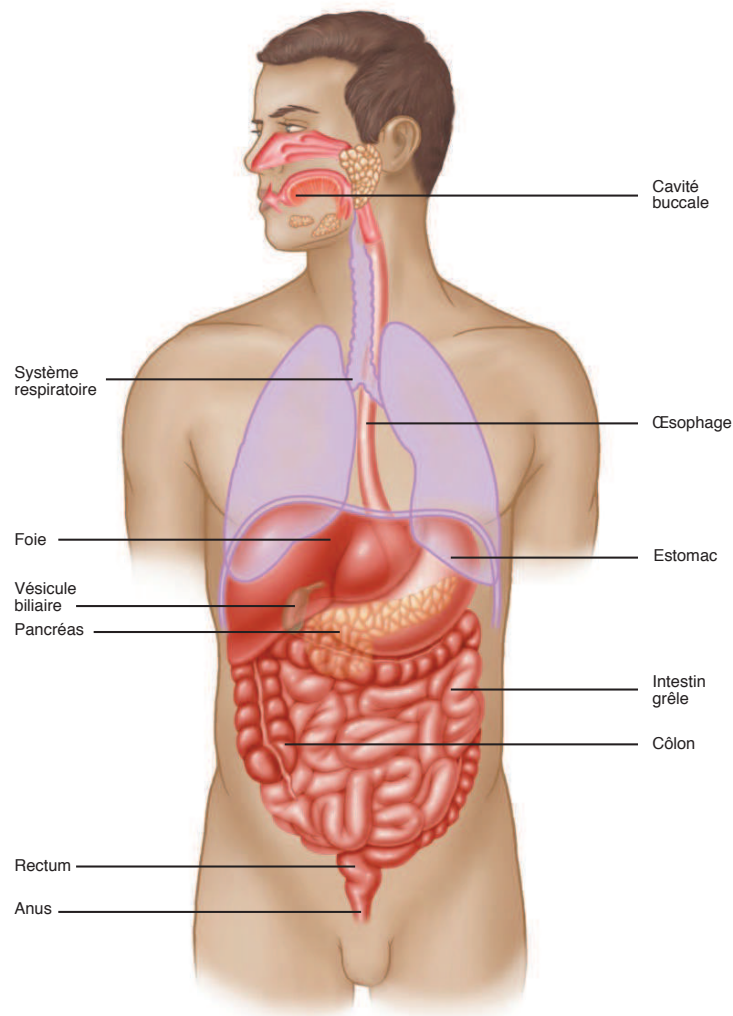


FIGURE 1.12 – Anatomie du système digestif humain. Adapté de Stanfield (2012).

3.1.1 La bouche

Le processus oral est une étape complexe qui a beaucoup été étudiée afin de mieux comprendre les perceptions sensorielles (Panouillé *et al.*, 2016; Selway and Stokes, 2014). Les travaux visant à comprendre l'impact de la phase orale sur la digestion restent peu nombreux. En effet, la phase orale est une étape très courte de la digestion. Les temps en bouche avant déglutition sont compris entre quelques secondes pour des liquides à quelques dizaines de secondes pour les aliments semi-solides à solides (Jalabert-Malbos *et al.*, 2007). Si les liquides sont déglutis après une simple compression langue-palais suivie d'un mouvement péristaltique partant du fond de la cavité orale jusqu'au pharynx et l'œsophage, les aliments

Tableau 1.2 – Principaux phénomènes physiologiques, biochimiques et biologiques survenant dans les différents étages de l'appareil digestif humain. Adapté de [Bornhorst and Singh \(2014\)](#); [Guerra et al. \(2012\)](#); [Seeley et al. \(2008\)](#); [Turgeon and Rioux \(2011\)](#).

Compartiment	Action mécanique	Conditions biochimiques	Autres phénomènes biologiques
Cavité buccale	Mastication Rupture de la matrice alimentaire, formation du bol alimentaire Déglutition Temps de transit court 10 s – 2 min	Hydrolyse limitée α-amylase salivaire Dissolution Salive pH neutre pH 5 – 7	Protection des tissus par lubrification par le mucus et la salive Protection microbienne par des lysozymes
Œsophage	Péristaltisme Transport du bol		Protection des tissus par lubrification par le mucus
Estomac	Péristaltisme Formation du chyme, continue la dégradation mécanique, filtre les particules > 2 mm Temps de transit long 15 min – 3 h	Hydrolyse limitée Pepsine Lipase gastrique pH acide pH 1 – 5 Dénaturation des protéines et dissolution de fragments par HCl	Peu d'absorption des nutriments Protection des tissus contre l'autodigestion
Intestin grêle	Péristaltisme Mélange avec les sécrétions de l'arbre hépatobilio-pancréatique, transport et mélange le long du tube pour faciliter l'absorption Temps de transit long 2 – 5 h	Hydrolyse quasi-complète des nutriments Protéases (trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidase, peptidase, etc.) Lipases (lipase pancréatique, phospholipase A2 pancréatique, carboxylester hydrolase, lipase pancréatique apparentée de type 2) α-amylase pancréatique Autres Sels biliaires et colipase pH neutre pH 6 - 7,5	Absorption des nutriments par les cellules épithéliales Solubilisation micellaire des acides gras par les sels biliaires, permettant leur absorption Absorption de la bile
Côlon	Péristaltisme Transport des résidus de la digestion, formation de fèces	pH neutre pH 5 – 7 Flore microbienne	Fermentation des nutriments non absorbés dans l'intestin grêle Absorption de l'eau

solides ou semi-solides sont mastiqués et réduits en morceaux de plus en plus petits grâce aux dents et aux mouvements de la langue et de la mâchoire (Fig. 1.13). L'introduction de salive au cours de la mastication permet la constitution d'un bol cohésif qui peut être dégluti. La salive est constituée principalement d'eau, de protéines et de sels. Les glycoprotéines présentes dans la salive, telles que les mucines, permettent la lubrification des muqueuses ainsi que celle du bol alimentaire ([Stokes et al., 2013](#)). Dans la salive, la principale enzyme est l'α-amylase qui présente une activité généralement comprise entre 10 à 160 IU/ml ([Butterworth et al., 2011](#)). Cette enzyme contribue à l'hydrolyse partielle de 3-5 % de l'amidon durant la phase orale ([Seeley et al., 2008](#)) et participe à la réduction de la viscosité des bols comme dans le cas du riz par exemple ([Bornhorst et al., 2014](#)). Même si le processus oral intervient sur une phase très courte de la digestion, il induit des changements importants de structure de l'aliment ([Delime et al., 2014](#)) et participe à la signalisation et à la régulation de la digestion ([Cecil et al., 1998](#)).

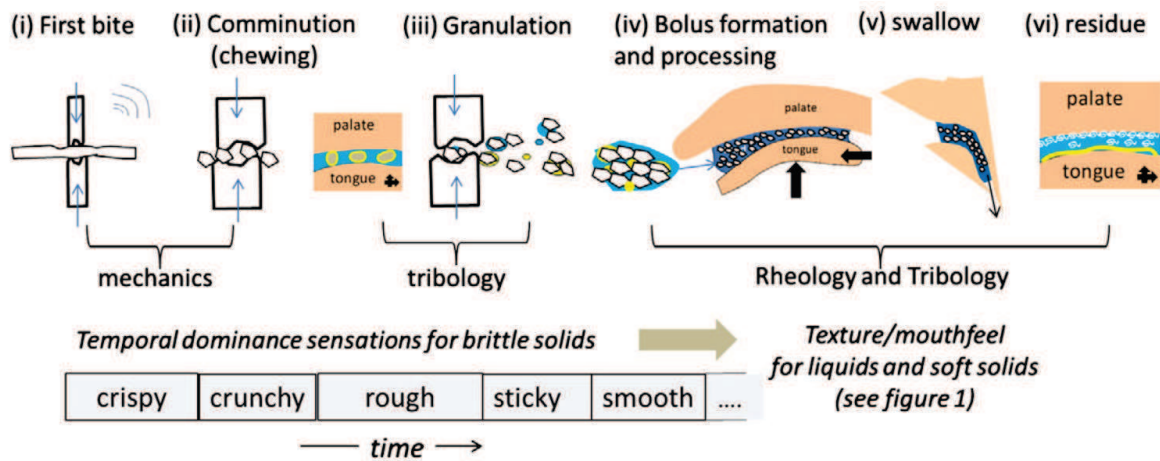


FIGURE 1.13 – Les mouvements dans la bouche de la mâchoire et de la langue réduisent les aliments solides et semi-solides en particules plus petites, les mélangent avec la salive et forment un bol alimentaire lubrifié qui est avalé. Ces étapes font ainsi intervenir des phénomènes de mécanique, de tribologie et de rhéologie (Stokes *et al.*, 2013).

3.1.2 L'estomac

Le mouvement péristaltique depuis le pharynx, puis tout le long de l'œsophage permet la progression du bol de la bouche à l'estomac (Stanfield, 2012). On distingue dans l'estomac plusieurs zones anatomiques : le cardia faisant la jonction avec l'œsophage, le fundus qui forme un dôme dans la partie supérieure, le corps au centre qui constitue le volume principal de l'estomac, l'antrum qui est la partie courbe au fond de l'estomac, et enfin le pylore qui se termine par le sphincter pylorique (Seeley *et al.*, 2008).

Une première fonction essentielle de l'estomac est de stocker les aliments ingérés et de réguler ainsi l'ensemble de la digestion (Stanfield, 2012). Il est d'ailleurs capable de se dilater et de passer d'un volume de 50 ml à jeun à une contenance d'un litre.

Les parties proximales (cardia, fundus et corps) réceptionnent le bol. Les cellules pariétales de la muqueuse libèrent de l'acide chlorhydrique et des électrolytes. Les cellules principales produisent des enzymes (Seeley *et al.*, 2008). Le pH d'un estomac à jeun se situe à 1-3. La forte acidité a pour premier rôle d'éviter une contamination par des microorganismes pathogènes. L'arrivée du bol fait remonter cette valeur par effet tampon aux alentours du pH de l'aliment, généralement proche de la neutralité (Fig. 1.14). La sécrétion d'HCl permet progressivement de faire redescendre le pH autour de 2 en 1 à 2 h (Dressman, 1986; Malagelada *et al.*, 1976). Cette acidification, associée à des forces mécaniques, favorise la dissolution des morceaux d'aliment. Le temps de séjour en phase gastrique va dépendre du volume et du pH initial du repas mais également de son état, liquide ou solide et donc de la taille des particules présentes (Malagelada *et al.*, 1979). Dans l'estomac à jeun, la molarité s'établit autour de

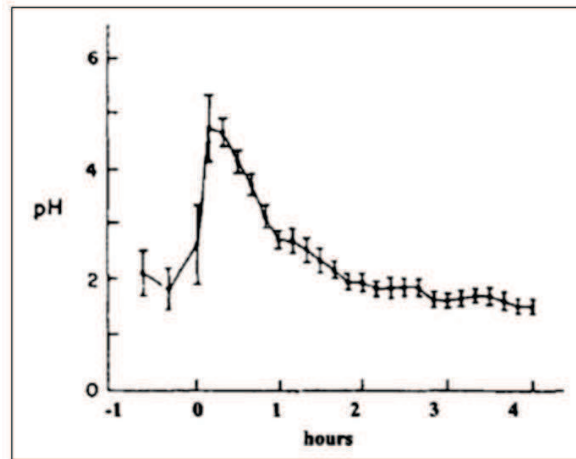


FIGURE 1.14 – Évolution du pH dans l'estomac après ingestion d'un repas par des volontaires. D'après Malagelada *et al.* (1976) dans Kong and Singh (2008). Le repas ingéré en 10 min était constitué de 90 g de steak cuit et coupé, de 25 g de pain blanc avec 8 g de beurre, et de 60 g de glace à la vanille avec 35 g de sauce chocolat.

190 mOsm/kg et la force ionique autour de 100 mM. Les principaux ions trouvés sont le sodium Na^+ , le potassium K^+ , le calcium Ca^{2+} et le chlorure Cl^- (Kong and Singh, 2008; Li, 2012). Les cellules mucoales de l'antrum produisent constamment, et de façon responsive, du mucus (Seeley *et al.*, 2008). Cette substance visqueuse et alcaline s'accumule sur les tissus et forme une couche de 1-1,5 mm d'épaisseur, ce qui permet de les lubrifier tout en les protégeant de l'acidité environnante et de l'action enzymatique (auto-digestion). Le mucus est composé à 95 % d'eau et à 5 % de glycoprotéines de haut poids moléculaire qui sont à l'origine de ses propriétés viscoélastiques (Plaisancié, 2013).

L'estomac est le siège d'une hydrolyse limitée des lipides et des protéines, de l'ordre de 10 % (Norton *et al.*, 2014), mais il fait subir un traitement mécanique important à la matrice alimentaire qui peut changer profondément sa structure. Le traitement mécanique de l'aliment en phase gastrique a été en particulier étudié par l'équipe de R.P. Singh (Ferrua and Singh, 2010; Kong and Singh, 2008; Zeng *et al.*, 2015). C'est au niveau de la partie distale de l'estomac (antre et pylore) que les forces de cisaillement, observées par imagerie en condition *in vivo*, sont les plus fortes et où le traitement mécanique se joue donc principalement (Kong and Singh, 2008). Les contractions péristaltiques de la paroi stomacale contribuent à l'érosion des morceaux d'aliments et les réduisent en plus petites particules tout en les mélangeant avec les sécrétions gastriques pour former le chyme (Bornhorst and Singh, 2014; Guerra *et al.*, 2012; Seeley *et al.*, 2008). Le pylore et le sphincter pylorique agissent comme une pompe et un tamis : les particules de taille inférieure à environ 2 mm passent progressivement dans le duodénum, la première section de l'intestin (Norton *et al.*, 2014; Seeley *et al.*, 2008). La

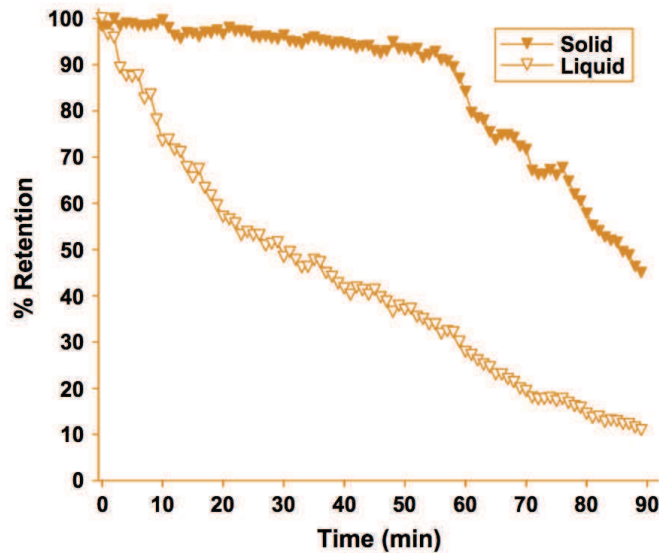


FIGURE 1.15 – Courbes de vidange gastrique pour un aliment solide (omelette) et liquide (boisson), exprimées comme le taux de rétention du repas dans l'estomac en fonction du temps (Hellström *et al.*, 2006).

vidange gastrique est plus ou moins longue en fonction de l'aliment de départ, en particulier selon le volume ingéré et sa densité calorique (Hunt *et al.*, 1985; Malagelada and Azpiroz, 2011). Le profil, généralement exponentiel, et la durée de la vidange sont également bien différenciés entre un aliment solide, qui peut faire apparaître une phase de latence, et un aliment liquide qui se vidange dès l'ingestion (Fig. 1.15, Hellström *et al.* (2006)). En fin de digestion, des particules qui auraient résisté à la digestion gastrique sont toutefois capables d'être transférées au travers du pylore même si celles-ci ont un diamètre supérieur à 2 mm (Dressman, 1986; Kong and Singh, 2008).

3.1.3 L'intestin grêle

Les fonctions de l'intestin grêle sont de poursuivre, quasiment totalement, l'hydrolyse initiée dans l'estomac, tout en étant le lieu d'absorption des nutriments (Griffiths, 2012). Les parois de cet organe tubulaire, d'une longueur totale de 6 à 8 m (2,5 à 3 m *ante-mortem* due aux contractions musculaires) pour un diamètre de 2,5 à 3 cm (Stanfield, 2012), sont tapissées de muscles contractiles assurant un mélange du chyme avec les sécrétions intestinales et sa progression. Il faudra généralement un total de 3 à 5h aux matières nutritives pour parcourir la distance allant du pylore à la jonction iléo-caecale ((Seeley *et al.*, 2008).

La première section, le duodénum (25-38 cm), réceptionne le chyme de l'estomac, le dilue de moitié environ avec des sécrétions provenant de la vésicule biliaire, du foie, du pancréas. Dans le duodénum à jeun la molarité s'établit autour de 180 mOsm/kg et la force ionique

autour de 140 mM (Li, 2012). Parmi les électrolytes (chlorure Cl^- , sodium Na^{2+} , calcium Ca^{2+} , magnésium Mg^{2+}), l'ion hydrogénocarbonate (HCO_3^-) est sécrété en quantité importante afin de neutraliser l'acidité du chyme (Norton *et al.*, 2014; Seeley *et al.*, 2008). Le pH est proche de la neutralité à jeun mais peut descendre aux alentours de 5 suite à l'arrivée du chyme, avant de remonter progressivement. Le pancréas sécrète un mélange complexe de protéases et de lipases (Parties 3.2 et 3.3) qui rejoignent le duodénum au niveau de la jonction entre duodénum et l'arbre hépato-bilio-pancréatique, avec un débit contrôlé par le sphincter d'Oddi. Le pancréas produit également l' α -amylase pancréatique permettant la dégradation de glucides (Whitcomb *et al.*, 2007). La bile libérée par la vésicule biliaire (contenant des acides biliaires) se mêle au jus pancréatique à ce même niveau et aide à la digestion des lipides (Partie 3.2). Elle a également une action alcalinisante.

La seconde section de l'intestin grêle est le jéjunum (2,5 m). Les réactions enzymatiques commencées dans le duodénum s'y poursuivent : dégradation des polysaccharides en monosaccharides, des triacylglycérols en acides gras libres et monoacylglycerol et des protéines en acides aminés. Ces nutriments sont alors absorbés par les cellules épithéliales (Seeley *et al.*, 2008; Stanfield, 2012).

La digestion des aliments est complétée lors du passage dans la dernière section, l'iléon (3,5 m), dont la fonction principale est l'absorption des sels biliaires mais où débute aussi celle de l'eau contenue dans le chyme (Stanfield, 2012). Sur la fin de l'iléon, la perte d'humidité provoque une concentration des matières non digérées, servant de milieu propice au développement microbien, qui va se poursuivre dans le côlon (Payne *et al.*, 2012). Ces résidus peuvent être de plusieurs origines (Norton *et al.*, 2015; Salonen and de Vos, 2014). Les polysaccharides non digestibles, ou fibres alimentaires, sont résistants à la dégradation et à l'absorption. Il peut s'agir de polysaccharides non amidonnés ou d'amidon résistant. Les bactéries intestinales peuvent prendre en charge ces matières par un arsenal d'enzymes qui leur sont propres, ce qui donne lieu à une fermentation. Les fibres sont ainsi considérées comme des pré-biotiques. Dans une moindre mesure, même si les protéines et les lipides sont en général très bien digérés dans l'intestin, la fraction non absorbée est prise en charge par les bactéries.

3.1.4 Le côlon

Le côlon est réparti en une section ascendante, transverse et descendante et mesure 1,5 m au total (Griffiths, 2012). Les fractions de l'aliment non absorbées durant la phase intestinale s'accumulent dans la lumière du côlon et sont transportées le long de ses sections grâce à des contractions péristaltiques et à une lubrification par du mucus. 90 % de l'eau contenue dans ces résidus entrant dans le côlon va être peu à peu réabsorbée par l'organisme, formant les matières semi-solides que sont les fèces (Griffiths, 2012; Seeley *et al.*, 2008; Stanfield, 2012). Les mouvements musculaires du côlon sont moins fréquents que dans l'intestin grêle, les fèces sont poussés vers l'anus, organe de la défécation, en 18 à 24h (Seeley *et al.*, 2008).

Le côlon est également le lieu d'une intense activité microbienne. Les fèces fournissent en effet un substrat pour l'ensemble des micro-organismes présents dans le côlon, qui forment le microbiote. La concentration microbienne atteint plus de 10^{12} cellules/g de matière fécale dans la dernière section du côlon, répartie en plusieurs centaines d'espèces différentes (Cani, 2009; Griffiths, 2012; Payne *et al.*, 2012; Stanfield, 2012). Un quart du poids des fèces est d'ailleurs bactérien. Le microbiote constitue un véritable écosystème, dont on ne commence à explorer le fonctionnement que depuis les années 2000 ; il rassemblerait 10 fois plus de cellules que celles du corps de l'hôte et son métagénome aurait une capacité codante 100 fois supérieure (Salonen and de Vos, 2014). Il est rapidement acquis après la naissance par l'exposition aux microbes de la mère et de l'environnement (Salonen and de Vos, 2014). Sa composition montre une certaine stabilité au cours de la vie, qui reste unique à chaque individu. Si l'apport de nouvelles bactéries est possible, notamment par l'alimentation, la composition du microbiote est le résultat d'un équilibre des interactions entre les différentes communautés, ce qui procure une certaine résilience à long terme. Ainsi, si l'abondance relative des espèces peut varier et que le microbiote a une certaine plasticité, le retour à l'équilibre ne permet pas, sauf pathologie, l'implantation significative de nouvelles espèces invasives. La fermentation au sein du côlon est importante pour la santé. L'organisme de l'hôte profite en effet des capacités de synthèse de nutriments essentiels (vitamines B12 et K par exemple). De plus, certains métabolites dérivés des fibres indigestibles pourront être absorbés et mis à disposition de l'organisme par la circulation générale (acides gras à chaînes courtes ou à chaînes branchées par exemple) (Cani, 2009; Payne *et al.*, 2012). Il est notamment estimé que le microbiote fournit 10 % de l'énergie de l'hôte par les acides gras à chaînes branchées ainsi produits (Payne *et al.*, 2012). Faisant suite à la mesure de la complexité et de l'importance du microbiote intestinal, des études testent la possibilité de modifier le microbiote par un certain régime alimentaire et étudient

ses conséquences sur la santé. Si la recherche des relations entre microbiote, alimentation et santé en est encore au stade exploratoire, certains mécanismes sont identifiés. Par exemple un état inflammatoire accru des tissus adipeux dans des régimes hyper-lipidiques, ferait suite à la présence de lipopolysaccharide d'origine microbiennes, constituant une véritable endotoxémie métabolique (Cani, 2009).

3.2 La digestion des lipides

L'hydrolyse des **triacylglycérols (TAG)**, ou **lipolyse**, consiste en une réaction de dés-estérification formant des **acides gras libres (AG)** et des **monoacylglycérol (MAG)**. En phase orale, celle-ci a été discutée par certains auteurs mais, jusqu'à preuve du contraire, la lipase linguale n'existe pas chez l'Homme (Carrière, 2013). Les traces d'activité lipolytique détectables dans la salive seraient expliquées par l'action du microbiote oral (Neyraud *et al.*, 2012). La lipolyse intervient ainsi principalement au niveau de l'estomac et de l'intestin. 95 % des lipides ingérés seront absorbés lors de la digestion (Lairon, 2009).

3.2.1 La phase gastrique

La **lipase gastrique** est produite au niveau du fundus de l'estomac directement sous forme active (Favé *et al.*, 2007; Gargouri *et al.*, 1989). Son activité est responsable d'une hydrolyse partielle des lipides de la portion alimentaire : 10 à 30 % (Armand *et al.*, 1999; Carrière *et al.*, 1993; Gallier *et al.*, 2016). Elle possède une stéréopréférence sn-3 pour l'hydrolyse des liaisons esters des TAG mais peut intrinsèquement hydrolyser les trois liaisons esters (Carrière *et al.*, 1997; Lairon, 2009). Les produits de l'hydrolyse ont tendance à s'accumuler à l'interface des globule gras, essouffant ainsi la réaction (Pafumi, 2002). Son pH optimal se situe entre 4,5 et 5,5 (Whitcomb *et al.*, 2007) et son activité dépend du substrat (Carrière *et al.*, 1993), elle agit donc plus rapidement dans la première heure de digestion gastrique, lorsque le pH n'est pas encore trop bas (Carrière *et al.*, 2000). L'activité de la lipase gastrique n'a été mesurée *in vivo* que récemment (Carrière *et al.*, 2000) et elle diffère sensiblement de ce qui a pu être mesuré *in vitro*. Son rôle a longtemps été négligé alors qu'elle peut hydrolyser des acides gras de toutes les tailles. Son existence n'est parfois même pas mentionnée (Carey *et al.*, 1983) ou peu discutée en physiologie (Seeley *et al.*, 2008). Elle a pourtant un rôle complémentaire à la lipase pancréatique de la phase intestinale (Carrière *et al.*, 1993) en préparant son action par un changement de l'interface des globules gras, tout en fournissant déjà de l'énergie par l'absorption de lipides dès l'estomac (Favé *et al.*, 2007). L'utilisation *in vitro* de la lipolyse gastrique n'est pas encore courante en raison de la difficulté de s'en

procurer par extraction/purification chez d'autres mammifères. La lipase gastrique de chien a cependant récemment été purifiée et a montré une activité suffisamment haute (Carrière *et al.*, 1991). Un certain nombre d'études utilisent de la lipase d'origine fongique qui permet, si elle est assez concentrée, d'atteindre des niveaux d'hydrolyse dans l'estomac *in vitro* proches de la réalité. Elle ne présente cependant pas les mêmes spécificités (Day *et al.*, 2014; Marze *et al.*, 2014; Minekus *et al.*, 2014).

Le changement drastique de milieu que la matrice subit en arrivant à l'estomac, ainsi que les forces mécaniques qui y règnent, peuvent changer profondément la structure de l'aliment mâché. En conjonction avec l'hydrolyse des protéines (Partie 3.3.1), une partie de la matière grasse peut être expulsée de sa matrice initiale et se concentrer en couche, par différence de densité, à la surface du contenu stomacal. Elle peut également être émulsifiée par les puissants mouvements péristaltiques au niveau du pylore (Fig. 1.16, Golding and Wooster (2010)). Les interactions matrice-estomac seront discutées plus en détails dans le cas des émulsions alimentaires (Partie 5.2). Lorsqu'elles s'opèrent, ces transformations peuvent donc moduler l'accès de la lipase gastrique à son substrat, mais aussi moduler l'état dans lequel les lipides arrivent au duodénum, et *in fine* la lipolyse intestinale.

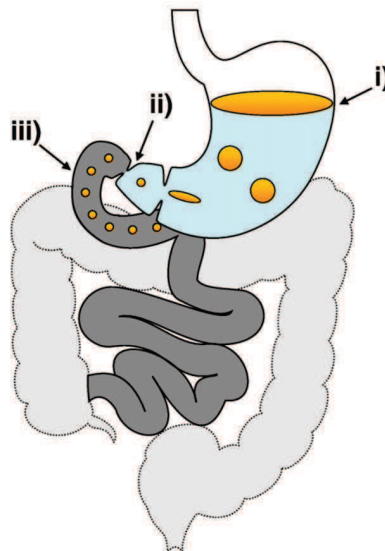


FIGURE 1.16 – La fraction lipidique d'un aliment peut former une couche ou une crème en haut de l'estomac (i). Les contractions et ondes péristaltiques au niveau du pylore permettent un certain degré de ré-émulsification (ii). La lipolyse intestinale prend alors le relais au niveau du duodénum (iii). D'après Golding and Wooster (2010).

3.2.2 La phase intestinale

Plusieurs lipases sont produites par les cellules pancréatiques. La triacylglycérolacyldrolase (ou plus simplement **lipase pancréatique**) est l'enzyme principale, accompagnée de la phospholipase A2 pancréatique, de la carboxylester hydrolase et de la lipase pancréatique apparentée de type 2 humaine. Elle agit en position sn-1 et sn-3 des TAG et libère ainsi deux AG et le sn-2 MAG. Étant hydrosoluble, son action dépend de sa capacité à s'adsorber à la surface des lipides. Une coenzyme, la colipase, est également produite par le pancréas. En formant un complexe au ratio 1 : 1 avec la lipase, elle permet d'activer cette dernière en lui fournissant un point d'ancrage sur les substrats lipidiques (Whitcomb *et al.*, 2007).

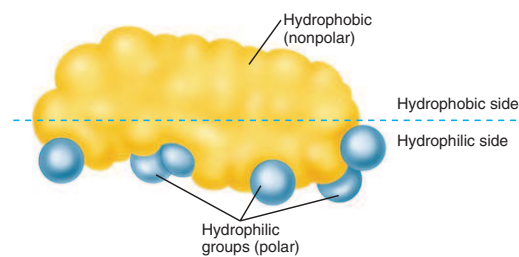


FIGURE 1.17 – Représentation spatiale d'un acide biliaire. Les groupes polaires hydrophiles sont représentés en bleu (Stanfield, 2012).

La bile est un produit du foie, stocké dans la vésicule biliaire. L'organisme en produit 600 à 1000 ml par jour (Seeley *et al.*, 2008). Elle joue un rôle important dans la digestion des lipides (Sarkar *et al.*, 2016). Les acides biliaires qu'elle contient sont des molécules dérivées du cholestérol, qui par leur nature amphiphile et leur conformation plate (Fig. 1.17) vont pouvoir se placer à l'interface des gouttelettes lipidiques en remplaçant une partie des émulsifiants d'origine. Elles participent ainsi au lavage (action détergente) des interfaces, favorisant l'adsorption du complexe lipase/colipase ainsi que l'évacuation des produits de la lipolyse pour éviter l'inhibition de la réaction. Les produits de l'hydrolyse évacués peuvent alors former des vésicules à partir de l'interface vers le milieu environnant (d'une taille de 20 à 60 nm), ou des micelles mixtes avec les acides biliaires qui mesurent autour de 4 nm (Golding and Wooster, 2010; Lairon, 2009; Stanfield, 2012). La distance réduite entre les microvilli des cellules en brosse de la paroi intestinale (15-20 nm) ne permet pas une absorption directe des lipides. Les micelles mixtes vont donc faciliter le passage des acides gras vers les entérocytes des cellules épithéliales afin d'être absorbés par l'organisme (Lo and Tso, 2009). Ensuite, selon leurs spécificités, les produits de la lipolyse peuvent emprunter 2 voies différentes. Les AG à chaîne courte et moyenne passent directement dans le système sanguin par la veine porte en se liant avec les albumines. Les MAG et AG à chaîne longue sont restructurés sous la forme de

chylomicrons (lipoprotéines de 80-500 nm très riches en TAG) qui transitent par le système lymphatique avant d'arriver dans le système sanguin périphérique. Les acides biliaires sont quant à eux recyclés à 95 % dans le dernier mètre de l'iléon (Griffiths, 2012; Stanfield, 2012).

3.3 La digestion des protéines

Il n'y pas de trace de protéases dans les glandes salivaires. La protéolyse intervient donc principalement au niveau de l'estomac et de l'intestin. L'efficacité du système digestif permet une digestibilité des protéines ingérées généralement supérieure à 90 % mais varie en fonction de l'origine de la protéine ou de son traitement. Un exemple extrême serait celui de l'œuf qui montre une digestibilité de 51 % cru, mais de 91 % cuit (Moughan, 2009).

3.3.1 La phase gastrique

Les cellules principales de l'estomac produisent une enzyme inactive, ou pro-enzyme, le pepsinogène. Au contact de l'acide chlorhydrique, produit par les cellules pariétales, elle est convertie en **pepsine** par hydrolyse acide du pepsinogène. Elle ne montre quasiment pas d'activité au-dessus d'un pH 5,5, mais celle-ci atteint 70 % dès pH 4,5 et est la plus active dans la gamme pH 2 à 4 (Barrett *et al.*, 2004; Minekus *et al.*, 2014; Piper and Fenton, 1965). Sa spécificité plutôt large permet d'initier la dégradation des protéines ingérées, aidée par la dissolution des matières dans l'acidité environnante, et de les dégrader en fragments peptidique pour faciliter l'hydrolyse en aval. Environ 10% de l'hydrolyse des protéines est attribuée à la phase gastrique (Griffiths, 2012) mais varie grandement avec les protéines ou leur traitement. Par comparaison, Asselin *et al.* (1989) trouvent 1,7 % après 4 h d'incubation dans un milieu gastrique simulé. D'autres études *in vitro* montrent que le traitement à la chaleur de ces protéines permet d'augmenter leur sensibilité à la pepsine (Kim *et al.*, 2007; Reddy *et al.*, 1988). L'environnement acide de l'estomac, la présence d'autres composés (phospholipides) ainsi que l'état des protéines (natives ou dénaturées, en solution ou à l'interface de globules gras) peut modifier la disponibilité des protéines (Mackie and Macierzanka, 2010).

3.3.2 La phase intestinale

Les principales protéases du pancréas sont la trypsine, la chymotrypsine, la carboxypeptidase et l'élastase, par ordre quantitatif, chacune présentant plusieurs variétés (Whitcomb *et al.*, 2007). Elles sont également sécrétées sous une forme de pro-enzymes inactives. Leur pH optimum est autour de 7-8. La trypsine, la chymotrypsine, et l'élastase ont une structure tridimensionnelle similaire, caractérisée par cristallographie en rayons X, et sont de la fa-

mille des protéases à sérine. Elles ont donc un mécanisme d'action très proche mais avec une spécificité différente vis-à-vis des liaisons peptidiques. Par exemple la trypsine hydrolysera préférentiellement les liaisons peptidiques du côté carboxyle de la lysine et de l'arginine alors que la chymotrypsine agira préférentiellement du côté carboxyle des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane).

Les acides aminés libres, produits par l'hydrolyse des protéines, sont transportés à travers les membranes des cellules de la paroi intestinale par co-transport du sodium pour être métabolisés par l'organisme. D'autres transporteurs permettent aussi d'absorber directement des di- et tri-peptides, notamment des peptidases produites par la bordure en brosse des cellules épithéliales, bien que de petits polypeptides puissent également passer la paroi directement par diffusion passive (Moughan, 2009; Picariello *et al.*, 2015; Stanfield, 2012).

4 Étude de la digestion : les principales approches

La digestion est un mécanisme du vivant complexe dont l'accès à l'expérimentateur n'est jamais aisé. Il est donc nécessaire de développer différentes approches, complémentaires, pour étudier le devenir des aliments au cours de la digestion. On peut distinguer trois grandes catégories d'approches : les approches *in vivo* qui expérimentent sur des organismes vivants, les approches *in vitro* qui cherchent à simuler les conditions auxquelles est soumis normalement l'aliment ingéré, et les approches *in silico* qui, sur la base de données expérimentales, visent à développer des programmes informatiques capables de simuler et de prédire l'évolution des grandeurs d'intérêt. Ce dernier type d'approche ne sera pas abordée ici.

4.1 Les approches *in vivo*

L'expérimentation chez l'Homme, reste un passage obligé quand il s'agit d'améliorer notre connaissance de la digestion humaine et de ses répercussions. Par exemple, comprendre des phénomènes tels que la satiété ou le rassasiement, ou l'effet des régimes alimentaires sur l'apparition de certaines pathologies (obésité, diabète, maladie du système digestif, allergies, etc.) passe inévitablement par des études chez l'Homme. Ces approches permettent d'étudier le devenir de l'aliment dans le tube digestif, en tant qu'entité physique (parties solides/liquides dans les compartiments du tube digestif) et chimique (libération des nutriments) dans des conditions réelles qui englobent la complexité de la chaîne des phénomènes mécaniques, biologiques et physico-chimiques (Gaudichon, 2013; Golding and Wooster, 2010; Guerra *et al.*, 2012; Hur *et al.*, 2011). Diverses méthodes permettent de suivre le cheminement du bol alimentaire et sa dynamique de métabolisation (Gaudichon, 2013) : méthodes directes

(iléostomie, sondes gastriques et intestinales, marqueurs radioactifs ou colorés, scintigraphie, IRM, échographie) ou indirectes (*e.g.* expiration du $^{13}\text{CO}_2$, niveaux circulant des nutriments métabolisés).

Néanmoins les études chez l'Homme ont également des limites. Le faible nombre d'individus impliqués dans les cohortes, le temps nécessaire aux expérimentations et leur prix sont des facteurs compliquant l'acquisition de données à fort poids statistique. La variabilité intra et inter-individu et le grand nombre de phénomènes à prendre en considération peuvent également compliquer l'interprétation. De plus, des règles éthiques strictes doivent être respectées. L'accès aux différents étages du tube digestif pour une analyse poussée et en direct des cinétiques d'hydrolyse et de déconstruction reste donc difficile, sans compter que certaines méthodes sont invasives et peuvent donc éloigner l'expérience des conditions réelles voulues. Des animaux peuvent aussi être utilisés comme modèles de la digestion humaine : chien, poulet, rat, porc. Ces deux derniers étant les plus courants. L'utilisation de modèles animaux permet de procéder à des analyses plus intrusives et plus longues dans le temps que sur des humains tout en apportant un avantage logistique. Toutefois, les mêmes limites, bien que moindres, que celles listées pour les études chez l'Homme peuvent être soulevées. La question de la qualité du modèle animal utilisé est également un point crucial.

4.2 Les approches *in vitro*

Les approches *in vitro* représentent un domaine expérimental en plein développement en complément ou en alternative aux études *in vivo* (Blanquet-Diot *et al.*, 2013; Guerra *et al.*, 2012; Verhoeckx, Kitty *et al.*, 2015). Les domaines de de la recherche et des industries de la nutrition, mais aussi de la toxicologie, de la pharmacologie et de la microbiologie se penchent sur le devenir de la matrice ingérée au cours de la digestion et sont amenés à utiliser ces méthodes, et donc à participer à leur développement. Les systèmes varient entre les équipes de recherches (Guerra *et al.*, 2012; Hur *et al.*, 2011) mais peuvent être classés en fonction de leur complexité. On peut distinguer deux grandes catégories d'approches, en rapport avec la sophistication du modèle : les modèles dynamiques et les modèles statiques (Golding and Wooster, 2010; Guerra *et al.*, 2012; Hur *et al.*, 2011; Wickham *et al.*, 2009).

Qu'ils soient statiques ou dynamiques, les modèles *in vitro* de digestion cherchent à reproduire une suite de conditions opératoires qui vont mimer de façon plus ou moins réaliste les conditions physiologiques de la digestion (Venema *et al.*, 2009). Plusieurs considérations importantes se dégagent et sont prises en compte dans ces approches. On peut lister, pour

les modèles de digestion gastro-intestinale :

- Le nombre de phases de digestion, leur succession et leur durée : phase orale, puis gastrique, puis intestinale. Cette séquence implique un cocktail d'enzymes digestives correspondant à chaque étape. La phase orale est la moins implémentée car elle est mécaniquement très complexe à simuler (Wickham *et al.*, 2009).
- Les conditions de pH et de concentration en co-facteurs (électrolytes, coenzymes, acides biliaires).
- Les flux de matières (apport des différentes solutions, évacuation des matières digérées à l'étape suivante) et les transformations mécaniques (géométrie du dispositif, force du mélange, force d'écrasement...).
- Le devenir des produits de la digestion : leur retrait progressif peut permettre d'éviter une inhibition des réactions enzymatiques.

De façon générale, l'intérêt de l'utilisation de modèles *in vitro* pour l'étude de la digestion est de pouvoir :

- Faciliter l'acquisition de données : reproductibilité, coût réduit, peu de considérations éthiques, la prise d'échantillons possible à chaque étape.
- Observer des processus inaccessibles autrement et donc compléter les études *in vivo*.
- Préparer une étude *in vivo* : prouver l'intérêt de l'objet d'étude (*pre-screening*) et la robustesse des hypothèses avant de passer à des moyens plus conséquents pour vérifier un effet biologique.

4.2.1 Les modèles dynamiques

La digestion est un enchaînement de nombreux processus dynamiques dont les conditions varient dans l'espace (entre les compartiments) mais également dans le temps au sein de chaque compartiment. Afin de coller à la réalité, les modèles dynamiques de digestion *in vitro* intègrent ces dimensions temporelles de la digestion et opèrent souvent avec plusieurs compartiments mimant les différents étages de la digestion et leur évolution temporelle. Ainsi, les cinétiques de changements de pH, le débit de solutions digestives apportées (enzymes, électrolytes et cofacteurs), le temps de séjour de l'aliment dans chaque compartiment, les mélanges, et parfois les contraintes mécaniques, ainsi que le transit vers le compartiment suivant sont assurés grâce à un jeu de pompes, de distributeurs de solutions, de sondes, de bains thermiques, etc. et contrôlés par ordinateur.

Le TIM-1 (pour TNO Gastro-Intestinal Model 1) fait ici référence car il est le plus évolué

pour simuler la digestion gastro-intestinale (Fig. 1.18, Guerra *et al.* (2012)). Les conceptions de ces systèmes varient quelque peu d'un dispositif à l'autre. Par exemple, le Human Gastric Simulator (HGS, Guo *et al.* (2014a)) utilise une série de rouleaux venant masser le contenu d'une poche en latex pour simuler le péristaltisme gastrique alors que le TIM-1 utilise de l'eau sous pression pour provoquer la contraction de compartiments en membranes flexibles. Le Dynamic Gastric Model (DGM, Wickham *et al.* (2009)) quant à lui utilise une poche où baignent le bol alimentaire et les enzymes pour figurer le fundus de l'estomac. Une aspiration au travers d'une valve par un piston crée les conditions d'une dégradation mécanique équivalente à l'antrum de l'estomac. Le Digesteur Dynamique Gastro-Intestinal (DIDGI, Ménard *et al.* (2014)), développé par l'INRA, ne cherche pas à reproduire les aspects biomécaniques, et utilise une série de réacteurs en verre à double enveloppe reliées à des pompes péristaltiques pour l'arrivée des sécrétions et pour faire passer la matière d'un compartiment à un autre (Fig. 1.19).

Malgré leur praticité par rapport à l'*in vivo*, ces systèmes ont plusieurs limites. D'abord les systèmes les plus complexes demandent un effort d'ingénierie et une importante étape de paramétrage avec des données *in vivo*, ce qui peut constituer un frein important. Ensuite, l'analyse des résultats n'est pas toujours aisée compte-tenu du nombre, encore conséquent, de phénomènes à prendre en considération. Par exemple, il devient difficile de remonter à une cinétique d'hydrolyse lorsque les concentrations en enzyme et en substrat, et parfois le pH, varient continuellement au sein d'un compartiment. Par ailleurs, la simulation ne peut être parfaite car elle ne tient pas compte des réponses de l'hôte comme les rétrocontrôles hormonaux, les réflexes nerveux, l'activité des cellules, etc.

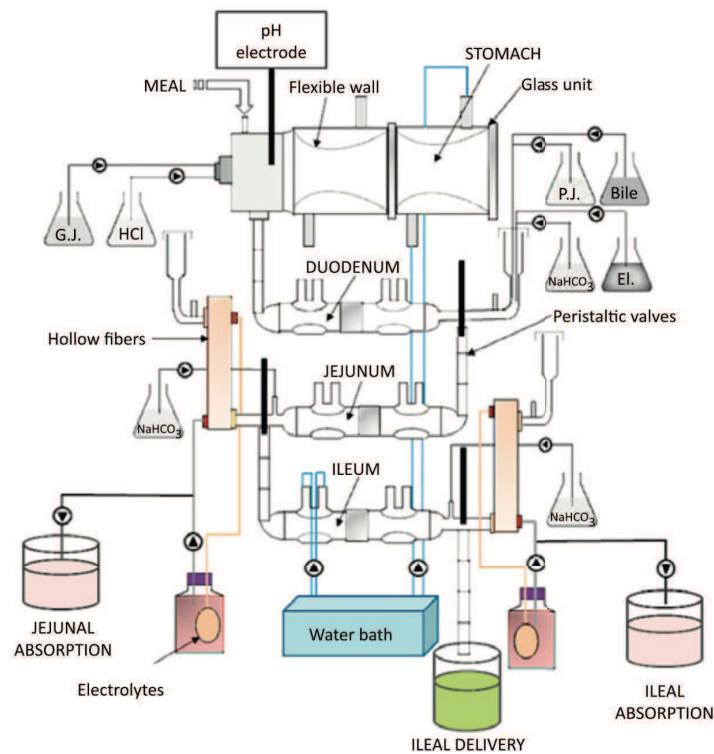


FIGURE 1.18 – Schéma de principe du TIM-1 (pour TNO Gastro-Intestinal Model 1), le modèle *in vitro* de digestion gastro-intestinale le plus avancé (Guerra *et al.*, 2012).

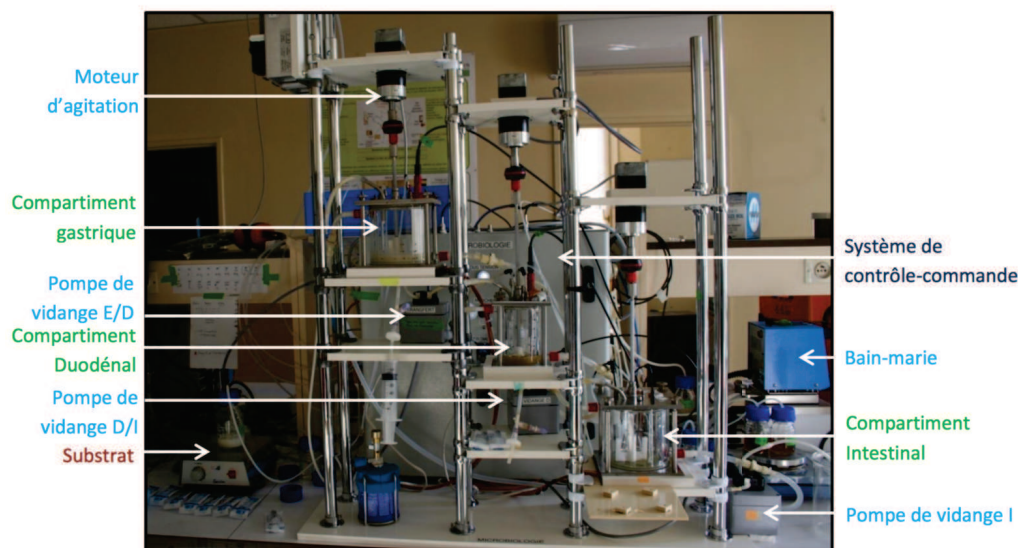


FIGURE 1.19 – Photographie du DIDGI, un système de digestion *in vitro* multi-compartiments développé à l'INRA (Ménard *et al.*, 2014). Crédit photo Adouard (2015).

4.2.2 Les modèles statiques

Les modèles de digestion statiques, ou en batch, se distinguent des modèles dynamiques par le fait qu'ils visent généralement à l'étude spécifique de l'hydrolyse enzymatique dans des conditions simplifiées : un seul ou une séquence des différents compartiments digestifs sont simulés avec des conditions digestives fixes indépendantes du temps. En procédant par simple

immersion de l'aliment dans un milieu déterminé, avec ou sans agitation, l'expérience réduit la digestion aux réactions enzymatiques sans contrôle des aspects temporels et de transfert de matière. En simplifiant de beaucoup le processus digestif, ils ont l'avantage d'un faible coût, d'une la facilité de mise en place, d'emploi, et de traitement des résultats (Blanquet-Diot *et al.*, 2013; Guerra *et al.*, 2012; Verhoeckx, Kitty *et al.*, 2015; Wickham *et al.*, 2009). Ce sont donc naturellement les dispositifs le plus souvent utilisés pour des études ciblées ou comme moyen de pre-screening. Hur *et al.* (2011) listait, il y a plus de 5 ans, plus de 80 études différentes avec ces systèmes allant, par exemple, de l'étude de la libération du fer dans le raisin à celle de l'influence des fibres sur la stabilité d'une émulsion, en passant par celle de l'activité antioxydante du thé vert. Le choix des enzymes, de leur concentration et des durées de digestion est adapté en fonction de l'aliment ou du nutriment étudié, ce qui donne une grande variabilité dans les méthodes. De plus, la digestion statique peut être associée à des cultures cellulaires de type Caco-2 afin de simuler l'absorption des nutriments par les cellules épithéliales (lipides provenant de plusieurs émulsions chez Vors *et al.* (2012) par exemple).

Face au nombre important de protocoles de digestion statique est apparu un besoin d'harmonisation des paramètres utilisés, garante de reproductibilité et de comparabilité entre les études faites par différents laboratoires. Une initiative internationale au sein de l'action COST Infogest (European Cooperation in Science and Technology, « Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process ») s'est emparée de cette question. Un protocole de digestion oro-gastro-intestinale faisant consensus a ainsi été publié dont la Figure 1.20 montre les différentes étapes (Minekus *et al.*, 2014). Le travail expérimental de cette thèse s'est principalement basé sur ce protocole.

4.2.3 Suivi d'hydrolyse par pH-stat

La titration constitue une méthode classique en chimie. Le principe de la titration en mode pH-stat est applicable à beaucoup de réactions, dont certaines réactions enzymatiques ayant lieu lors de la digestion. Dans ces approches, le pH du milieu réactionnel est maintenu à une valeur consigne grâce à l'ajout contrôlé d'une solution titrante qui permet de contrebalancer un changement de pH naturellement induit par la réaction étudiée. Ainsi, la dynamique de titration traduit la cinétique réactionnelle (Fig. 1.21).

Dans le domaine de recherche lié à la digestion des aliments, cette méthode est utilisée pour suivre l'hydrolyse des lipides ainsi que l'hydrolyse des protéines, souvent dans des conditions neutres ou légèrement basiques, telles que celles rencontrées dans l'intestin grêle (études résumées dans le Tableau 1.3 et 1.4). Dans ces conditions de pH, les réactions de lipolyse et

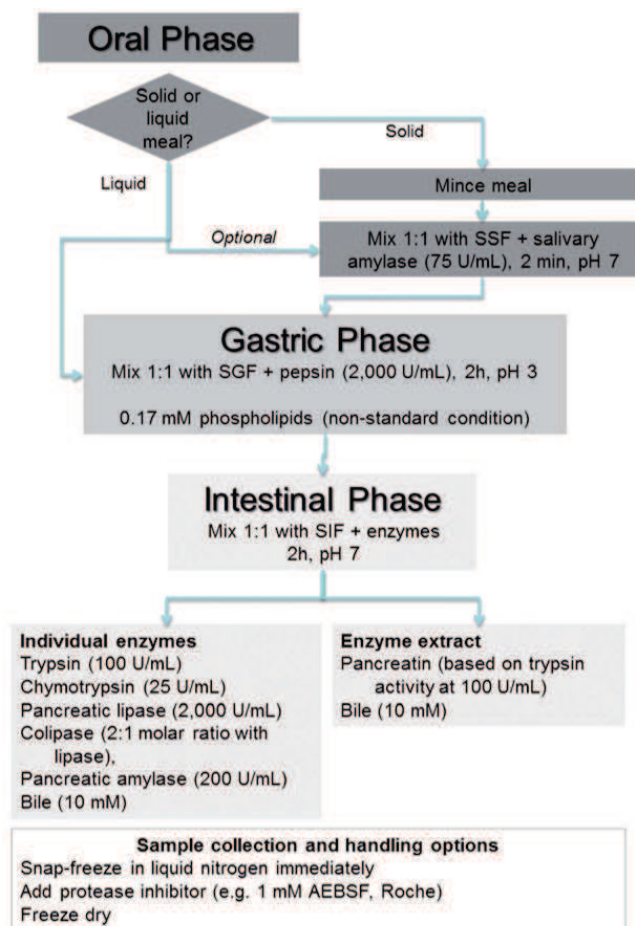


FIGURE 1.20 – Schéma représentant les principales étapes du protocole Infogest (Minekus *et al.*, 2014).

de protéolyse ont tendance à faire descendre le pH du milieu réactionnel, rendant ces réactions titrables par une solution basique. Le pH de consigne est généralement dans la gamme de 6.5 à 8, et la solution titrante utilisée est très souvent de l'hydroxyde de sodium (NaOH), moins souvent de l'hydroxyde de potassium (KOH). Parfois, le système étudié est soumis à une phase gastrique préalable mais sans suivi pH-stat.

L'avantage de la méthode est d'abord de pouvoir comparer rapidement différents systèmes alimentaires dans des conditions de digestion identiques et contrôlées. Elle permet aussi d'obtenir une mesure en continu de l'avancement de la réaction étudiée, et laisse, par sa nature non destructive, la possibilité de procéder à des analyses plus poussées sur des prélèvements. L'instrumentation nécessaire au pH-stat a enfin l'avantage d'être légère et peu coûteuse ; beaucoup de laboratoires peuvent ainsi s'équiper.

Suivi de l'hydrolyse des lipides en phase intestinale La Figure 1.22 résume le principe du pH-stat pour le suivi de la lipolyse des conditions de pH neutre ou basique. La

Tableau 1.3 – Revue de l’objet et des conditions opératoires de plusieurs études utilisant la méthode pH-stat appliquée à la protéolyse.

Objet de l'étude	Type d'hydrolyse	Enzymes (ou mélange) utilisées	Durées	Conditions de titration	Autres analyses	Référence
Potentiel allergène des protéines de lactosérum	Gastrique et intestinale	Pepsine porcine, α -chymotrypsine, trypsine bovines, et pancréatine porcine	Gastrique 30 min Intestinal 1 h ou 4 h	Durant phase intestinale uniquement 37 °C NaOH 0,1 N pH-stat à pH 7,5	Tests d'allergie chez des enfants	(Asselin et al. 1989)
Corrélation entre la consommation de base par le pH-stat et le degré de protéolyse (protéines de lactosérum)	Enzyme microbienne	Protéase bactérienne	Pré-hydrolyse sur moins 20 min pour atteindre un certain degré d'hydrolyse puis titration en moins de 5 min	50 °C NaOH 2,0 N Montée du pH de 6,5 à 10,0	-	(Camacho et al. 2001)
Susceptibilité de la β -lactoglobuline à l'hydrolyse intestinale en fonction de la température de dénaturation thermique	Intestinale	Trypsine et α -chymotrypsine bovines	10 min	37 °C NaOH 0,1 N pH stat à pH 7 ou 7,5	-	(Stănciuc et al. 2008)
Comparaison de 3 méthodes de détermination des degrés de protéolyse de protéines de lactosérum par une protéinase et une peptidase commerciale	Enzymatique à des fins de modification des propriétés des protéines	Alcalase® et Debitrase®	6 h	50 °C NaOH 2 N pH stat à pH 7,0	Spectrophotométrie : méthode OPA et TBNS	(Spellman et al. 2003)
Modélisation de l'hydrolyse de protéines de lactosérum par une protéase commerciale	Enzymatique à des fins de modification des propriétés des protéines	Alcalase® immobilisée sur des particules de gels d'agarose (par un bain de 24 h)	15 min ou 5 h	50 °C NaOH 0,2 ou 0,5 N pH stat à pH 6 à 11	-	(Sousa et al. 2004)
Comparaison de 3 méthodes de détermination des degrés de protéolyse de protéines de lactosérum	Intestinale	Trypsine et α -chymotrypsine bovines	45 min	40 °C NaOH 0,5 N pH stat à pH 8	Spectrophotométrie : méthode OPA et TBNS	(Turgeon et al. 1991)
Potentiel allergène des protéines de lactosérum	Gastrique et intestinale	Pepsine porcine, α -chymotrypsine, trypsine bovines, et pancréatine porcine	Gastrique 30 min Intestinal 1 h ou 4 h	Durant phase intestinale uniquement 37 °C NaOH 0,1 N pH-stat à pH 7,5	Tests d'allergie chez des enfants	(Asselin et al. 1989)
Corrélation entre la consommation de base par le pH-stat et le degré de protéolyse (protéines de lactosérum)	Enzyme microbienne	Protéase bactérienne	Pré-hydrolyse sur moins 20 min pour atteindre un certain degré d'hydrolyse puis titration en moins de 5 min	50 °C NaOH 2,0 N Montée du pH de 6,5 à 10,0	-	(Camacho et al. 2001)
Susceptibilité de la β -lactoglobuline à l'hydrolyse intestinale en fonction de la température de dénaturation thermique	Intestinale	Trypsine et α -chymotrypsine bovines	10 min	37 °C NaOH 0,1 N pH stat à pH 7 ou 7,5	-	(Stănciuc et al. 2008)

Tableau 1.4 – Revue de l’objet et des conditions opératoires de plusieurs études utilisant la méthode pH-stat appliquée à la lipolyse.

Objet de l'étude	Type d'hydrolyse	Enzymes (ou mélange) utilisées	Durées	Conditions de titration	Autres analyses	Référence
Impact de la lipolyse gastrique sur des formulations lipidique d'intérêt en pharmacologie (comme vecteurs d'un composé liposoluble)	Gastrique à pH acide et basique (conditions intra-gastrique et duodénale)	Lipase gastrique de chien recombinante (par modification génétique de maïs)	5 min	37 °C NaOH 0,1 N pH-stat dans la gamme pH 1,5 à 7,0 puis titration en retour vers pH 9	-	(Bakala-N'Goma et al. 2015)
Modulation de la lipolyse intestinale d'une émulsion par l'utilisation de mono- et diacylglycérols de lait à l'interface	Intestinale	Lipase pancréatique de porc	30 min	37 °C NaOH 0,1 N pH-stat à pH 7,0	Tensiométrie, granulométrie laser, mesure du potentiel zêta	(Chu et al. 2009)
Modulation de la lipolyse et de la stabilité d'émulsions par l'utilisation de mélange monoacylglycérols-caséinate comme émulsifiants	Gastrique et intestinale	Pepsine porcine et lipase fongique pour la phase gastrique Pancréatine porcine pour la phase intestinale	2 h gastrique 3 h intestinal	37 °C NaOH 0,1 N pH-stat à pH 6,8	Microscopie confocale, mesure de concentration surfacique en protéines, granulométrie laser, mesure du potentiel zêta, suivi <i>in vivo</i> chez des volontaires du taux de triglycérides dans le sang	(Day et al. 2014)
Compréhension des facteurs influençant la lipolyse intestinale dans les modèle de digestions statiques.	Intestinale	Pancréatine porcine	2 h	37 °C NaOH 0,1 N pH stat à pH 7,0 puis titration en retour vers pH 9	Spectrophotométrie	(Eldemrawy et al. 2015)
Détermination de l'activité lipolytique de différentes lipases sur un excipient pharmaceutique auto-émulsifiant	Gastrique et Intestinale	Pancréatine porcine, jus pancréatique humain, carboxyle ester hydrolase bovine, lipase pancréatique porcine, lipase gastrique de chien recombinante, lipase pancréatique humaine recombinante ou lipase pancréatique apparentée de type 2 humaine recombinante	3 min	37 °C NaOH 0,1 N pH stat à pH 7,0 puis titration en retour vers pH 9	-	(S. Fernandez et al. 2007)
Impact de l'instabilité d'émulsions à l'estomac sur la lipolyse intestinale en fonction des émulsifiants	Gastrique et intestinale	Pepsine et pancréatine porcines	2 h gastrique 3 h intestinal	37 °C NaOH 0,05 N pH stat à pH 6,8	Granulométrie laser, mesure du potentiel zêta, suivi <i>in vivo</i> chez des volontaires du taux de triglycérides dans le sang	(Golding et al. 2011)
Comparaison de la lipolyse d'une émulsion stabilisée par des protéines de lactosérum ou de la gomme arabique	Intestinale	Lipase pancréatique porcine	1 h	37 °C NaOH 0,5 N pH stat à pH 7,5	Chromatographie en phase gazeuse	(Helbig et al. 2012)
Modulation de la lipolyse d'une émulsion par complexation entre la β -lactoglobuline utilisée comme émulsifiant et des polysaccharides anioniques (alginate) en solution	Intestinale	Lipase pancréatique porcine	1 h	37 °C NaOH 0,05 N pH stat à pH 7	Microscopie optique, granulométrie laser, mesure du potentiel zêta	(Y. Li & McClements 2014)
Contrôle dynamique du taux de lipolyse par l'ajout de calcium	Intestinale	Pancréatine porcine	40 min	37 °C NaOH 1 N pH stat à pH 6,5	-	(Zangenberg et al. 2001)

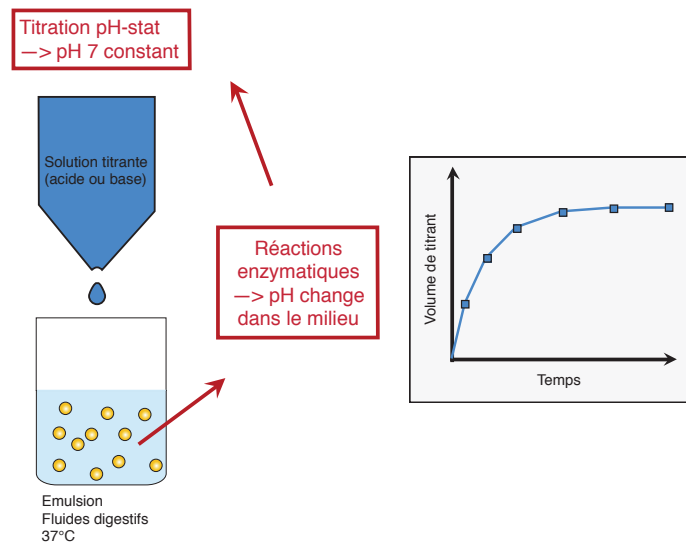


FIGURE 1.21 – Principe de la titration pH-stat durant la digestion d’une émulsion.

dé-estérification des TAG fait apparaître des acides gras, dont les groupements carboxyles tendent à libérer leur proton dans ces conditions de pH.

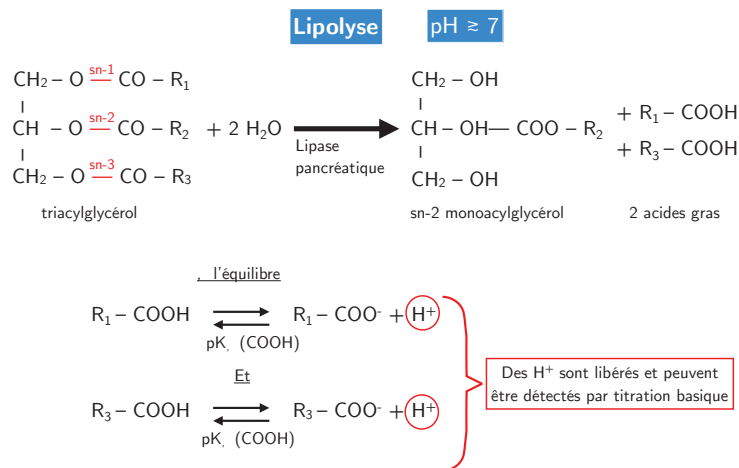


FIGURE 1.22 – Schéma de principe de la réaction l’hydrolyse des lipides par la lipase pancréatique et sa titration dans des conditions de pH neutre ou basique.

L’usage du pH-stat est très courant pour mesurer la lipolyse. Cette approche est d’ailleurs devenue une méthode de référence pour déterminer l’activité lipolytique des lipases chez Bakala-N’Goma *et al.* (2015); Carrière *et al.* (1993, 1991, 2000); Ville *et al.* (2002) et Supplementary Data de Minekus *et al.* (2014). Il existe par conséquent un grand nombre d’études sur la digestion intestinale des lipides par pH-stat, notamment en fonction des propriétés de l’émulsion dans laquelle ils sont incorporés, comme par exemple (McClements and Li, 2010b; Singh *et al.*, 2009) : composition et état physique de l’huile utilisée, concentration en huile,

nature de l'émulsifiant utilisé, taille des gouttelettes...

La plupart des études sur la lipolyse se limitent à donner les volumes de titrant ajoutés en fonction du temps, tandis que certaines les convertissent en une quantité d'acides gras titrables (Golding *et al.*, 2011). Cependant, selon le pH consigne et le pK_A des acides gras libérés par l'hydrolyse, une partie de ceux-ci ne libère pas leur proton et n'est donc pas détectée par titration (Fig 1.22). Ces équilibres acide-base dépendent des caractéristiques de chaque AG, de leur positionnement à l'interface ou non (Kanicky and Shah, 2002), mais aussi des conditions ioniques du milieu digestif. En présence de calcium, certains AG peuvent par exemple précipiter par saponification (Zangenberg *et al.*, 2001), ces AG précipités libèrent alors leur proton à 100 %. Pour pallier ces difficultés, Li (2012); Mun *et al.* (2006); Ye *et al.* (2013) préparent une courbe de calibration par la titration préalable d'une solution d'acide oléique. Les résultats des titrations expérimentales sont alors exprimés en μmol d'acides gras libérés par ml d'émulsion en fonction du temps. Se pose cependant la question de la représentativité de cet acide gras pour l'huile effectivement étudiée ensuite.

La conversion des volumes de titrant en **degrés d'hydrolyse** (ou pourcentages d'acide gras libérés, noté **DH**) n'est donc pas immédiate. Une manière de le faire est de calculer le nombre d'acides gras théoriquement libérables à partir de la quantité d'huile mise à digérer, à raison de deux AG par TAG dans le cas de la lipase pancréatique. Ce raisonnement conduit à la relation suivante :

$$DH_{lip} = 100 \times \frac{V \times N \times M}{m \times 2} \times \frac{1}{\alpha_{\text{COOH}}} \quad (1.2)$$

où V est le volume de titrant ajouté (ml), N sa normalité (eq/L), m la masse d'huile (g) et M la masse moléculaire moyenne des TAG de l'huile (g/mol). α_{COOH} correspond au degré moyen de dissociation des groupement carboxyles, que l'on peut estimer à l'aide de leur pK_A moyen par :

$$\alpha_{\text{COOH}} = \frac{10^{pH-pK_A(\text{COOH})}}{1 + 10^{pH-pK_A(\text{COOH})}} \quad (1.3)$$

Ce dernier paramètre permet de prendre en compte les AG non détectables par titration, préalable nécessaire pour estimer des DH. L'emploi d'un pK_A moyen pour l'ensemble des AG illustre que cette approche reste approximative, sans compter que ce paramètre, généralement autour de 6.5-9 à pH 7 (Fernandez *et al.*, 2008), reste difficile à estimer précisément. Elle demeure néanmoins très utile en pratique pour estimer des niveaux approchants de lipolyse au cours de la dynamique réactionnelle, ou pour comparer le comportement à l'hydrolyse de différentes structures lipidiques.

Même si la lipase pancréatique n'hydrolyse que les liaisons esters en sn-1 et sn-3 (2/3), les trois liaisons esters peuvent potentiellement être libérées, notamment par d'autres enzymes comme la CEH également présente dans les extraits pancréatiques. Avec la définition donnée ici, on pourrait donc dépasser les 100 % de DH.

Les travaux de Bakala-N'Goma *et al.* (2015); Carrière *et al.* (1991, 2001); Williams *et al.* (2012) utilisent quant à eux une méthode de titration en retour à la fin de l'étape de pH-stat qui permet d'apprécier la sous-estimation de la quantité d'acides gras libérés par la titration. Il s'agit de procéder à une titration pH-stat puis de remonter à un $\text{pH} \geq 9$ pour s'éloigner suffisamment des pK_A des AG et forcer leur détection. Un facteur de correction (ratio acides gras non-ionisés / ionisés) peut alors être appliqué sur les mesures de pH-stat et remonter à un DH. Si des précautions sont à prendre, cette stratégie est probablement la moins critiquable dans la mesure où elle permet de s'affranchir des estimations liées aux pK_A des AG. Ces travaux avaient pour principal objectif de déterminer l'activité de lipases gastriques (humaine ou de chien) ou pancréatiques sur des formulations lipidiques bien déterminées. Il n'y donc pas de retour d'expérience sur des titrations en retour dans des cas plus complexes, en particulier sur des aliments contenant un mélange de nutriments.

Suivi de l'hydrolyse des protéines en phase intestinale En regard du grand nombre de travaux sur les lipides, relativement peu d'études sont disponibles sur la protéolyse intestinale par suivi pH-stat. Elles sont notamment réalisées par ou suite au travail d'Adler-Nissen (Adler-Nissen *et al.*, 1983; Asselin *et al.*, 1989; Fernandez and Kelly, 2016; Navarrete del Toro and García Carreño, 2001; Spellman *et al.*, 2003; Turgeon *et al.*, 1991) mais pas toujours dans les conditions simulant la dégradation d'une protéine lors de la digestion, ni même d'une protéine dans un aliment modèle.

La Figure 1.23 résume le principe du pH-stat pour le suivi de la protéolyse dans ces conditions de pH neutre ou basique. L'hydrolyse d'une liaison peptidique fait apparaître un groupement amine et un groupement carboxyle. Les groupements carboxyles libèrent leur proton dans ces conditions de pH. Cependant, les amines peuvent consommer ces derniers, à un certain degré dépendant du pH de consigne et de leur pK_A , et contrebalancer ainsi ceux libérés par les carboxyles.

Comme pour les lipides, on peut dériver de ces équilibres réactionnels une équation permettant de revenir à un degré d'hydrolyse (Adler-Nissen *et al.*, 1983; Spellman *et al.*, 2003) :

$$DH_{prot} = 100 \times \frac{V \times N}{m \times h_{tot}} \times \frac{1}{\alpha_{\text{NH}_2}} \quad (1.4)$$

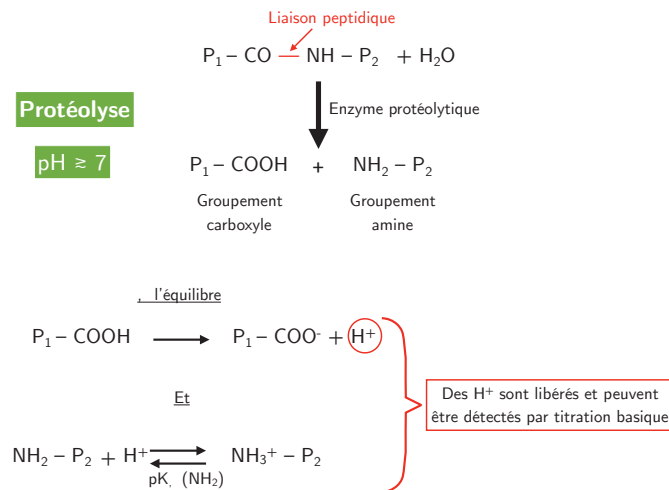


FIGURE 1.23 – Schéma de principe de la réaction l'hydrolyse des lipides par la lipase pancréatique et sa titration dans des conditions de pH neutre ou basique.

où h_{tot} est le nombre total de liaisons peptidiques par gramme de protéines (meqv/g), V le volume de titrant ajouté (ml), N sa normalité (eq/L), et m la masse de protéines (g). α_{NH_2} correspond au degré moyen de dissociation des groupements amines, que l'on peut de nouveau estimer à l'aide de leur pK_A moyen par :

$$\alpha_{NH_2} = \frac{10^{pH - pK_A(NH_2)}}{1 + 10^{pH - pK_A(NH_2)}} \quad (1.5)$$

Le facteur de correction recherché nécessite la connaissance d'un pK_A moyen et du nombre total de liaisons peptidiques pour les protéines utilisées afin de remonter à un DH. Cette démarche est d'ailleurs celle réalisée dans les travaux d'Adler-Niessen et retrouvée chez d'autres (Adler-Nissen *et al.*, 1983; Asselin *et al.*, 1989; Fernandez and Kelly, 2016; Navarrete del Toro and García Carreño, 2001; Spellman *et al.*, 2003; Turgeon *et al.*, 1991). Sa valeur dépend des conditions d'expériences comme le pH et la température mais aussi des peptides générés lors de l'hydrolyse, elle doit donc être déterminée avec prudence. Pour exemple, Spellman *et al.* (2003) réalise des hydrolyses à pH 7 de protéines de lactosérum avec des enzymes non digestives à 50 °C. Il estime le facteur de correction à 2,27 ce qui signifie que plus de la moitié des peptides générés ne sont pas détectés par titration. Cette difficulté à proprement estimer un facteur correctif pourrait expliquer le faible nombre d'études sur le suivi de la protéolyse en conditions intestinales. Il existe en effet d'autres méthodes relativement simples et précises pour remonter à des DH pour les protéines, telles que celles basées sur la détection des amines sur l'azote terminal des peptides néoformés (*e.g.* méthodes spectrophotométriques basées sur l'emploi d'ortophtalaldéhyde (OPA) ou d'acide trinitrobenzenesulfonique (TNBS)). Une étude

visant à comparer ces différentes méthodes tend en effet à conclure que ces dernières donnent des valeurs plus précises que celles obtenues par pH-stat (Turgeon *et al.*, 1991). Elles ne sont cependant pas des mesures de suivi en direct car elles nécessitent des prélèvements et une analyse à posteriori qui peut être longue mais pourrait servir à mieux estimer ce degré moyen de dissociation des groupes amines.

Conclusions Le passage d'un suivi d'hydrolyse par pH-stat à un DH n'est pas immédiat. Cette méthode est pourtant très utilisée pour étudier la lipolyse intestinale d'émulsions, et peut également être employée pour suivre les cinétiques de protéolyses. Au vu des données bibliographiques, l'étude de l'hydrolyse simultanée des lipides et des protéines associés dans une matrice complexe n'est jamais réalisée. De plus, à notre connaissance, il n'existe pas d'études suivant par pH-stat de l'hydrolyse des protéines en conditions gastriques. S'il semble impossible de suivre une réaction de lipolyse à pH acide, du fait des pK_A relativement hauts des acides gras (qui ne libèrent donc pas leur proton à pH acide), l'équilibre des états d'ionisation pour les peptides sont fortement en faveur des formes receveuses de protons (Damodaran, 1997; Damodaran *et al.*, 2007). Cela signifie que les réactions de protéolyse à pH acide tendraient vers une alcalinisation du milieu, qui pourrait donc être titré par l'ajout de solution d'acide.

Enfin, on peut noter que la grande variabilité des conditions opératoires utilisées en digestion statique avec pH-stat (Tableau 1.3 et 1.4) pourrait significativement changer la quantité de solution titrante ajoutée, et donc l'appréciation des degrés d'hydrolyse et la comparabilité à *in vivo*. Ces difficultés ont notamment été soulevées pour la lipolyse par Eldemrawy *et al.* (2015); Li *et al.* (2011); McClements and Li (2010b), par exemple au niveau de la concentration en calcium du milieu et de son mode d'ajout, de la concentration en acides biliaires, du pH de consigne et de la concentration en lipase. Ces considérations illustrent l'intérêt d'associer la méthode du pH-stat aux efforts de consensus mis en place dans le cadre d'Info-gest, d'autant plus que l'instrumentation pH-stat peut facilement compléter un dispositif de digestion statique.

5 Effets de structure observés sur la digestion des émulsions

Plusieurs études et revues explorent et mettent en avant les interactions matrice-digestion des émulsions en prenant en compte des éléments de structure ((Bornhorst and Singh, 2014; Golding and Wooster, 2010; Mackie and Macierzanka, 2010; McClements, 2015; McClements *et al.*, 2009; McClements and Li, 2010b; Michalski *et al.*, 2005, 2013, 2006; Norton *et al.*,

2015; Singh *et al.*, 2009). Plusieurs leviers permettant une modulation de la digestion ont été identifiés, et sont ici exposés.

5.1 Taille des gouttelettes d'huile

En raison de l'insolubilité de l'huile et de l'hydrosolubilité des lipases, les lipolyses gastrique et intestinale sont des réactions qui se réalisent à l'interface des gouttelettes d'huile. La réaction s'apparente à un « grignotage » de la gouttelette. Les lipases n'accèdent qu'à l'interface et y libèrent les produits de la réaction qui sont ensuite transférés dans le milieu environnant jusqu'à disparition de la gouttelette (visible grâce à un dispositif micro-fluidique chez Marze *et al.* (2014)). Or, la taille d'une gouttelette dicte la surface développée par l'interface. Par conséquent, pour un volume de substrat lipidique identique, de petites gouttelettes favorisent une réaction plus rapide en offrant plus de sites d'adsorption aux lipases (ratio surface/volume plus important). C'est un phénomène effectivement observé au travers d'études *in vitro* et *in vivo* (Armand *et al.*, 1999; Giang *et al.*, 2015; McClements and Li, 2010b; Michalski *et al.*, 2013).

À titre d'exemple, la Figure 1.24 présente le suivi de l'hydrolyse par titration pH-stat de 3 émulsions de tailles différentes soumises à des digestions intestinales *in vitro* (McClements and Li, 2010b). Plus le diamètre est petit, plus le taux de libération des acides gras est grand, et plus le plateau final est haut. De façon comparable, on retrouve le même type d'effet de la taille des gouttelettes sur la lipolyse *in vitro* chez Pafumi (2002) et Lundin *et al.* (2008).

Ces résultats *in vitro* sont en bon accord avec les données *in vivo*. Par exemple, Armand *et al.* (1999) ont montré chez l'Homme que les lipolyses gastrique et duodénal sont plus grandes avec une émulsion fine (0,7 μm) qu'avec une émulsion grossière (10,1 μm) (Figure 22). Cependant, cette étude montre également que les niveaux d'assimilation des lipides ne diffèrent pas, d'après des mesures des taux de TAG dans le plasma et les chylomicrons, probablement grâce à l'efficacité de la digestion intestinale sur des temps longs. L'étude de (Garaiova *et al.*, 2007) illustre un cas extrême pour lequel des volontaires ont ingéré soit une émulsion soit la même quantité d'huile sous forme non émulsionnée. La réponse observée est un taux de TAG arrivant dans le plasma sanguin bien plus tôt et à un niveau quasiment doublé dans le cas de l'émulsion (Fig. 1.26), indiquant un processus de lipolyse et d'absorption plus efficace. L'amélioration de l'absorption pour une émulsion *versus* des lipides non émulsionnés est aussi montrée *in vivo* chez Vors *et al.* (2013). Malgré une excrétion fécale finale des lipides endogènes similaire (suivie par marqueurs radioactifs (Gabert *et al.*, 2011)), l'étude avance

ainsi la notion de 'lipides rapides' et de 'lipides lents'.

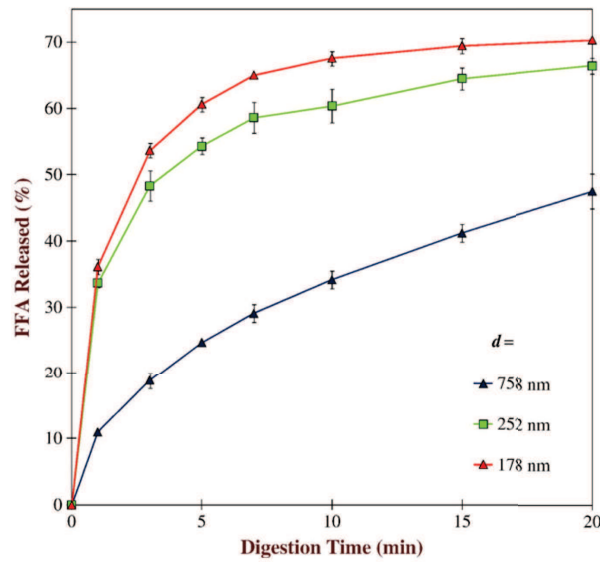


FIGURE 1.24 – Influence de la taille des gouttelettes sur la lipolyse suivie par pH-stat. (McClements and Li, 2010b)

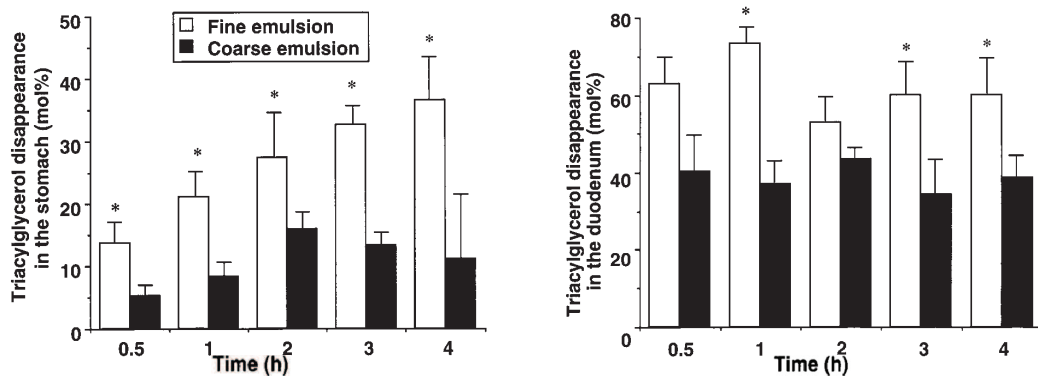


FIGURE 1.25 – Influence *in vivo* de la taille des gouttelettes sur la libération des triglycérides dans les contenus gastriques (à gauche) et duodénaux (à droite). (Armand *et al.*, 1999)

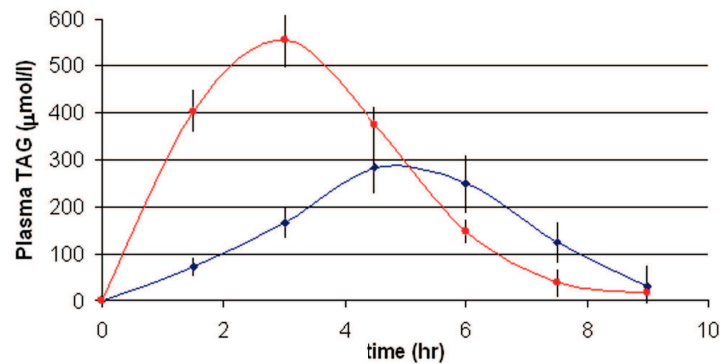


FIGURE 1.26 – Suivi du taux de triglycérides dans le plasma sanguin après ingestion d'huile non structurée (courbe bleue) et sous forme émulsifiée (courbe rouge). (Garaiova *et al.*, 2007)

5.2 Déstabilisation dans la bouche et l'estomac

L'étude précédemment citée d'Armand *et al.* (1999) fait aussi l'observation d'un changement de la taille des gouttelettes à l'étage gastrique, particulièrement marqué pour l'émulsion fine. Ceci souligne que la taille d'une émulsion est un paramètre clé pour étudier la lipolyse mais que cette taille est susceptible d'augmenter au cours de son cheminement dans le tractus, ce qui ajoute un niveau de complexité dans les interprétations, notamment *in vivo*. En effet, comme vu plus haut, l'aliment ingéré subit d'importantes variations en termes d'environnement chimique et de forces mécaniques avant d'arriver à l'intestin, lieu principal de l'hydrolyse des lipides (résumés en partie dans Fig. 1.27).

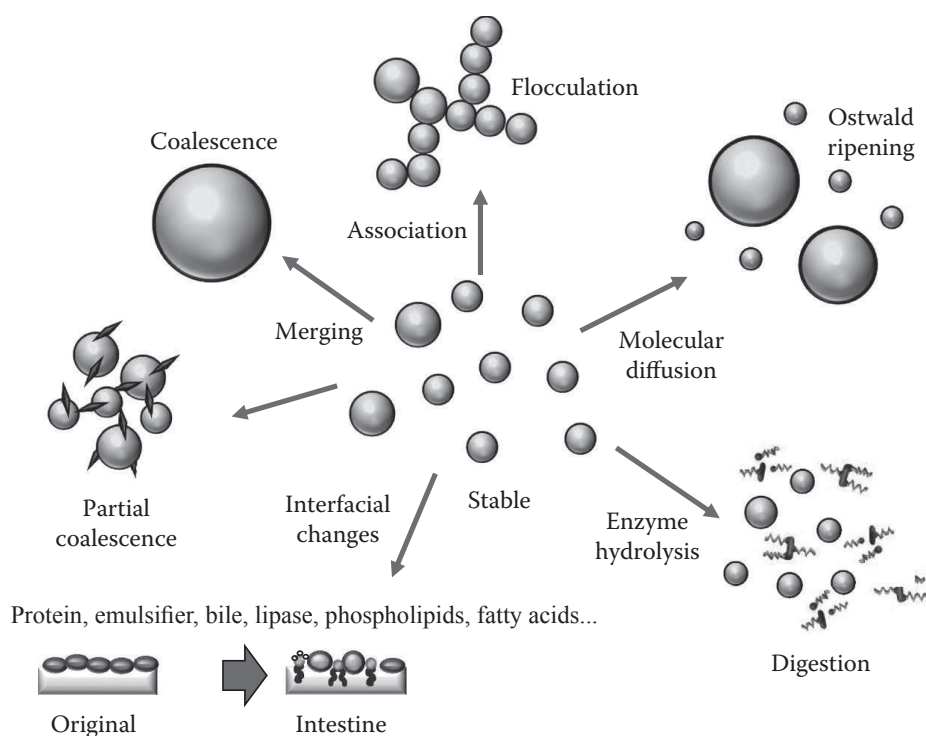


FIGURE 1.27 – Schéma résumant les déstabilisations que peuvent subir une émulsion à l'intérieur du tractus digestif (McClements, 2015). L'émulsion montre un certain degré de stabilité initialement. En fonction des conditions changeantes du milieu elle peut être déstabilisée par flocculation, coalescence, coalescence partielle, ou encore mûrissement d'Ostwald (migration des molécules constituant la goutte de plus petite taille vers la goutte de plus grande taille, à travers la phase continue). L'hydrolyse par les enzymes (protéases et lipases), la présence de bile et d'autres composés endogènes ou exogènes peuvent également changer la composition de l'interface et induire une déstabilisation.

Dans la bouche, l'émulsion est mélangée à la salive, mâchée si elle est solide ou semi-solide puis avalée (McClements and Li, 2010a). En plus d'une activité amylasique et d'eau qui vont modifier la rhéologie de l'aliment, la salive apporte des mucines qui peuvent promouvoir une flocculation par déplétion ou par pontage, menant potentiellement à de la coalescence

en fonction de la résistance des interfaces à la rupture. Si l'aliment avalé est à température ambiante, sa température va rapidement se rapprocher des 37 °C, des gouttelettes d'huile à l'état solide peuvent donc passer à l'état liquide. Le pH et la force ionique peuvent aussi être différents par rapport à la matrice initiale, participant à la déstabilisation. Enfin, la mastication va jouer un rôle prépondérant pour les matrices solides et semi-solides puisqu'elle provoque une rupture de la matrice de départ. L'organisation initiale des lipides dans la matrice sera modifiée par sa réduction en fragments et permet une libération partielle des gouttelettes dans la bouche qui sera fonction du temps de mastication, de la géométrie de la mâchoire et des caractéristiques rhéologiques de l'émulsion.

En arrivant à l'estomac, l'émulsion est soumise à un changement soudain d'environnement. Le changement de pH et les ions présents peuvent écranter les charges répulsives de l'interface responsable d'une certaine stabilité de l'émulsion auparavant, notamment avec les émulsifiant protéiques (Golding *et al.*, 2011). Le phénomène de floculation peut apparaître. La présence de mucines provenant des parois stomacales peut aussi provoquer une floculation. On peut observer de la coalescence formant des gouttelettes plus grosses, mais aussi de la coalescence partielle si la phase huileuse est en partie solide, ou une séparation de phase complète (Fig. 1.28). Dans ce cas limite, une couche d'huile peut potentiellement rester en suspension dans le compartiment gastrique et la lipolyse intestinale ne débutera que lorsque la phase aqueuse aura été vidangée dans le duodénum (Golding and Wooster, 2010), d'où un effet de retard. L'effet d'une déstabilisation dans l'estomac a été volontairement provoqué *in vivo* chez Marciani *et al.* (2008). Une émulsion stable est plus satiétogène qu'une émulsion instable. Au final, l'émulsion passant dans l'estomac a donc divers destins possibles en fonction de ses caractéristiques. La survenue de ces modifications structurales peut ainsi dicter la surface développée par les émulsions mais aussi la composition de leur interface à leur entrée dans le duodénum.

5.3 Influence des émulsifiants

La composition initiale de l'interface de l'émulsion peut être contrôlée par le choix de l'émulsifiant. Elle peut influencer les niveaux de lipolyse *in vitro* et *in vivo* (Couédelo *et al.*, 2015). Dans l'exemple présenté dans la Figure 1.29, Day *et al.* (2014) ont montré que la nature de l'émulsifiant (1 % de caséinate de sodium adjoint ou non de 0.25 % d'un tensio-actif) peut changer drastiquement la stabilité des émulsions lors de digestions gastriques *in vitro*, malgré des tailles de gouttelettes quasi identiques au départ, ($D_{4,3} = 0.39$ à 0.55 μm). Ces résultats s'expliquent par une meilleure stabilité aux conditions gastriques des émulsions

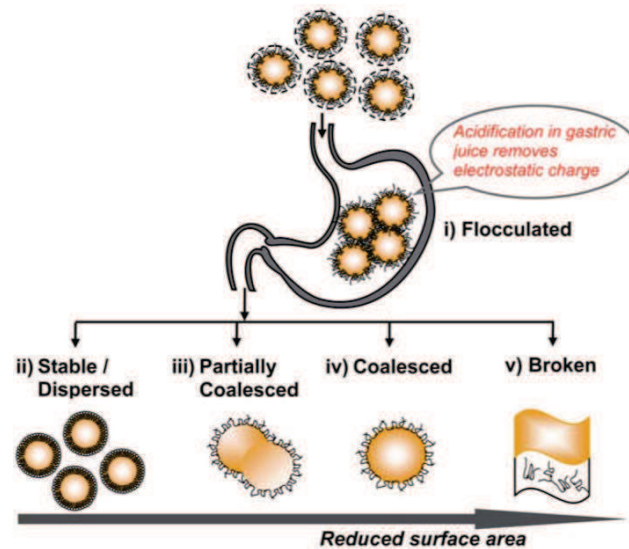


FIGURE 1.28 – Déstabilisations possibles d’une émulsion dans l’estomac (Golding *et al.*, 2011).

uniquement stabilisées par du caséinate de sodium. Ces mêmes auteurs ont également étudié les conséquences de ces restructurations gastriques (2 h, *in vitro*) sur les cinétiques de lipolyse intestinale (3 h, *in vitro*) d’émulsions préparées à différents taux de tensioactifs, en plus du caséinate, par des mesures de pH-stat. La Figure 1.30, qui illustre leurs résultats, montre que la lipolyse intestinale est fortement impactée par la composition de l’interface, et les modifications structurales qu’elle peut induire. Un effet de l’émulsifiant sur la métabolisation d’une émulsion est de même observée *in vivo* chez Keogh *et al.* (2011), dont l’interprétation est la différence de sensibilité à la coalescence dans l’estomac.

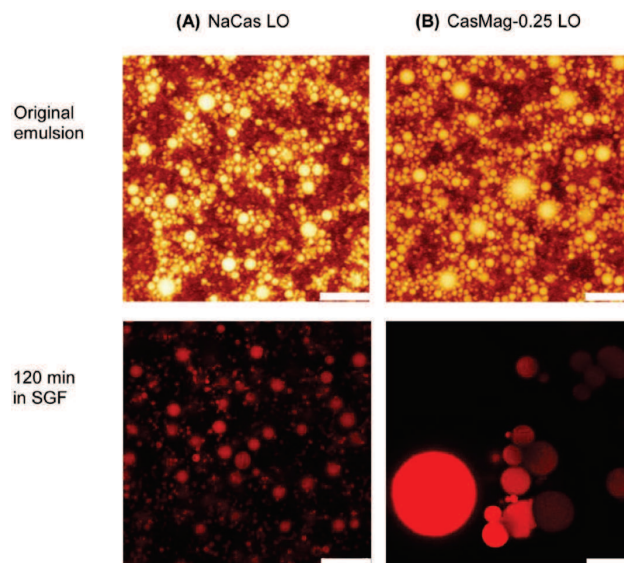


FIGURE 1.29 – Images par microscopie confocale de l’évolution de deux émulsions depuis leur état initial jusqu’à 2 h de phase gastrique simulée où seule la composition de l’interface a changé (Day *et al.*, 2014). Echelles de 10 μm .

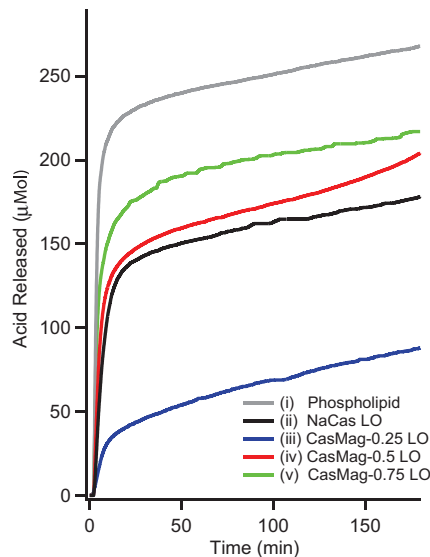


FIGURE 1.30 – Titration pH-stat d'émulsions de compositions interfaciales différentes durant 3 h de digestion intestinale simulée, suivant 2 h de digestion gastrique simulée (Day *et al.*, 2014).

La composition de l'interface peut également modifier la stabilité des émulsions dans l'intestin. Par exemple, Nik *et al.* (2011) ont comparé la digestion gastro-intestinale *in vitro* d'émulsions stabilisées par des protéines de soja et par des protéines de lactosérum. L'émulsion au lactosérum a montré une bonne stabilité durant la phase gastrique mais l'émulsion au soja a montré un certain degré de floculation. Celle-ci était cependant réversible et les deux émulsions étaient donc comparables en quantité de surface développée au début de la phase intestinale si la bile et la lipase pancréatique étaient omises. Néanmoins, en présence de celles-ci, les émulsions au soja sont restées stables plus longtemps en phase intestinale, ce qui s'explique par une résistance plus grande des protéines à leur désorption de l'interface par les sels biliaires comparativement aux protéines de lactosérum. Le résultat était un degré de lipolyse plus grand pour les émulsions au soja. Sur la base d'expériences comparables, il a d'ailleurs été démontré par modélisation que la réduction de l'aire interfaciale développée lors de la coalescence intestinale d'une émulsion gouvernait très largement la cinétique de lipolyse observée (Giang *et al.*, 2015).

Enfin, la capacité de la lipase pancréatique à accéder à l'interface peut aussi moduler son activité. L'étude de Mun *et al.* (2007) montre en effet que les protéines laitières (caséinates et protéines de lactosérum) laissent plus facilement la place à la lipase pancréatique que des petites molécules surfactantes (lécithine et Tween 20), promouvant ainsi la lipolyse. Les tensioactifs, de petit poids moléculaire, sont effectivement plus actifs à l'interface que la lipase et sont donc susceptibles de s'y placer plus rapidement et de s'y maintenir plus longtemps. La bile, elle-même capable de mieux s'ancrer sur une interface protéique, et la présence possible

de protéases dans l'extrait de lipase pancréatique utilisé dans cette étude permet aussi de favoriser la lipolyse dans ce cas. S'il est possible de moduler la lipolyse de l'émulsion par le contrôle de l'interface il ne faut pas pour autant oublier que la nature de celle-ci peut changer au cours de la digestion (McClements and Li, 2010b). En effet, un phénomène d'adsorption compétitive a lieu à l'interface entre les sels biliaires, les phospholipides, les produits de la lipolyse, ou encore d'autres composés endogènes ou apportés par la matrice alimentaire, pouvant ainsi modifier dans le temps la composition de l'interface initiale et influencer in fine sur la libération des acides gras.

5.4 État de la phase dispersée

La modulation de la lipolyse par le contrôle de l'état physique de l'huile émulsionnée a également été explorée dans plusieurs études (McClements *et al.*, 2008; McClements and Li, 2010b; Michalski *et al.*, 2013). Comme illustré en Figure 1.31, le résultat principal est que la vitesse et le niveau final de la réaction sont diminués, dans le cas d'une huile solide (cristalline), par une surface réduite, par un ancrage plus difficile des enzymes et par une solubilisation moins facile des produits de la réaction (Bonnaire *et al.*, 2008).

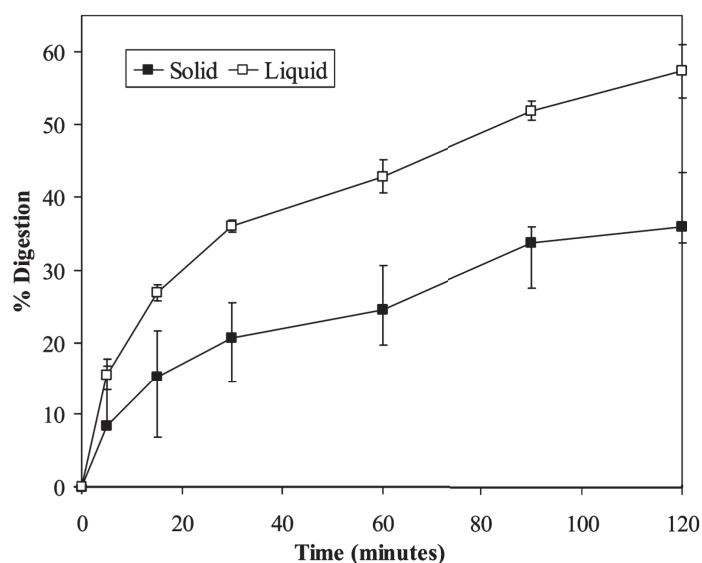


FIGURE 1.31 – Évolution du pourcentage de lipolyse dans des émulsions digérées par une phase intestinale simulée. Les émulsions varient sur l'état, solide ou liquide, de l'huile dispersée (Bonnaire *et al.*, 2008).

5.5 État de la phase continue

L'état physique et la viscosité de la phase continue peuvent avoir un effet sur la lipolyse comme sur la protéolyse (Barbé *et al.*, 2013; Kong and Singh, 2008; Michalski *et al.*, 2013;

(Norton *et al.*, 2015). De façon générale, un aliment liquide est mélangé plus rapidement avec les sécrétions gastrique après qu'il ait été avalé et la vidange gastrique démarre immédiatement (Kong and Singh (2008) et Fig. 1.15). Au contraire, les aliments solides sont caractérisés par un délai dans la vidange gastrique avec une migration progressive du bol alimentaire de l'estomac proximal à l'estomac distal. Une plus grande consistance implique plus de travail mécanique de l'estomac et du pylore pour diminuer la taille des morceaux et permettre aux morceaux d'aliment d'être vidangés dans le duodénum. En effet, un aliment solide subit une fracturation en particules plus fines au cours de la phase gastrique et le pylore agit comme un tamis faisant refluer les plus grosses. Ceci peut participer à une cinétique de digestion différenciée puisque les nutriments ne sont pas délivrés à la même vitesse à l'intestin. Par exemple, ce mécanisme constitue l'hypothèse explicative principale avancée par Barbé *et al.* (2013) pour expliquer les taux de leucine plus faible mesurés dans le plasma sanguin de mini-porcs après ingestion de gels laitiers emprésurés, comparativement aux laits non emprésurés (Fig. 1.32).

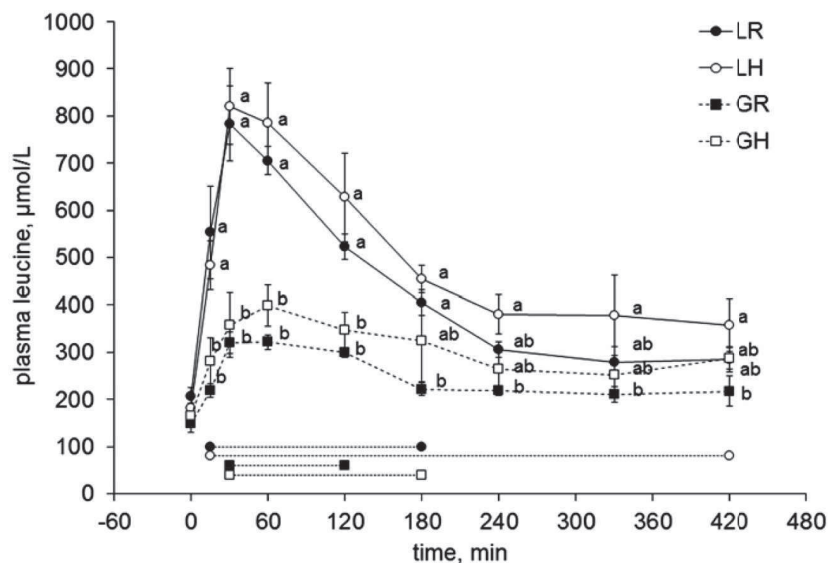


FIGURE 1.32 – Apparition de leucine dans le plasma sanguin et évolution de son taux en fonction du temps chez des mini-porcs ayant ingéré des matrices lactières (Barbé *et al.*, 2013). LR et LH correspondent à des solutions de poudre de lait dégraissé chauffés ou non (90 °C 10 min), GR et GH correspondent aux gels par présure préparés à partir de ces mêmes solutions.

Une forte viscosité ou une phase continue solide rendent aussi plus lent l'accès des enzymes à leur substrat par diffusion. Sarkar *et al.* (2015) ont procédé à des essais de digestion *in vitro* d'une émulsion (10 % d'huile, 0,7 % de protéines de lactosérum) incluse dans des gels de gélatine bovine de concentration et de modules visco-élastiques (G' et G'') croissants. La lipolyse intestinale de ces gels, mesurée par pH-stat, était d'autant plus ralentie que

la concentration en gélatine était élevée (Fig. 1.33). Ce résultat a été directement relié à la densité croissante du maillage du réseau protéique, qui ralentit la diffusion de la lipase. Lorsque des protéases étaient ajoutées dans les solutions digestives, la lipolyse s'en trouvait considérablement accélérée, par un mécanisme d'érosion du gel protéique qui venait améliorer l'accès des lipases à leur substrat. Cette étude montre ainsi qu'au-delà de la macrostructure (gel), la microstructure (mailles du gel) est aussi une échelle d'action pertinente pour moduler la digestion des lipides.

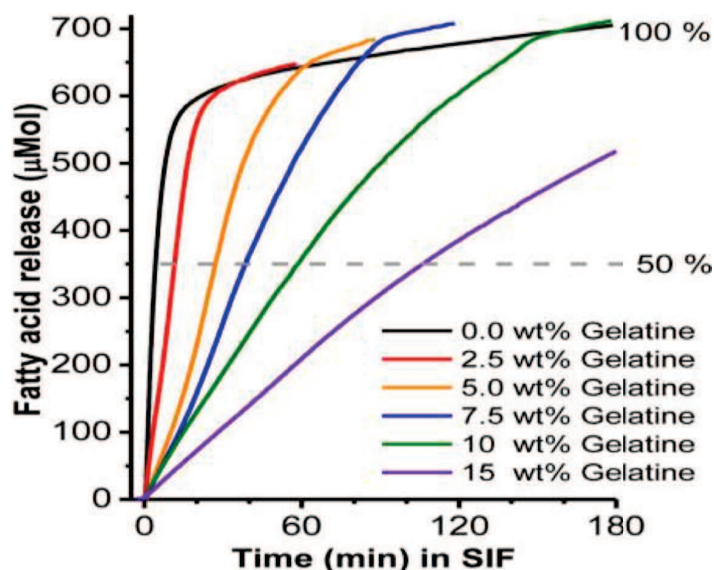


FIGURE 1.33 – Lipolyse intestinale, suivie par pH-stat d'une émulsion de 10 % d'huile de tournesol et 0,7 % de protéines de lactosérum (Sarkar *et al.*, 2015). L'émulsion est gélifiée grâce la présence de gélatine dans la phase continue. La concentration en gélatine est croissante, de 0 à 15 %.

5.6 Interaction lipides-protéines : le cas des émulsions avec des protéines de lactosérum

L'effet sur la lipolyse du gel d'émulsions par des protéines de lactosérum est encore peu exploré. Ces gels peuvent varier énormément au niveau de leur microstructure en fonction des conditions de pH (elles jouent sur l'éloignement au point isoélectrique) et ceci peut avoir une incidence directe sur la qualité de la protéolyse gastro-intestinale (Macierzanka *et al.*, 2012). (Singh *et al.*, 2014b) a d'ailleurs montré que les protéines sériques pouvaient être plus rapidement hydrolysées en phase gastrique si elles étaient dénaturées et gélifiées par la chaleur, que natives en solution. Cet effet est aussi confirmé chez (Ye *et al.*, 2016).

Dans leur configuration native, l' α -lactalbumine est facilement hydrolysée par la pepsine en phase gastrique, tandis que la β -lactoglobuline y est résistante (Guo *et al.*, 1995; Nik *et al.*, 2010; Reddy *et al.*, 1988). Quand elles sont utilisées comme émulsifiants, l'adsorption

de ces protéines à l'interface modifie cependant leur conformation, ce qui les rend plus faciles à dégrader par hydrolyse d'après diverses études *in vitro* (Li *et al.*, 2013; Macierzanka *et al.*, 2009; Mackie and Macierzanka, 2010; Nik *et al.*, 2010). Ceci s'expliquerait par l'exposition de domaines de leur structure secondaire à la pepsine suite à leur réarrangement à l'interface. D'après Sarkar *et al.* (2009), qui a étudié la digestion gastrique d'une émulsion stabilisée par de la β -lactoglobuline, et réalisé des électrophorèses (SDS-PAGE), des fragments de poids moléculaire relativement important restent présents à l'interface durant les 30 premières minutes de digestion. Cela souligne que seule une partie des protéines de l'interface ont subi un changement de conformation suffisant à l'interface pour faciliter son hydrolyse. Au bout de 2 h cependant, 85 % des protéines à l'interface ont été hydrolysées tandis que l'émulsion montre un certain degré de coalescence. D'autres auteurs trouvent que les émulsions de protéines de lactosérums sont relativement stables en phase gastrique comme montré Figure 1.34 (Golding *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Nik *et al.*, 2010; Sarkar *et al.*, 2009). D'après Li *et al.* (2013), la grande stabilité de ces émulsions en phase gastrique peut s'expliquer par une hydrolyse limitée des protéines à l'interface. Cela pourrait dépendre du substrat utilisé dans l'expérience : de la β -lactoglobuline pure chez Sarkar *et al.* (2009), et un mélange de protéines sériques chez les autres. Par ailleurs, d'après Nik *et al.* (2010), il est également possible qu'à des concentrations plus importantes de protéines, les protéines en excès en solution puissent venir remplacer à l'interface une partie des protéines hydrolysées, préservant plus durablement son intégrité et donc la stabilité des émulsions.

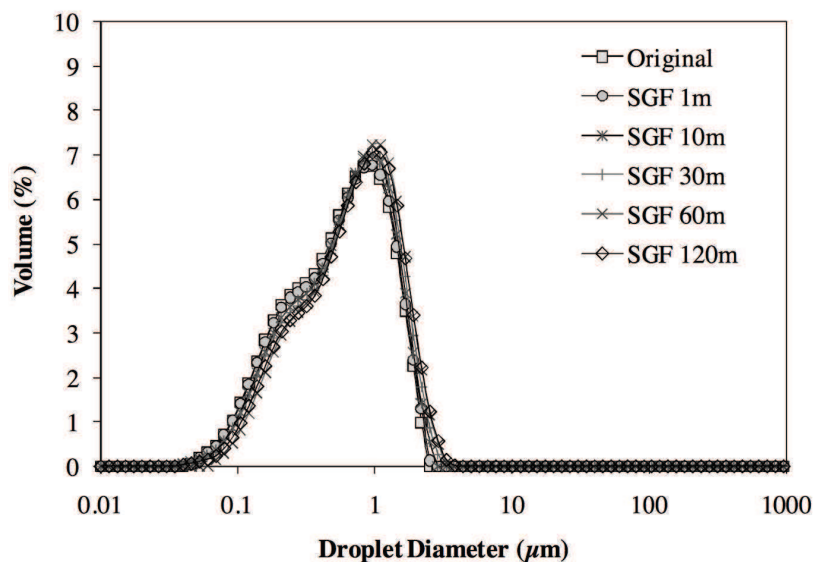


FIGURE 1.34 – Suivi granulométrique d'une émulsion de 20 % huile de soja et 1 % protéines de lactosérum au cours de 2 h de digestion gastrique *in vitro* (Li *et al.*, 2013).

Si ces émulsions peuvent subir un certain degré de floculation durant la phase gastrique,

elle n'est pas irréversible et se disperse généralement une fois la phase intestinale démarrée par annulation des effets de charges (Golding *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Nik *et al.*, 2010; Sarkar *et al.*, 2009). L'influence de la phase gastrique est donc limitée et ne semble pas influencer la vitesse d'hydrolyse dans la phase intestinale qui suit (Li *et al.*, 2013), qui est comparable à d'autres émulsions stables en phase gastrique par ailleurs (Golding *et al.*, 2011). Peu d'études portent sur l'évolution de la taille des gouttelettes au cours de la lipolyse intestinale, mais les émulsions stabilisées par les protéines sériques semblent avoir tendance à coalescer dans les conditions intestinales (Golding *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Mun *et al.*, 2007; Sarkar *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009). Pour reprendre l'exemple de Li *et al.* (2013), l'augmentation considérable de la taille des gouttelettes au cours de la phase intestinale a été attribuée à la coalescence des gouttelettes, observée en microscopie confocale (Fig. 1.35). Ceci peut s'expliquer par l'activité des protéases intestinales et/ou par l'arrivée des sels biliaires qui peuvent avoir une action détergente sur ces protéines.

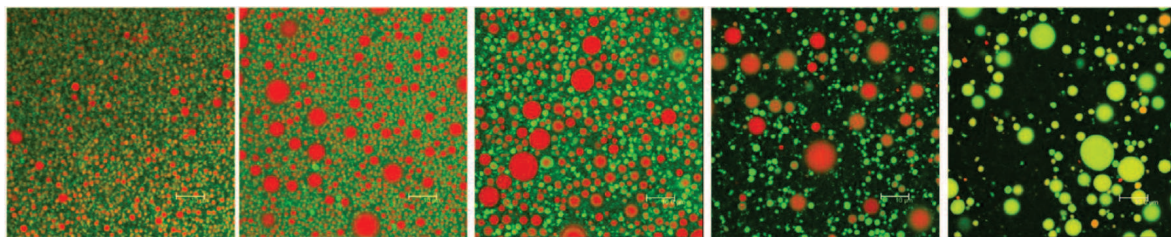


FIGURE 1.35 – Visualisation par microscopie confocale de l'évolution de la taille des gouttelettes d'une émulsion stabilisée par des protéines sériques durant la phase intestinale (1, 10, 30, 60 et 120 min, respectivement) après 2 h de phase gastrique (Li *et al.*, 2013).

Malgré l'importance de la quantité d'interface sur les cinétiques de lipolyse, il semble que la littérature porte peu attention à l'effet de la coalescence et de la floculation en phase intestinale. Cet aspect mériterait des investigations pour mieux comprendre les mécanismes de cette déstabilisation, dont il faut probablement chercher les causes dans la composition changeante de l'interface au cours de la digestion, notamment pour des émulsions stabilisées par des protéines puisqu'elles sont soumises à une double hydrolyse.

Il n'existe à ce jour que relativement peu d'études portant sur les questions d'interaction entre la protéolyse et la lipolyse, a fortiori avec des protéines sériques comme émulsifiants ou dans la phase continue. Il semble pourtant important d'aller vers l'étude de matrices alimentaires plus complexes, contenant plusieurs nutriments, comme c'est le cas dans l'écasante majorité des aliments consommés. On peut en effet s'attendre à des effets synergiques de digestion des différents macronutriments, en particulier entre les protéines et les lipides. L'un des principaux freins à ce type d'étude est le travail et la complexité associés au suivi et à l'analyse de différents types de nutriments au cours de l'enchaînement des phases gastriques

et intestinales. La plupart des études actuelles se concentrent en effet sur un nutriment à la fois, et les récentes études sur des émulsions stabilisées par des protéines utilisent rarement des proportions importantes de ce nutriment, proches de celles d'un aliment réel. On pourrait par exemple se demander si une partie des protéines en solutions interagissent avec l'interface par une adsorption qui viendrait maintenir sa structure, ou peut-être provoquer une floculation par déplétion ou par pontage. Autant de transformations qui pourraient moduler à la fois la lipolyse et la protéolyse.

Le point de départ de cette revue bibliographique a été l'aliment. Alors qu'il peut être décrit en tant que source de nutriments qui le composent, on a souligné l'importance de le caractériser plutôt comme un arrangement structuré de ses composants, ou matrice. Le projet expérimental de ce doctorat ayant porté sur les lipides et les protéines, un focus a été fait sur ces nutriments d'importance primordiale pour l'organisme et très représentés dans l'alimentation courante par les émulsions huile dans eau. La matrice alimentaire étudiée dans cette thèse a ensuite été abordée. Il s'agissait d'abord de définir les émulsions huile dans eau : ses paramètres structuraux, sa fabrication, sa stabilité, avec un accent sur les protéines de lactosérum comme émulsifiants et comme gélifiants. L'appareil digestif interagit avec la structure de la matrice alimentaire à ses différents étages, par des processus biochimiques et mécaniques. On a ensuite montré l'intérêt de simuler la digestion pour l'étude de la digestion des aliments, en partant de méthodes complexes pour arriver à de plus simples, dont le pH-stat qui présente un potentiel expérimental intéressant pour suivre les hydrolyses des nutriments en conditions digestives. Puis on a passé en revue des études qui ont réalisé la digestion, in vitro mais aussi in vivo, de systèmes alimentaires comparables, en délimitant plusieurs paramètres structuraux qui permettent de moduler la mise à disposition des nutriments.

Objectifs et Stratégie

L'analyse de la littérature a permis de mettre en avant l'intérêt des systèmes *in vitro* de digestion pour étudier et mieux comprendre l'influence de la structure des aliments sur les cinétiques d'hydrolyse des nutriments. Les effets « structure » observés se déclinent à l'échelle moléculaire, microscopique et macroscopique. Toutefois, les études ne se focalisent généralement que sur un seul type de nutriments à la fois. Par exemple, s'il existe de nombreux travaux sur les émulsions, ces derniers ne s'intéressent en général qu'à des systèmes à faible teneur en protéines et ciblant principalement la digestion des lipides. Un manque de travaux sur des aliments complexes ressort clairement de ce premier chapitre de thèse. Une des raisons peut être le besoin de méthodes robustes et efficaces pour permettre l'étude des cinétiques de digestion de telles matrices. Par ailleurs, il reste assez difficile de hiérarchiser les effets « structure » sur les cinétiques d'hydrolyse des nutriments, car la diversité des méthodes et des aliments-modèles étudiés rend difficile cette hiérarchisation. Il n'existe pas, à notre connaissance, d'études sur un aliment complexe visant à comprendre des effets « structure » aux différentes échelles, sur les cinétiques d'hydrolyse de plusieurs nutriments composant l'aliment. Enfin, nous avons noté à partir de l'analyse de la littérature qu'assez peu de travaux proposent de valider des effets « structure » observés en conditions *in vitro*, sur des approches *in vivo*. Ces dernières, plus complexes à mettre en œuvre, combinent en général à la fois des effets de composition et de structure.

Objectifs

Sur la base de l'analyse de la littérature, la question de recherche à laquelle se propose de répondre ce travail peut être formulée ainsi : **Dans le cas d'un aliment complexe, quels sont les paramètres structuraux intervenant aux différentes échelles qui impactent les cinétiques d'hydrolyse des macronutriments au cours de la digestion *in vitro* ?**

Ce travail avait également pour finalité de répondre à une deuxième question, partagée plus largement avec l'ensemble des partenaires du projet ALIAS : **Les effets « structure » observés sur les cinétiques de digestion *in vitro* sont-ils observables en conditions *in vivo* ?**

L'hypothèse que nous souhaitions démontrer est la suivante : l'arrivée séquentielle de l'aliment partiellement digéré et de certains nutriments dans les différentes régions du tube digestif induisent des mécanismes de régulation qui influencent le fonctionnement et la physiologie du tube digestif et modifient la composition et l'activité du microbiote.

Stratégie

Afin de répondre à ces questions de recherche, la première étape a été de définir l'aliment complexe support de notre étude. Les systèmes émulsionnés présentent des structures très largement répandues dans de nombreux aliments. Une base de connaissances solides existent dans la littérature aussi bien pour la conception de ce type de matrices, que pour leur digestion en condition *in vitro*. De plus, ce type de matrices peut être un très bon vecteur de macronutriments dans le cas d'étude *in vivo*. Sur la base de ces connaissances et de discussions avec les partenaires du projet ALIAS, des émulsions contenant 15 % de protéines et 10 % d'huile ont été sélectionnées. Dans un premier temps, deux émulsions très différentes en termes de structures ont été développées et caractérisées.

La deuxième étape du travail a consisté à adapter une méthode de digestion *in vitro* permettant un suivi des hydrolyses à la fois des lipides et des protéines et de découpler les deux réactions. Parmi les méthodes proposées dans la littérature, un protocole de titration de type pH-stat en conditions digestives a été sélectionné et adapté.

En utilisant cette méthodologie, l'influence de deux premiers niveaux d'échelles sur la digestion ont pu être étudiés : l'état solide ou liquide des émulsions d'une part, et la taille des morceaux d'autre part.

Un focus sur la protéolyse en phase gastrique nous a ensuite conduit à un développement original de suivi par pH-stat de l'hydrolyse des protéines par la pepsine en condition acide. Ce dernier a alors pu être utilisé pour étudier la protéolyse et la lipolyse de matrices de structures parfaitement maîtrisées afin de comprendre plus finement les paramètres de structure impactant les cinétiques et les niveaux d'hydrolyses.

Ainsi la stratégie expérimentale de ce travail s'est appuyée sur quatre axes principaux :

- Un aspect méthodologique avec la mise au point de la méthode de digestion permettant un suivi en temps réel de l'hydrolyse des 2 nutriments, les lipides et les protéines.
- Un aspect ingénierie avec la conception à l'échelle laboratoire, mais aussi pilote, d'émulsions offrant des structures variées et parfaitement contrôlées.
- Un aspect phénoménologique en identifiant les mécanismes à l'origine de la modulation de la digestion par le contrôle de la structure de la matrice alimentaire.
- Enfin, un aspect physiologique, qui visait à observer en conditions *in vivo* les effets « structure » mis en évidence lors de l'étude de la digestion *in vitro*.

Chapitre 2

Digestions *in vitro* avec suivi pH-stat : effets de la structure de la matrice alimentaire sur l'hydrolyse intestinale des protéines et des lipides

Sommaire

Présentation de l'article	68
Abstract	69
1 Introduction	71
2 Materials and method	73
2.1 Materials	73
2.2 Preparation of food matrices	73
2.3 Characterization of matrices	74
2.4 <i>In vitro</i> digestion protocol	75
2.5 pH-stat monitoring for the intestinal proteolysis and lipolysis	76
2.6 Degree of proteolysis	77
2.7 Degree of lipolysis	78
3 Results and discussion	79
3.1 Characterization of the designed emulsions	79
3.2 Digestion of the liquid and solid emulsions	79
3.3 Digestion of the proteinic continuous phase matrices (SCP and LCP)	81
3.4 Estimation of the lipolytic kinetics	82
4 Conclusion	84
Acknowledgments	84
À retenir	86

Présentation de l'article

La digestion d'émulsions alimentaires peut être étudiée grâce à des méthodes *in vitro* plus ou moins élaborées. L'emploi de la méthode du pH-stat lors de digestions *in vitro* statiques a jusque-là été fait soit pour suivre la digestion intestinale des lipides, soit pour suivre la digestion intestinale des protéines, mais jamais les deux en même temps. La plupart des études en lien avec des effets de structure de l'aliment ne s'intéresse en effet qu'à un seul type de macronutriment à la fois, sans nécessairement chercher à se rapprocher des aliments réels, constitués de plusieurs macronutriments dans leur grande majorité.

Dans ce chapitre sont présentés les résultats de la mise au point (i) de deux émulsions de même composition mais de structure différente dans l'objectif qu'elles présentent des cinétiques de digestion différenciées tant du point de vue des protéines que des lipides, et (ii) d'une approche visant à associer la méthode du pH-stat durant la phase intestinale du protocole standard de digestion statique *in vitro*, issu de l'action COST Infogest. L'idée directrice de ce travail est d'évaluer la pertinence de ce type de stratégie expérimentale pour suivre de façon simple, rapide, et dynamique l'hydrolyse pancréatique de deux nutriments d'intérêt : les protéines et les lipides.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article paru dans le journal *Food Research International*, ([Volume 88, Part B](#), Octobre 2016, Pages 226–233).

***In vitro* digestion of foods using pH-stat and the INFOGEST protocol: Impact of matrix structure on digestion kinetics of macronutrients, proteins and lipids**

Damien J.L. Mat^{a,b}, Steven Le Feunteun^{a,*}, Camille Michon^b, Isabelle Souchon^a

^a UMR GMPA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78850, Thiverval-Grignon, France

^b UMR GENIAL, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 91300, Massy, France

* Corresponding author : steven.le-feunteun@inra.fr

Abstract

It is currently admitted that food structure can facilitate or delay the release of nutrients during digestion and their absorption by the human body. The aim of this study is to propose an *in vitro* method able to assess the behavior of lipo-proteinic matrices with different structures during digestion. Two model matrices of exactly the same compositions (10 % oil, 15 % whey proteins, w/w) were designed: i) A liquid emulsion (LE) made of small fat droplets (1 μm) dispersed in a liquid continuous phase containing native whey proteins, ii) a solid emulsion (SE) made of a continuous whey protein gel entrapping large oil droplets (20 μm). The two matrices were digested through an *in vitro* gastro-intestinal protocol based on the INFOGEST guidelines using pH-stat to monitor the enzymatic hydrolyses of both proteins and lipids. By further digesting lipid-free matrices in the same conditions, the contributions of the proteolytic and lipolytic reactions were evaluated. Significant differences were observed between matrices at both short and long digestion times. The initial rates of both proteolysis and lipolysis were slower for SE than LE because of the gel state of the continuous phase. At the end of the experiments, SE led to a smaller extent of lipolysis ($\text{DH}_{\text{lip_SE}} = 51 \% < \text{DH}_{\text{lip_LE}} = 81 \%$) but a greater extent of proteolysis ($\text{DH}_{\text{prot_SE}} = 80 \% > \text{DH}_{\text{prot_LE}} = 52\%$) because of the higher sensitivity to digestion of denatured whey proteins. These results highlight the impact of matrix structure on enzyme accessibility, and show that the proposed method is suitable to monitor the digestion of complex food matrices.

Highlights

- Proteinic emulsions of identical composition but different structures were designed.
- The INFOGEST *in vitro* digestion protocol was adapted to allow pH-stat measurements.
- The intestinal hydrolysis kinetics of both proteins and lipids were monitored.
- Matrix structure strongly influenced both the protein and lipid digestion kinetics.
- The final extents of lipid and protein digestion (DH) were also different.

Keywords

Food structure; Gastro-intestinal digestion; Pancreatin; Lipolysis; Proteolysis; Emulsion gel

Abbreviations

WPI, whey protein isolate; **WP**, whey proteins; **FFA**, free fatty acids; **SSF**, simulated salivary fluid; **eSSF**, electrolyte mix in the SSF; **SGF**, simulated gastric fluid; **eSGF**, electrolyte mix in the SGF; **SIF**, simulated intestinal fluid; **eSIF**, electrolyte mix in the SIF; **LE**, liquid proteinic emulsion-type matrix; **LCP**, liquid proteinic continuous phase matrix; **SE**, solid proteinic emulsion-type matrix; **SCP**, solid proteinic continuous phase matrix; **DH**, degree of hydrolysis

1 Introduction

It is now well-established that food structure can facilitate or limit the release and subsequent metabolization of nutrients. Understanding how food structure can modulate digestion kinetics and/or macronutrient digestibility has therefore become a main issue, which may lead to more-effective ways of maintaining a healthy diet. Knowledge on the food structure-physiology interactions may indeed be useful when considering the effects of particular diets and consumption habits, but also to design foods targeted for specific health functionalities (Norton *et al.*, 2014).

Food in the human digestive tract is subject to chemical-physics transformations while passing through the different compartments. In the stomach, gastric secretions contain hydrochloric acid decreasing the pH to the 1–5 range (Guerra *et al.*, 2012), as well as gastric lipase and pepsin which initiate the lipolytic and proteolytic reactions, respectively. In the case of solid food, the fragments are progressively grinded until their size is reduced enough to pass into the proximal part of the small intestine, the duodenum. In the small intestine, pH progressively rises to about 7, while the enzymes secreted in the pancreatic juice continue the hydrolysis of macronutrients. Pancreatic lipase, in association with its co-lipase, bile acids and other lipases perform lipolysis (Singh *et al.*, 2009), while proteases, such as trypsin and chymotrypsin, perform proteolysis (Mackie and Macierzanka, 2010; Turgeon and Rioux, 2011). The hydrolysis of lipids and of proteins is considered almost complete at the end of the small intestine.

In vitro gastrointestinal digestion experiments have proved to be a powerful means to gain knowledge on the nutritional value of foods as they allow condition controlling and easy sampling (Guerra *et al.*, 2012). Although the capacity of *in vitro* approaches to mimic the physiological reality is never perfect, they avoid difficulties inherent to *in vivo* studies such as costs, ethical considerations, technical complexity and variability. *In vitro* systems are various, leading to a diversity of protocols and physiological relevance levels. Dynamic models consist of different compartments through which the studied food passes while the digestive juices are dynamically added. In some cases, mechanical devices are also incorporated in order to mimic the breakdown of foods. Even though these dynamic models are based on *in vivo* digestion, their use is complex, mostly suitable for liquid foods, and involves complicated engineering and high costs. On the other hand, cost effectiveness and good adaptability to the needs of the studied foods are the main advantages of static *in vitro* systems. Their *in vivo* digestion equivalence is nevertheless a drawback. Moreover, as they can be easily set up in most laboratories, a great number of protocols have been proposed. This has raised

the need for harmonization of the key parameters (transit times, pH, enzymes used and their activities), a work that has been undertaken during the INFOGEST cost action and which has recently led to the publication of an international consensus (Minekus *et al.*, 2014).

In association with static systems, the pH-stat titration method is a classical approach to monitor the intestinal phase of *in vitro* digestions. It consists in maintaining constant the pH of a food in contact with a digestive fluid mixture, whereas the enzyme-substrate reaction would normally modify it. Therefore, the quantity of titrant added during the experiment *versus* time is directly related to the production of hydrolyzed species. The method is easy to set up and directly provides the dynamics of the reaction. pH-stat is most often used to measure the progress of the lipolytic reaction (Day *et al.*, 2014; Li and McClements, 2014), but can also be used to monitor the digestion of protein solutions or gels. To our knowledge, the simultaneous study of lipolysis and proteolysis with pH-stat has not been proposed yet.

Indeed, lipids and proteins are generally associated in real foods. Lipids are most often consumed in the form of oil in water emulsions (milk, sauces...). In such systems, proteins can be found in the aqueous continuous phase but also at the interface. The structural elements of an emulsion-type food matrix can affect its digestion behavior. For instance, the size of the oil droplets is a major parameter governing the kinetics of lipolysis (Armand *et al.*, 1999; Giang *et al.*, 2015). Lipolysis is an interfacial reaction. Therefore, the rate of the reaction increases with the droplet surface area, *i.e.* smaller droplet sizes. Formulation and process conditions govern the droplet sizes in the emulsion, but transformations during digestion can also promote destabilization leading to a decrease in oil/water interface area (Day *et al.*, 2014; Golding *et al.*, 2011). By controlling the emulsion stability against flocculation and coalescence, the nature of the interfacial layer is therefore also of importance for lipid digestion. Whey proteins can be used to achieve good stability of emulsions in gastric conditions (Golding *et al.*, 2011; Mantovani *et al.*, 2013). These proteins are reported to facilitate lipolysis compared to small surfactants, since they are subject to conformational changes through adsorption which can promote colipase anchorage and displacement action of bile salts (Mun *et al.*, 2007; Nik *et al.*, 2010). Secondly, the physical state at a macroscopic scale of the continuous phase is an important parameter as liquid foods are prone to transiting through the stomach and intestine more rapidly than solid ones (Norton *et al.*, 2014). Moreover, at a microscopic scale, whey proteins allow variations in the microstructure of the continuous phase. Their globular structure is sensible to heat and pH leading to various aggregated gel structures depending on gelation parameters. The sensitivity of whey proteins to hydrolysis is modulated by process conditions and is modified compared to native proteins (Macierzanka

et al., 2012; Singh *et al.*, 2014b).

The aim of this study was to develop a simple and robust method to assess the effects of the structures of complex food matrices on digestion. The association of a static *in vitro* digestion based on the INFOGEST protocol (Minekus *et al.*, 2014) and a pH-stat method is proposed. The approach was used to investigate the digestion behaviors of two emulsion-type food matrices of identical compositions (10 wt% oil, 15 wt% whey proteins) but with different structures at the macroscopic and microscopic scales. Results are discussed in relation with the structural effects of the matrices on the kinetics and final extents (degrees of hydrolysis) of both lipolysis and proteolysis.

2 Materials and method

2.1 Materials

Rapeseed oil (Fleur de Colza, Lessieur, France) was purchased from a local supermarket. Whey protein isolate (WPI) (ProLacta 80) was purchased from Lactalis, France. The protein content was 72.9 wt% on dry powder measured by the Kjeldahl method (Nx6.25) in triplicate. Pepsin (P6887), pancreatin (P1750), pancreatic lipase (L3126) and bile extract (B8631) were all of porcine origin and obtained from Sigma-Aldrich, France. The enzyme activities and bile salt concentrations in the bile extracts were measured according to the assays detailed in Minekus *et al.* (2014). All other materials were standard analytical grade. Water was Milli-Q water.

2.2 Preparation of food matrices

Liquid-emulsions (LE) were prepared as follows. 15 g of whey proteins (WP) were dispersed in 50 g of water and allowed to rehydrate under continuous stirring at room temperature for at least an hour. 10 g of rapeseed oil were then added with water to achieve a final weight of 100 g. A coarse emulsification was made using a rotor-stator homogenizer (Polytron PT3100D) for 5 min at 10,000 rpm. This coarse emulsion was then treated with ultra-sounds for 10 min (10 s on/off cycles) in order to further reduce the size of the oil droplets (Bioblock Ultrasonic Processor 20 kHz, 130 W). During the two emulsification processes, the temperature within the sample was maintained below 30 °C using an ice bath. The final emulsion contained 15 wt% of whey proteins and 10 wt% of rapeseed oil.

Solid-emulsions (SE) were prepared as follows. 0.24 g of WP were dispersed in 60 g of water and allowed to rehydrate under continuous stirring at room temperature for at least an

hour. 24 g of rapeseed oil were then added with water to achieve a final weight of 80 g and a coarse emulsion was made using the rotor-stator homogenizer for 5 min at 10,000 rpm. The emulsion was thereafter heated at 70 °C for 5 min to allow a certain degree of denaturation of proteins adsorbed at the interface of oil droplets. It was then mixed with a more-concentrated WP solution (22.33 wt%) in order to achieve final concentrations of 15 wt% of whey protein and 10 wt% of rapeseed oil. The emulsion was finally poured into 40 mL plastic cylindrical containers subsequently closed, immersed in a water bath, and heated for 30 min at 80 °C to produce a hard gel.

In order to estimate the respective contributions of proteolysis and lipolysis from the pH-stat signal, matrices only made of the continuous phases of the emulsions were also prepared and digested. The liquid proteinic continuous phase matrix (LCP) therefore consisted in a 15 wt% native whey protein solution while the solid proteinic continuous phase matrix (SCP) was made by heating LCP at 80 °C for 30 min.

2.3 Characterization of matrices

Granulometry: the oil droplet size distribution of the liquid emulsion was measured using laser light scattering (Mastersizer 2000, Malvern, France) with 1.47 as the refractive index of the oil and 1.33 as the refractive index of the dispersant (water). An absorption value of 0.001 was chosen for the optical properties of the emulsion. The volume-weighted mean diameter was calculated using $d_{4,3}$ ($d_{4,3} = \sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3$).

Confocal microscopy: solid (SE) and liquid (LE) matrices were observed with the use of confocal laser scanning microscopy (TCS SP2 AOBS by Leica, Solm, Germany) equipped with two He-Ne lasers with excitation wavelengths of 543 nm and 633 nm. A labeling protocol (Huc *et al.*, 2014) was performed on lipids with the Bodipy 665/676 nm marker (Invitrogen, Carlsbad, NM, USA) and on proteins with the DyLight 488 nm marker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Images shown in this paper correspond to superimpositions of images of the same area observed separately with the two markers.

Gel rheology: thermal gelation was also characterized using a rheometer (MCR 301, Anton Paar) fitted with a Couette geometry ($R_{\text{cup}}/R_{\text{cylinder}} = 1.085$). The following sequences defined by the process used for solid-emulsion were performed: a linear temperature ramp from 30 to 80 °C at 3 °C/min, a stabilization at 80 °C for 30 min, a cooling back down to 30 °C at 1 °C/min, then a final stabilization of the temperature at 30 °C for 20 min. The shear storage modulus at 0.1 % deformation with 1 Hz frequency was measured all along.

2.4 *In vitro* digestion protocol

In vitro digestion experiments were carried out in a 50 mL bottle bathing in a jacketed beaker filled with water that was maintained at 37 °C by heat water circulation in the double wall. The whole set was mounted on a magnetic stirrer (375 rpm).

Electrolytes adjustment: the digestion protocol used follows the recommendations given by Minekus *et al.* (2014) but an adaptation in the composition of the electrolyte solutions was needed. Indeed, experiments were first conducted by strictly following the protocol recommendations, but when trying to perform pH-stat analyses during the intestinal phase the measured pH actually increased instead of decreasing. As shown in Fig. 2.1 (squares), the same phenomenon was observed when the simulated intestinal fluid electrolyte solution alone (eSIF) was placed in an open beaker at the concentration used during an intestinal digestion. The pH was continuously increasing above 7, while gas bubbles appeared on the glass surfaces of the pH probe and the vessel. On the contrary, when replacing NaHCO_3 by NaCl (circles in Fig. 2.1), pH remained stable at 7. Following INFOGEST guidelines, NaHCO_3 is present at 85 mM, which corresponds to 7.14 g/L, and is the major contributor to hydrogenocarbonates in the final solution. This concentration is much higher than the solubility limit of CO_2 (1.6 g/L at 20 °C). Being in contact with the ambient atmosphere with the pH-stat setting, the CO_2 concentration is therefore out of equilibrium and is rejected in its gaseous form, leading to a basification of the milieu. In all prepared solutions (oral, gastric and intestinal) of the present study, NaHCO_3 was therefore replaced by NaCl at the same molar ratio in order to maintain the same ionic strength.

Gastro-intestinal digestion: apart from this salt replacement (NaCl instead of NaHCO_3) the protocol used was the same as in Minekus *et al.* (2014). Briefly, 5 g of food matrix were mixed with 5 mL of simulated salivary fluid (SSF) with no salivary α -amylase (no starch in the matrices). For solid matrices, they were artificially grinded with a domestic kitchen food chopper (Braun Turbo 600 W type 4191) during 3 s to produce pieces of solid gel ranging from 3 to 5 mm beforehand. For liquid matrices, the oral phase was only carried out for proper electrolyte concentrations and matrix dilution purposes. A few minutes were taken to reach temperature equilibrium at 37 °C before proceeding to the gastric phase. To launch the gastric phase, 10 mL of simulated gastric fluid (SGF) were added to the mixture. It consisted of SGF electrolyte solutions (eSGF), pepsin solution to achieve a 2000 U/mL activity in the final mixture, and HCl 1 N to lower pH to 3. The gastric phase was kept running for 2 h. Finally, 20 mL of simulated intestinal fluid (SIF) were added as the pH-stat titration was switched on. It consisted of SIF electrolyte solutions (eSIF), bile extract solution (10 mM

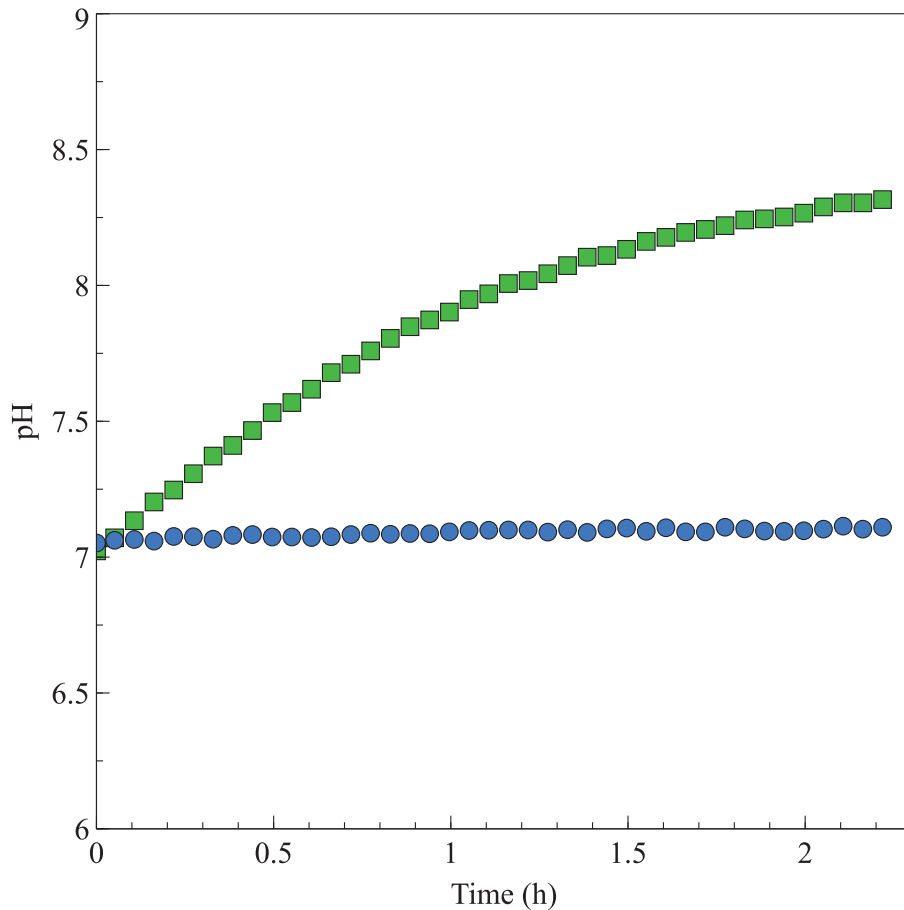


Figure 2.1 – pH evolution of the electrolyte solution used for intestinal phase (eSIF) when placed in an open beaker: (squares) eSIF prepared with respect to the *in vitro* digestion recommendations proposed by Minekus *et al.* (2014), and (circles) eSIF in which NaHCO_3 was replaced by NaCl .

bile salts in the final mixture), pancreatin added with pancreatic lipase (100 U/mL trypsin activity and 2000 U/mL lipase activity in the final mixture) and NaOH 1 N to adjust pH to 7. The intestinal phase was also 2 h long.

2.5 pH-stat monitoring for the intestinal proteolysis and lipolysis

As detailed in section 2.6 and 2.7, lipolysis and proteolysis performed by pancreatic enzymes lead to the release of protons, and hence to a decrease in pH. To monitor the kinetics of the reactions, an automatic titration unit (Titrino 7000, VWR, France) with a pH-stat programming to maintain the pH of the mixture at 7 was used with NaOH 0.1 N as the titrant solution. All pH-stat titrations were carried out in triplicates using a data acquisition frequency of 1 s.

Besides, 6 h long experiments were performed on the intestinal digestive mixture alone, without any added substrate, to determine whether the hydrolysis coming from the auto-

digestion of the digestive fluids could be neglected. Results showed that this was not the case as there was a progressive addition of 0.420 mL of NaOH during the 2 h of intestinal phase (data not shown). As a conclusion, special care should be taken with such digestion protocol because auto-digestion of digestive fluids can contribute to the signal measured with pH-stat. In the present study, this contribution was taken into account for proper calculations of the degrees of hydrolysis.

2.6 Degree of proteolysis

During the hydrolysis of a peptide bond, one carboxylic group is produced along with one α -amino group. According to their low pK values, carboxylic groups release their proton at pH 7, which are titrated by NaOH during the pH-stat experiment. However, the co-produced α -amino group show pK values of about 7.4 at 37 °C (Adler-Nissen, 1986) and may therefore consume protons to form ammonium groups. In the latter case, the proton captured by the α -amino group therefore counteracts the one released by the carboxylic group and nothing is measured by titration (Nielsen, 1997). According to these phenomena, conversion from volumes of NaOH added into degree of hydrolysis ($DH_{protein}$, in %) can be calculated as follows (Asselin *et al.*, 1989; Spellman *et al.*, 2003):

$$DH_{protein} = 100 \times \frac{V(NaOH) \times N(NaOH)}{\alpha(RNH_2) \times m(protein) \times h_{tot}} \quad (2.1)$$

where $V(NaOH)$ is the volume (mL) of NaOH consumed during the titration, $N(NaOH)$ is the NaOH normality (Eq/L), $m(protein)$ is the protein mass (g), h_{tot} is the number of peptide bonds in the protein substrate (= 8.8 meqv/g for whey proteins (Spellman *et al.*, 2003)) and $\alpha(RNH_2)$ is the mean degree of dissociation of α -amino groups, which can be calculated as follows:

$$\alpha(RNH_2) = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad (2.2)$$

where pK is the average dissociation constant for the α -amino groups liberated during hydrolysis.

The value of pK depends on several parameters such as temperature, peptide chain length or the nature of the terminal amino acid. It can therefore vary depending on the protein substrate and enzymes used. To get a proper estimate of the pK value in our conditions, complementary experiments using the OPA (ortho-phthalaldehyde) method were therefore conducted.

Quantification of DH using OPA: degrees of hydrolysis were measured on LCP at the end an intestinal phase (with no preceding gastric phase) using the protocol proposed by [Spellman *et al.* \(2003\)](#) except that no SDS were added. Briefly, this method is based on the detection at 340 nm of a complex formed between the α -amino groups of peptides and OPA (ortho-phthalaldehyde) in the presence of N-acetyl-L-cysteine. The difference of absorbance between the hydrolyzed and the corresponding unhydrolyzed samples therefore provide the number of α -amino groups produced during the proteolytic reaction. In this study, a UV-Vis Spectrophotometer (Evolution 201, Thermo Scientific) was used and the unhydrolyzed samples were prepared by mixing LCP with heat-treated (90 °C – 10 min) SIF. By comparing the DH measured by the OPA method for LCP to the corresponding volume of added NaOH with pH-stat, a mean pK of the α -amino groups of about 7.85 could be estimated, which leads to a value of 0.12 for $\alpha(\text{RNH}_2)$ (Table 2.1). Note that the OPA method cannot be used to determine DH values with solid matrices because of sampling difficulties. For SCP, the degree of hydrolysis was therefore estimated using Eq. (2.1) with an $\alpha(\text{RNH}_2)$ value of 0.12.

2.7 Degree of lipolysis

When fully digested, one triglyceride molecule liberates two free fatty acids (FFA) coming from positions sn-1 and sn-3 as well as the sn-2-monoglyceride. Two moles of NaOH are therefore required to neutralize one mole of digested triglyceride. However, as for of proteins, all the FFA released are not necessarily readily ionized depending on the pH of the milieu and the pK of the fatty acids. In a similar way as previously described for proteolysis, the degree of hydrolysis for lipids (DH_{lipid} , in %) can be calculated as follows:

$$\text{DH}_{\text{lipid}} = 100 \times \frac{V(\text{NaOH}) \times N(\text{NaOH}) \times M(\text{lipid})}{\alpha(\text{FFA}) \times m(\text{lipid}) \times 2} \quad (2.3)$$

where $V(\text{NaOH})$ and $N(\text{NaOH})$ have the same meaning as in Eq. (2.1), $m(\text{lipid})$ is the oil mass (g), $M(\text{lipid})$ is the molecular weight (g/mol) of the triglycerides in the oil (930 g/mol in this study), and $\alpha(\text{FFA})$ is the mean degree of dissociation of FFA carboxylic groups.

To estimate the value taken by $\alpha(\text{FFA})$ in our experimental conditions, complementary 6h30-long intestinal digestions were performed on reduced quantities (0.5 g) of an emulsion with 10 wt% rapeseed oil and 0.1 wt% WP in order to reach 100 % liberation of fatty acids (controlled by the appearance of a real plateau during pH-stat measurements). Taking into account the auto-digestion of pancreatic juice, $\alpha(\text{FFA})$ was estimated to be 0.54 (Table 2.1). Note that this value corresponds to a pK of about 6.9 (Eq. (2.2)), which is in good agreement with the reported pK values for long chain fatty acids (([Fernandez *et al.*, 2008](#))).

3 Results and discussion

3.1 Characterization of the designed emulsions

Confocal microscopy images and droplet size distributions of the two emulsions are presented in Fig. 2.2. As expected, oil droplets are bigger in the solid emulsion (SE) and seem more poly-dispersed (Fig. 2.2B and D) than in the liquid emulsion (LE) (Fig. 2.2A and C). Mean droplet diameters were $0.748 \pm 0.055 \mu\text{m}$ for LE and $19.842 \pm 0.569 \mu\text{m}$ for the SE emulsion before the first heat treatment (Fig. 2.2C and D, respectively). Droplet size changes in SE after the first heat treatment were controlled using laser granulometry and found not significant. In LE, a uniform green background can be seen, suggesting a homogenous protein solution continuous phase (Fig. 2.2A). On the contrary, the continuous phase made of proteins shows irregularities in the SE structure (Fig. 2.2B), suggesting a non-homogenous gelation process during the second heat treatment (30 min at 80 °C). The rheology test performed on the SE gave the value of $58 \pm 1 \text{ kPa}$, corresponding to a quite high hardness. As a conclusion, the two designed matrices were different in both microstructure (droplet diameter ratio SE/LE = 26.5) and macrostructure (liquid vs solid).

3.2 Digestion of the liquid and solid emulsions

The results from pH-stat experiments during the intestinal digestion of the liquid and solid emulsions are shown in Fig. 2.3A. Both kinetics are similar in shape, with a fast rate at the beginning of the titration followed by a progressive slowing down leading to a pseudo-plateau that was reached earlier for LE ($\sim 0.1 \text{ h}$) than SE ($\sim 1 \text{ h}$). The final volume of added NaOH is also similar for both matrices (about 9 mL). A semi-log scale (Fig. 2.3B) was also used to give a complementary view of the data at both short and long digestion times. It confirms the faster liberation of titrated elements during the first minutes (6.3 mL within 0.1 h) for LE. Then the kinetics slow down to reach 8.9 mL at the end of the 2 h of digestion but do not tend to a plateau, indicating that the reactions were not ended at this time. The SE curve shows a rather reduced rate of hydrolysis at the beginning of the digestion. It starts to increase at a smaller rate than the LE curve and finally crosses it after 23 min. At the end of the 2 h, the SE curve has attained 9.5 mL. Like for LE, a real plateau is not reached after 2 h.

The different shapes of the titration curves can be related to the different physical states of the matrices. Protein molecules and oil droplets are moving freely in LE. Therefore, both substrates are rapidly exposed to the enzyme actions. On the contrary, gel pieces were still

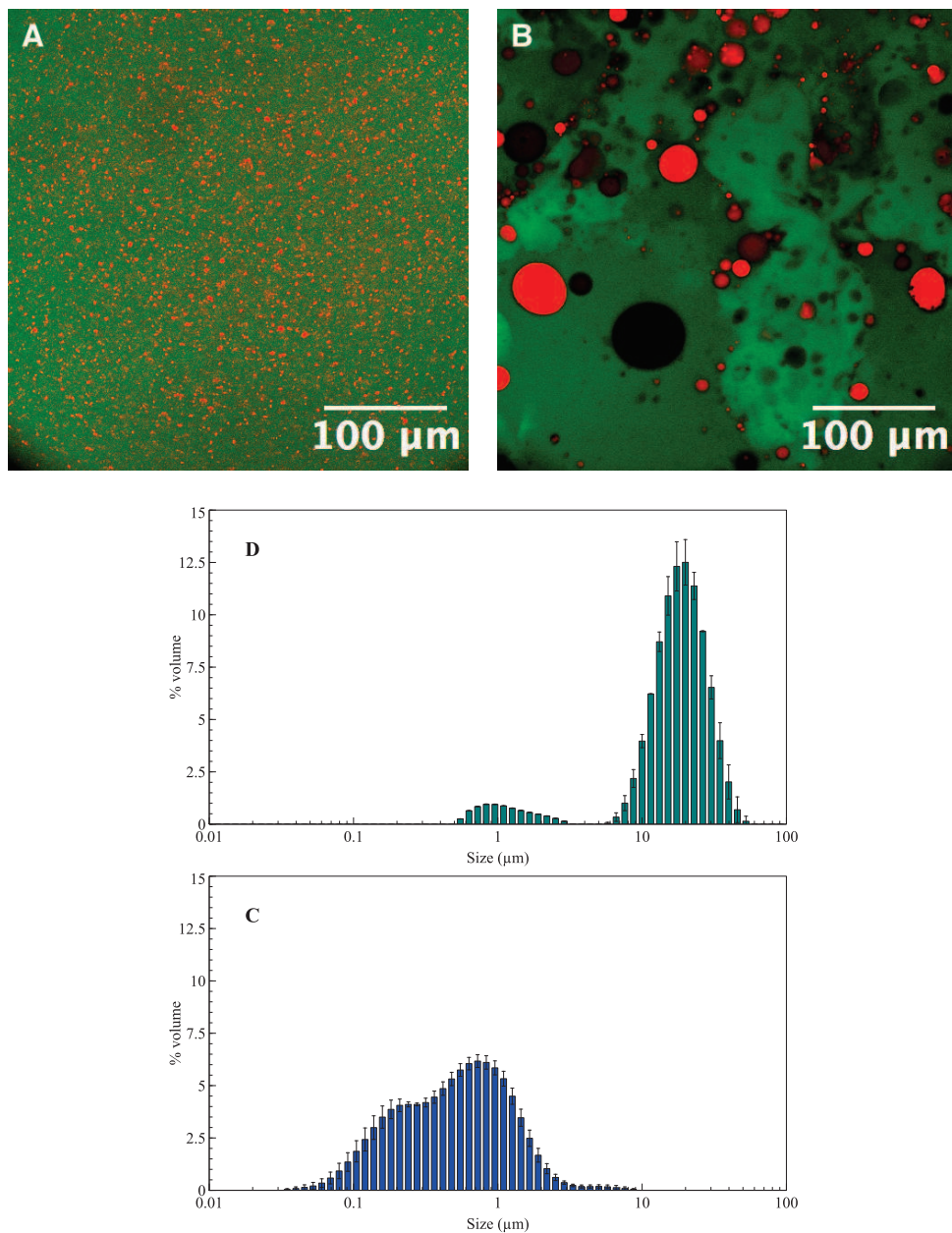


Figure 2.2 – Characterization of the microstructures of emulsions containing 15 wt% rapeseed oil and 10 wt% whey proteins. Confocal micrographs of the liquid emulsion (A) and the solid emulsion (B) at magnification $\times 40$ (lipids appear in red and proteins in green). Laser light scattering determination of the sizes of the oil droplets in the liquid emulsion (C) and in the emulsion prepared before heat treatment of the solid matrix (D). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

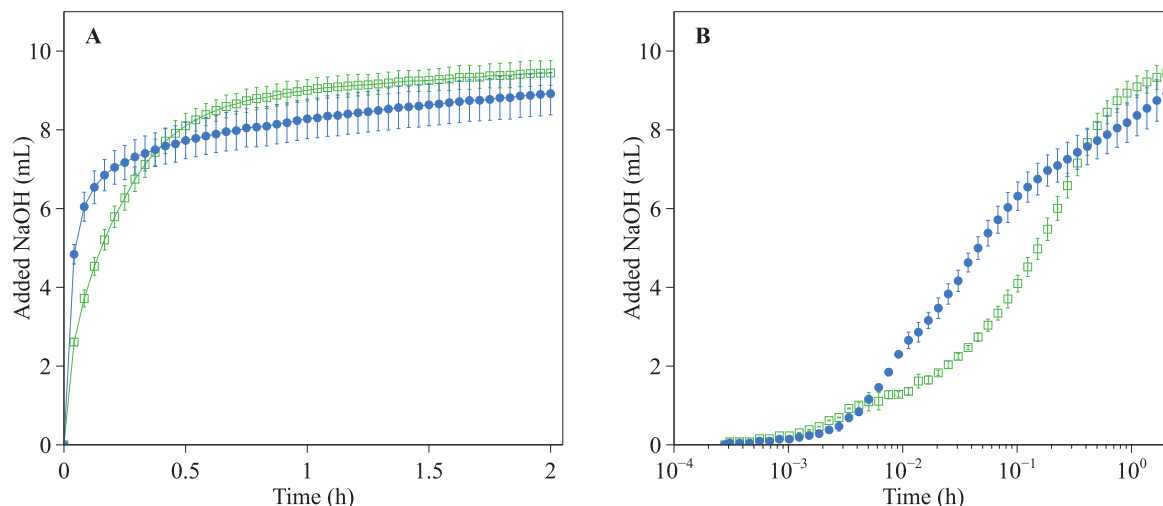


Figure 2.3 – pH-stat profiles measured during the intestinal phases of digestion for the liquid emulsion (filled circles) and the solid emulsion (open squares) on linear (A) and semi-log (B) scales. Values are means \pm SD over 3 replicates.

visible for SE after 2 h of gastric phase, implying that oil droplets were still entrapped in the proteinic network of gel pieces for this matrix. Therefore, enzymes have to diffuse into the SE gel pieces before finding their substrate, which leads to slower digestion kinetics. Luo *et al.* (2015) have also compared *in vitro* gastric digestions of WP solutions and gels and explain similar behaviors by a “zipper” type mechanism for the proteins-in-solution reaction (fast initial hydrolysis followed by a steadier stage) opposed to a “one-by-one” mechanism for proteinic gels (slower initial rate followed by a more-sustained trend).

3.3 Digestion of the proteinic continuous phase matrices (SCP and LCP)

In order to estimate the proteolysis contribution during pH-stat experiments performed on SE and LE, lipid-free matrices with the same structures were studied. This implicitly supposes that the absence of oil droplets does not significantly influence the kinetics of proteolysis and the structure of the protein network. Under these hypotheses, one can expect the overall trends and final extents of digestion to be largely unchanged.

It can first be noted that, as for SE, gel pieces of SCP were almost not modified in shape at the end of the gastric phase, implying limited pepsin hydrolysis and the persistence of solid state effects on digestion. The pH-stat results obtained during the intestinal digestion of the liquid and solid proteinic continuous phase matrices (LCP and SCP) are presented in Fig. 2.4A and B on a linear and semi-log scale, respectively. Both curves draw similar trends to the ones shown in Fig. 2.3 with a faster reaction rate in the first minutes of digestion, and similar inflection points and slowdowns. This result validates the major contribution of the continuous phase’s physical state on hydrolysis kinetics. In this case, however, a real plateau

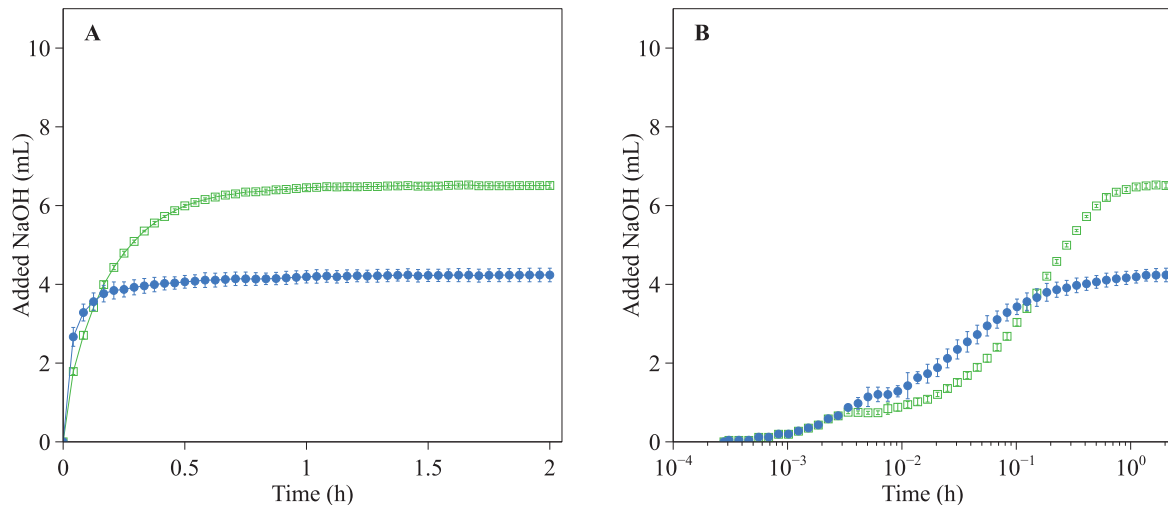


Figure 2.4 – pH-stat profiles measured during the intestinal phases of digestion for the liquid proteinic continuous phase matrix (filled circles) and the solid proteinic continuous phase matrix (open squares) on linear (A) and semi-log (B) scales. Values are means \pm SD over 3 replicates.

is reached for both LCP and SCP (Fig. 2.4A and B), indicating that the proteolysis reactions were finished within the 2 h of intestinal digestion. The major difference between the liquid and solid matrices lies in the final levels of NaOH added which, after 2 h, were of 4.2 mL and 6.5 mL, respectively. This means that the contribution of proteolysis to the overall pH-stat signal measured during digestion of the lipo-proteinic emulsions was important, and represented about 50 % and 70 % of the added NaOH for LE and SE, respectively.

At the end of the intestinal phase, the degree of hydrolysis was estimated to be 52 ± 2 % for LCP and 80 ± 1 % for SCP (Table 2.1). These results are in good agreement with the recent studies of Picariello *et al.* (2015) and Egger *et al.* (2015) (in this issue) who reported values of about 6 % using the INFOGEST *in vitro* protocol to digest dairy proteins. Besides, the greater final level reached with SCP than LCP can probably be attributed to the greater sensitivity of denatured whey proteins to hydrolysis by intestinal proteases. This finding is indeed consistent with the literature (Macierzanka *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2014b).

3.4 Estimation of the lipolytic kinetics

The contributions of the lipolysis reactions to the SE and LE kinetics were approximated by subtracting, point by point, the pH-stat data collected with proteinic continuous phase (LCP and SCP) from the ones collected with emulsions (LE and SE). Results are presented in Fig. 2.5 (linear and semi-log). The curve shapes are similar to the ones obtained for the digestions of emulsions (LE, SE) and proteinic continuous phases (LCP, SCP) (Fig. 2.3 and Fig. 2.4), meaning a faster rate in the first minutes followed by slower kinetics after an

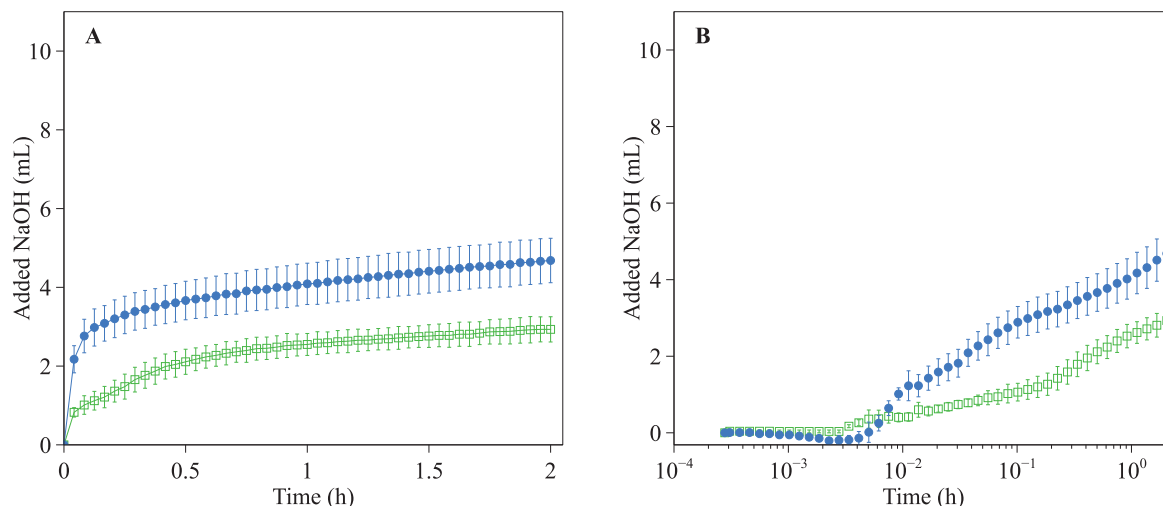


Figure 2.5 – pH-stat profiles of the lipolysis during the intestinal phases of digestion estimated by subtracting Fig. 2.4 from Fig. 2.3, for lipids in the liquid emulsions (filled circles) and in the solid emulsions (open squares), on linear (A) and semi-log (B) scales. Values are means \pm SD over 3 replicates.

inflection point. Comparatively to Fig. 2.4 though, the final amount of added NaOH obtained with the liquid matrix is higher than the solid one (4.7 mL vs. 2.9 mL). Moreover, a real plateau was not reached after 2 h for both curves, as previously observed with LE and SE (Fig. 2.3). This demonstrates that the kinetics of lipolysis are slower than the kinetics of proteolysis (Fig. 2.4).

Using Eq. (3), a final degree of lipolysis of $81 \pm 10 \%$ and of $51 \pm 6 \%$ for the lipids of LE and SE were found, respectively (Table 2.1). The order of magnitude of these values are in good accordance with the literature (Giang *et al.*, 2015; Li and McClements, 2010; Williams *et al.*, 2012). Besides, the higher level of lipolysis for LE than SE may be related to the physical state of the continuous phase and to the sizes of the oil droplets in the emulsions. Indeed, lipids are readily available for hydrolysis as soon as enzyme adjunction has been made for LE, whereas pancreatic lipase have to diffuse into the gel pieces and/or oil droplets must first be liberated from the protein gel network for the reaction to take place. Moreover, the faster rate of titration for LE may also be related to the smaller sizes of oil droplets dispersed in it. Lipolysis is an interfacial enzymatic reaction; so, for the same amount of lipids, the smaller the droplets, the larger the oil/water interfacial area, and the faster the reaction.

The fact that lipolysis is not finished at the end of the experiments is a classical result with long-chain triglycerides (Giang *et al.*, 2015; Golding *et al.*, 2011; Li and McClements, 2010). The slowdown in the kinetics could be due to an inhibition of the reaction by the lipolysis products (Mun *et al.*, 2007; Pafumi, 2002) or a certain degree of coalescence that

Table 2.1 – Degree of hydrolysis at the end of 2 h of intestinal digestion and mean degree of dissociation of the peptide α -amino groups and fatty acid carboxyl groups.

Nutrients	Matrix	Degree of hydrolysis (%)	Degree of dissociation (correction factor)
Proteins	Liquid	52 ± 2	0.12 (α in Eq. 2.1)
	Solid	80 ± 1	
Lipids	Liquid	81 ± 10	0.54 (α in Eq. 2.3)
	Solid	51 ± 6	

decreased the interface area available to the lipase action (Day *et al.*, 2014; Giang *et al.*, 2015; Golding *et al.*, 2011).

4 Conclusion

This study was aiming at developing a methodology to compare structure-related effects of model lipo-proteinic foods on their digestion. The feasibility and interest of using the pH-stat method in association with the INFOGEST *in vitro* digestion protocol was proved. It resulted in a simple and quantitative method that allows a continuous monitoring of the intestinal digestions of both proteins and lipids. This method is a very valuable add-on to the INFOGEST protocol because it makes possible to follow *in vitro* digestion in real time without the requirement of samplings at specific time points.

Applying this method to model emulsion-type food matrices with the same compositions but different structures allowed observing differences in their digestion kinetics and extents for both proteins and lipids. The physical state of the continuous phase and the native *versus* denatured state of whey proteins were found to be important factors of the overall dynamics for both protein and lipid digestion.

Acknowledgments

This work received support from the French National Research Agency under the “Investissements d’Avenir” program (reference No. ANR-11-IDEX-0003-02). The author would like to thank Thomas Cattenoz (UMR782 GMPA, Thiverval-Grignon, France) for his help with the setting of the digestion protocol. A special thank to Véronique Bosc (UMR1145 GENIAL, Massy, France) for sharing her knowledge of the emulsification process and to Gabrielle

Moulin and Delphine Huc for their help for confocal microscopy observations. The authors are involved in the Food and Agriculture COST (European Cooperation in Science and Technology) Action FA1005 ‘Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process (INFOGEST)’.

À retenir

Deux émulsions de même composition (10 % p/p d'huile de colza et 15 % p/p de protéines de lactosérum) mais de macro- et de microstructure bien différenciées ont été conçues, en jouant sur le procédé de fabrication. Les résultats des expériences de digestion *in vitro* ont mis en évidence que l'émulsion liquide permettait une lipolyse accrue en termes de vitesse et de niveau final de la réaction, attribuable à l'état physique de la phase continue de l'émulsion et à la plus grande aire interfaciale développée par les petites gouttelettes d'huile. La protéolyse était également plus rapide initialement dans les émulsions liquides mais avec un niveau final moindre, probablement lié à une plus grande résistance des protéines sériques aux protéases digestives dans leur état natif.

Alors que la méthode pH-stat est le plus souvent mise en œuvre pour le suivi de la lipolyse intestinale dans les études qui s'intéressent à la digestion, ce travail démontre son intérêt pour le suivi simultané des réactions de protéolyse sur des aliments modèles plus complexes que des émulsions simples ou des solutions de protéines. Les résultats obtenus par cette stratégie expérimentale, qui associe des mesures par pH-stat aux conditions de digestion harmonisées du consortium Infogest, illustrent également son fort potentiel pour étudier de façon simple et rapide des effets de structure de la matrice alimentaire sur les cinétiques de digestion. Ces premiers résultats ont enfin permis de confirmer *in vitro* l'intérêt et la pertinence des aliments conçus pour le projet ALIAS. Les émulsions présentées dans ce chapitre ont donc été incorporées dans le régime de deux lots de rats différents pour les études *in vivo*.

Chapitre 3

Digestion *in vitro* d'aliments solides : taille des particules et cinétiques des hydrolyses protéiques et lipidiques

Sommaire

Présentation de l'article	88
Abstract	89
1 Introduction	91
2 Materials and method	93
2.1 Materials	93
2.2 Preparation of food matrices	93
2.3 Characterization of the matrices	94
2.4 <i>In vitro</i> digestions	95
3 Results and discussion	97
3.1 Impact of particle sizes during gastro-intestinal digestion of matrices <i>SE</i> and <i>SCP</i> (pH 6.3)	97
3.2 Impact of particle sizes on pH equilibrium between gastric and the intestinal phases	99
3.3 Intestinal digestion of the matrices adjusted at pH 7	101
4 Conclusions	106
Acknowledgments	107
À retenir	108

Présentation de l'article

Les méthodes de digestion *in vitro* sont en majorité appliquées à l'étude d'aliments liquide ou semi-liquide pour s'affranchir d'un degré de complexité supplémentaire, lié à la mécanique des aliments solides. Toutefois, lors de la phase orale, la mastication fragmente les matrices solides. Le bol ingéré peut ainsi présenter d'importantes variations en termes de tailles de particules, par l'entremise de la structure et de la rhéologie propre de la matrice mais aussi des capacités de mastications (dentitions variables entre les personnes) et les habitudes d'avalement (ingestion après un degré de réduction en bouche plus ou moins important). L'estomac agit comme un filtre, et les particules plus grandes que 2 mm environ vont passer plus de temps dans ce compartiment pour subir une réduction supplémentaire. Les plus grosses particules non digérées vont tout de même passer cette barrière au bout du cycle gastrique et peuvent atteindre le côlon sans qu'ils aient été totalement dégradés l'intestin grêle. La taille de particules ingérées va donc jouer sur la cinétique de dégradation mécanique.

Cependant l'effet de taille va aussi se jouer sur le plan des hydrolyses pour des raisons d'accessibilité des enzymes à leurs substrats. Et s'il apparaît difficile d'étudier ces effets *in vivo*, la plupart des approches *in vitro* ne simulent pas les transformations mécaniques qui ont lieu au niveau de la bouche, de l'estomac et de l'intestin. La façon habituelle de faire est de mixer suffisamment la matrice pour la réduire en particules suffisamment fines. La méthode de digestion avec suivi des hydrolyses par pH-stat mise en place dans le chapitre précédent peut potentiellement apporter des réponses sur l'effet de la taille des fragments. Une question est notamment de savoir si les hydrolyses se font en surface du fragment ou si les enzymes peuvent agir au cœur. Le chapitre précédent démontrait une influence de l'état physique de la phase continue des émulsions sur la libération des nutriments, avec un effet ralentissant de l'état solide par gélification. En se concentrant sur les matrices solides, émulsions et gels protéiques, et en proposant différentes tailles de découpe, la seconde étude présentée ici cherche à compléter le tableau des paramètres influents la modulation des hydrolyses. Un point d'attention important est l'effet spécifique de la taille des fragments sur la mesure faite par pH-stat afin de proposer des recommandations.

Les résultats de ces expériences sont présentés sous forme d'un projet d'article à soumettre au journal *Food Hydrocolloids*.

Digestion of solid food emulsions: influence of the size of bolus particles on *in vitro* lipolysis and proteolysis kinetics

Damien J.L. Mat^{a,b}, Isabelle Souchon^a, Camille Michon^b, Steven Le Feunteun^{a,*}

^a UMR GMPA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78850, Thiverval-Grignon, France

^b UMR GENIAL, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 91300, Massy, France

* Corresponding author : steven.le-feunteun@inra.fr

Abstract

Oral mastication and antral grinding in the stomach mechanically transform the food into particles of different sizes. However, it is still unclear on how the size of solid food fragments influences the release of nutrients during digestion. Such mechanisms indeed appear difficult to investigate *in vivo*, and *in vitro* experiments do not usually simulate comminution of solid foods, and are often limited to liquid or semi-solid foods. In this study, emulsion gels – made of 10 wt% oil and 15 wt% whey proteins – were prepared either by grinding or by cutting cubes of 0.5 and 1 cm, before being submitted to *in vitro* gastro-intestinal digestions with a pH-stat monitoring of both intestinal lipolysis and proteolysis. Particle size had an important effect on the rate of hydrolysis. The kinetics of protein hydrolysis were essentially proportional to the surface area developed by the particles. Initial lipolysis kinetics were also more rapid for smaller particle, but this tended to be the opposite towards the end of digestion, *i.e.* after the protein network was disintegrated. This can be explained by a sooner destabilization of the lipid structures with smaller particles. Droplet coalescence was also evidenced at the boundaries of the cubes using confocal microscopy. Results finally show that protons can be entrapped within solid food particles during the gastric phase, before being progressively released during the intestinal phase. All these effects have important consequences for a proper control of *in vitro* digestion protocols, meanwhile suggesting physiological implications on enzymes activities when food fragments of several millimeters in size are swallowed.

Highlights

- The bigger the particle size, the slower the hydrolysis of both proteins and lipids in an emulsion gel.
- Proteolysis kinetics are essentially proportional to the surface area developed by the particles.
- Lipolysis kinetics are initially more rapid for smaller particle, but final extent can be greater for larger particles.
- Protons entrapped during the gastric phase can be progressively released during the intestinal phase.
- This has to be taken into account for pH-stat monitoring during *in vitro* digestions.

Keywords

Solid food; Gel; *In vitro* digestion; Particle size; pH-stat; Proteins, Lipids

1 Introduction

Food breakdown and nutrient absorption during digestion are complex processes that consist in the interplay of different phenomena undergone by the food matrix during its transit in the digestive tract. These processes are: i) biochemical with the actions of different enzymes allowing lipolysis, proteolysis and amylolysis, ii) mechanical during the oral processing and through the organ motility in the digestive tract, iii) physico-chemical with the dilution by digestive fluids, leading to important variations in pH and in the composition of the bolus surrounding, and finally iv) biological according to the presence of microbiota all along the digestive tract (Griffiths, 2012). All these mechanisms are clearly modified by the composition of food, but also by its structure (Norton *et al.*, 2015). Food structure results from complex associations of nutrients and other food ingredients at different scales. Three main scales can be highlighted: i) the molecular scale involving chemical species, their structures and their interactions, ii) the microstructural scale for supramolecular objects such as oil droplets or protein aggregates, and iii) the macrostructural scale which reflects the physical state and mechanical properties of the matrix. In the context of rising nutrition concerns such as food related diseases (obesity, sarcopenia for example), inquiries for understanding the potential of food structure design on nutrient release is found in numerous studies (Bornhorst and Singh, 2014; McClements and Decker, 2009; Norton *et al.*, 2014; Turgeon and Rioux, 2011).

In vitro digestion protocols have been developed and have proved relevant to gain knowledge on food structure effects on the release of nutrients (Fardet *et al.*, 2013; Guerra *et al.*, 2012; Verhoeckx, Kitty *et al.*, 2015). Compared to *in vivo* studies, they offer better reproducibility since they are not compromised by inter- and intra-individual variations and allow focusing independently on the effect of different conditions. Additionally, they are cheaper, are more easily implemented, and do not need ethical endorsements (Golding and Wooster, 2010; Guerra *et al.*, 2012; Ménard *et al.*, 2014; Wickham *et al.*, 2009). Static mono-compartmental digestion protocols are the simplest way to proceed to *in vitro* digestions of food. They consist in introducing the food in an agitated vessel maintained at 37 °C containing a digestive milieu. The Infogest international consortium has recently proposed an oro-gastro-intestinal protocol to harmonize the experimental conditions used across different laboratories (Minekus *et al.*, 2014). Among static digestion protocols, the pH-stat titration method appears as a powerful tool to study on-line the kinetics of nutrients hydrolysis in complex food matrices. It has been successfully implemented to the Infogest protocol in a previous work in which proteolysis and lipolysis could be monitored simultaneously (Mat *et al.*, 2016).

The majority of static digestion studies focus on liquid or semi-liquid foods. Indeed, solid foods show an additional level of complexity since food comminution in the mouth before digestion has to be considered. The way the food breaks down depends on its mechanical properties and on the energy involved. Therefore, a large distribution of particle size during comminution can be obtained. It is the case in *in vivo* conditions, where inter-individual variability is observed (Jalabert-Malbos *et al.*, 2007). For example, a median width of food particle size ranging from 0.7 to 2.6 mm were obtained with bread crumbs and panelists that were asked to spit out just before swallowing (Le Bleis *et al.*, 2016). This large distribution of particle sizes depends not only on the individual eating the food, but also on the structure complexity of the food (Grundy *et al.*, 2016; Jalabert-Malbos *et al.*, 2007; Larsen *et al.*, 2016; Mennah-Govela *et al.*, 2015; Peyron *et al.*, 2004). Thus, vegetables, such as cauliflower, radish or carrots, lead to higher particle sizes during oral processing than nuts (peanut, almond, pistachio) (Peyron *et al.*, 2004). In the stomach, breakdown and erosion of food particles occur and it is generally admitted that particles under 2 mm can pass into the duodenum (Kong and Singh, 2008; Norton *et al.*, 2014). However, the stomach still holds the possibility to evacuate bigger particles into the duodenum (Dressman, 1986; Kong and Singh, 2008; Marciani *et al.*, 2001). *In vivo* imaging has permitted to observe agar beads as large as 1.27cm in the upper duodenum, which were thus able to pass through the pylorus (Marciani *et al.*, 2001). Gastric emptying, which governs the flux of matter entering the duodenum and hence the kinetics of nutrients absorption and metabolization, is clearly influenced by bolus particle sizes in the antral part of the stomach. This is the reason why the masticatory efficiency of elderly eating meat has an impact on the kinetic of release of amino acids in bloodstream (Rémond *et al.*, 2007). The mastication of almonds and the particle sizes in mouth also influences lipid bioaccessibility and postprandial lipidemia (Grundy *et al.*, 2014). The degree of particle size breakdown during mastication may be, as well, a possible cause of inter-individual glycemic variability (Ranawana *et al.*, 2010). It is thus physiologically relevant to better understand how the release of nutrient kinetics is modulated when food particles of different sizes are submitted to an *in vitro* digestion. For static digestion protocols, as mechanical breakdown of food particles is not taken into account, the way in which solid food samples are prepared needs careful consideration. Grinding down solid food before launching digestion is advised in the harmonized protocol (Minekus *et al.*, 2014) in order to standardize the preparation of the food bolus in *in vitro* studies. The grinding of food has to target particles size close or less than 2 mm (Fang *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2015; Mennah-Govela and Bornhorst, 2016). However, doing so might mask some effects of physiological relevance, such as acidity and

moisture uptake in the stomach (Luo *et al.*, 2015; Mennah-Govela and Bornhorst, 2016) or delayed enzymes action with the arrival of microstructurally intact food fragments in the stomach (Grundy *et al.*, 2016).

In the light of those considerations, the first aim of this study was to study the impact of the size of the food particles on their further hydrolysis with special consideration of diffusive effects between the digestive fluids and the matrix. The second objective is to gain insight on how particles sizes of solid food have to be managed during an *in vitro* digestion experiment in order to recommend thoughtful preparation of such foods matrices.

2 Materials and method

2.1 Materials

Whey protein isolate powder, branded as Prolacta 95, was purchased from Lactalis, France (95 wt% protein on dry powder). Rapeseed oil (Fleur de colza, Lesieur, France) was obtained from a local supermarket. Pepsin (P6887), pancreatin (P7545), pancreatic lipase (L3126) and bile extract (B8631), all of porcine origin, were bought from Sigma-Aldrich, France. Enzyme activities and bile salts concentration were primarily determined following to the procedure described in Minekus *et al.* (2014). All other materials were of standard analytical grade and water used was Milli-Q water.

2.2 Preparation of food matrices

Food matrices: Four solid matrices were designed for this study (Table 3.1). The first two were a solid emulsion gel (*SE*) and its solid continuous phase (*SCP*) counterpart where oil was omitted. The native pH of these matrices was 6.3. The second set of matrices differs by this pH value only. Indeed, the pH of the solutions had been adjusted to 7.0 prior to gelation (*SE_{pH7}* and *SCP_{pH7}*).

SE were produced based on a protocol previously described (Mat *et al.*, 2016). Briefly, an emulsion was prepared with 0.3 wt% of whey proteins and 30 wt% of oil using a rotor-stator homogenizer (Polytron PT3100D) for 5 min at 10,000 rpm, then heated for 5 min at 70 °C. It was then mixed with a solution of 22.3 wt% of proteins. The final content was 15 wt% proteins and 10 wt% oil. The preparation was poured in plastic containers and heated for 30 min at 80 °C in a water bath to gel the emulsion. *SCP* were produced by gelation of a 15 wt% whey protein solution. *SE_{pH7}* and *SCP_{pH7}* were prepared the same way than *SE* and *SCP*, but pH was manually adjusted to pH 7.0 using NaOH 10 N, just before gelation.

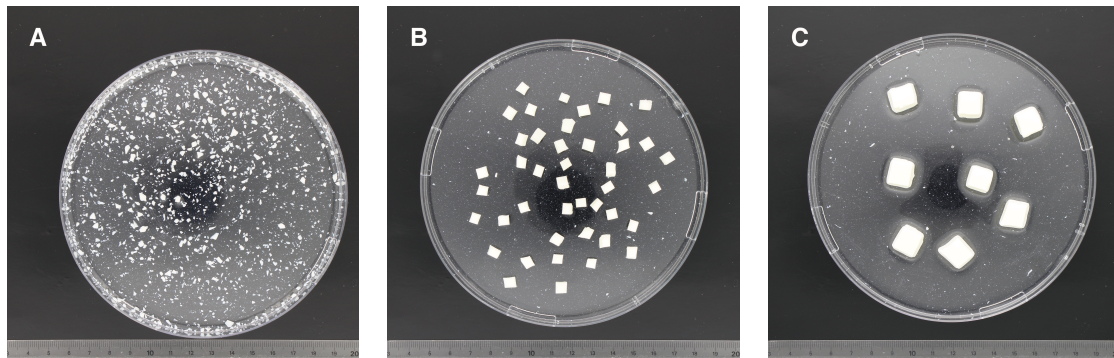


Figure 3.1 – Pictures of the differently sized food fragments for the *SE* matrix: grinded gel (A), cubes of 0.5 cm (B) and of 1 cm (C). Scale is in cm.

Preparation of differently sized fragments: Before each *in vitro* digestion, the matrices were demolded and either reduced in small particles of random size, or cut in cubes of controlled size. In the first case, they were grinded with a domestic kitchen food chopper (Braun Turbo 600 W type 4191) for 3 s at the max power. In the latter case, a kitchen manual slicer fitted with a 0.5 or 1 cm lattice was used to prepare cubes of corresponding edges.

Size and surface area of fragments: In order to control the sizes of the food fragments generated, a macrovision system and image analysis was used (Jourden *et al.*, 2016). Briefly, gel particles were placed in Petri dishes which were poured with glycerol to allow proper separation between particles while avoiding swelling (Fig. 3.1) (Le Bleis *et al.*, 2016). The imaging apparatus (branded as ScanCube) consisted in a camera mounted in a closed box, fitted with several light sources providing a controlled flat white light field. Image analysis was performed with the ImageJ software (Wayne Rasband NIH, Bethesda, MA, USA) and consisted in a black & white thresholding of the pictures followed by detouring of each food particle. Their minimal Feret length was determined, as well as the total surface area developed by the grinded particles using a ‘pebble’ model which assumes that the total surface area developed by particles is 2.5 times the area measured from image analysis. Cubes were found to measure 0.517 ± 0.021 cm (measured on 34 pieces) and 1.047 ± 0.043 cm (measured on 8 pieces). The sliced pieces of gel had a minimal Feret length of 0.054 ± 0.052 cm (measured on 3,125 particles), while having a high variability of shapes (Fig. 3.1A).

2.3 Characterization of the matrices

Granulometry: The size distribution of oil droplets was measured using laser light scattering prior to gelation (Mastersizer 2000, Malvern, France). Values of 1.47 for the refractive

Table 3.1 – Main characteristics of the studied matrices.

Food matrix	pH	Composition	G' at the end of the gelation (kPa)
<i>SE</i>	6.3	15 wt% whey proteins 10 wt% oil	46.90 ± 4.49
<i>SCP</i>	6.3	15 wt% whey proteins	39.00 ± 1.31
<i>SE_{pH7}</i>	7.0	15 wt% whey proteins 10 wt% oil	49.23 ± 1.02
<i>SCP_{pH7}</i>	7.0	15 wt% whey proteins	41.77 ± 0.90

index of the oil, of 1.33 for the refractive index of the dispersant (water) and of 0.001 for the optical absorption of the emulsion were used. The size of the oil droplets in the emulsion before and after the first heating step (given as the volume-weighted mean diameter) were of 19.13 ± 0.03 and 18.83 ± 0.64 μm , respectively. This was sensibly the same than in our previous study (Mat *et al.*, 2016) and proved that the first heating step did not cause destabilization.

Rheometry: Storage modulus (G') of the matrices was determined with a rheometer (MCR 301, Anton Paar) in a Couette configuration using the same protocol as described by (Mat *et al.*, 2016). Briefly, the gelation step of the matrix preparation was performed within the rheometer using a sequence of heating to 80 °C, and down, meanwhile the elastic modulus G' was monitored under a periodic shearing deformation of 0.1 % at 1 Hz. The cycle was repeated 3 times.

Final G' values are reported in Table 3.1. No significant difference was observed between matrices when pH was modified (*SE* vs *SE_{pH7}* and *SCP* vs *SCP_{pH7}*). However, *SE* matrices showed a limited but significant increase of the storage modulus compared to the oil-free matrices (*SCP* or *SCP_{pH7}*), which is a result of the interactions between both dispersed and continuous phases. As a complement, characterization of very similar solid emulsions by confocal microscopy can be found elsewhere (Mat *et al.*, 2016).

2.4 *In vitro* digestions

pH-stat experiments: The protocol was the same as in Mat *et al.* (2016), and consist in an *in vitro* static digestion experiment slightly adapted from Minekus *et al.* (2014) and coupled with a pH-stat monitoring during the intestinal phase (Titroline7000, VWR, France). Digestions were processed in a 50 mL glass bottle immersed in a jacketed beaker filled with water. The whole set was maintained at 37 °C by heat water circulation in the double wall while

constant agitation was made by an underlying magnetic stirrer (375 rpm). 5 g of freshly grinded or cut matrix were weighted in the bottle. 5 mL of simulated salivary fluid was then added and the mix was authorized to reach temperature equilibrium under constant stirring. 10 mL of simulated gastric fluid (containing HCl 1 N to adjust the pH at 3 and pepsin was then added, and the gastric phase was carried out for 2 h. At the end, simulated intestinal fluid were similarly added (containing bile extract and NaOH 1 N to adjust pH at 7). The pH probe and the titration cone of an automatic titration unit was put in place and maintained in a way that the probe was not blocking the food agitation and that the titration solution could be properly added in the mix. 5 mL of the enzymes solution (containing pancreatin and pancreatic lipase) was then added in the bottle to complete a final volume of the digestive mix of 40 mL. The titration program was immediately started for at least 2 h. The automatic titration unit was programmed to maintain the pH at 7 through the addition of titrant NaOH 0.1 N. For matrices at pH 7.0, only the intestinal phase was performed (with identical intestinal dilution ratio but with no preceding oral nor gastric phases). Titrations were repeated at least one time for each matrix and for each size considered (grinded, cut in cubes of 0.5 cm or in cubes of 1cm).

Intestinal in vitro digestions coupled with confocal analysis: In an attempt to gain insight on the microstructural evolution of the emulsion gels during the intestinal phase of digestion, *SE* gels at pH 7.0 were digested through an additional series of intestinal digestions for confocal microscopy observations. Five digestions (half-sized in quantities of substrate, enzymes and solutions, no preceding oral nor gastric phases) were performed in parallel and stopped at different times prior to microscopical observations:

- 0.5 cm cubes after 30 and 90 min of intestinal digestion
- 1 cm cubes after 30, 90 and 180 min of intestinal digestion

In order to stop the enzymatic reaction, cubes were withdrawn from the digestive mix, placed in a plastic container, and immersed in an ice bath. They were then cut in half and lipids and proteins were labelled with a mixed solution of Bodipy 665/ 676 nm (DyLight 488 nm) and of DyLight 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Huc *et al.*, 2014). They were observed with confocal laser scanning microscopy (CLSM) using the TCS SP8 AOBS microscope (Leica, Solm, Germany), equipped with two He-Ne lasers with excitation wavelengths of 543 nm and 633 nm. Pictures acquisition and coloration (red for lipids and green for proteins) were made with the provided software (Leica Application Suite X). Observations were made at a depth of about 50 μm into the cubes in order to avoid imaging

of the oil expelled during the cutting in half. Besides, because of the important size of the cubes, the mosaic picturing function was used in order to make images of the entire cubes.

Degree of hydrolysis (DH): Degrees of proteolysis and of lipolysis were calculated described in Mat *et al.* (2016). Briefly, the volumes of titrant (V in mL) added for the *SCP* matrices were converted into degrees of proteolysis according to the following equation:

$$DH_{prot} = 100 \times \frac{V \times N}{m_{prot} \times h_{tot}} \times \frac{1}{\alpha_{NH_2}} \quad (3.1)$$

where N is the normality of the base (in eq/L), m_{prot} is the mass of proteins (in g), $h_{tot} = 8.8 \times 10^{-3}$ eqv/g is the total number of peptide bonds in whey proteins (Spellman *et al.*, 2003), and α_{NH_2} is the mean degree of dissociation of the Nterm amino groups that we previously estimated at 0.12 (Mat *et al.*, 2016).

To estimate the lipolysis kinetics, the volume of titrant added during the digestion of *SCP* matrices, which only accounts for proteolysis, was subtracted from the corresponding volumes obtained during the digestion of the *SE* matrices, which accounts for both proteolysis and lipolysis. The degree of lipolysis was then calculated by:

$$DH_{lip} = 100 \times \frac{V \times N \times M_{lip}}{m_{lip} \times 2} \times \frac{1}{\alpha_{COOH}} \quad (3.2)$$

where m_{lip} is the oil mass (in g), M_{lip} is the molecular weight (g/mol) of the triacylglycerols in the oil (taken as 930 g/mol), and α_{COOH} is the mean degree of dissociation the of free fatty acids carboxylic groups, that we previously estimated at 0.54 (Mat *et al.*, 2016).

3 Results and discussion

3.1 Impact of particle sizes during gastro-intestinal digestion of matrices *SE* and *SCP* (pH 6.3)

In the first part of this study the *SE* (solid emulsion) and *SCP* (solid continuous phase, free of oil) matrices were submitted to gastro-intestinal *in vitro* digestions, for the 3 particle sizes (grinded, 0.5 cm cubes and 1 cm cubes). Figure 3.2 shows the results of the pH-stat titration during the intestinal phase for *SE* and *SCP* on both linear and semi-log scales. For *SE* matrices, it clearly appears that the bigger the particle, the slower the initial kinetics of reaction (Fig. 3.2A and A'). A pseudo-plateau was reached for the SE grinded matrix after about 0.5 h of intestinal digestion, although it continued to increase slowly over time during the last 1.5 h of experiment (Fig. 3.2A'). A pseudo-plateau also seemed to appear, albeit

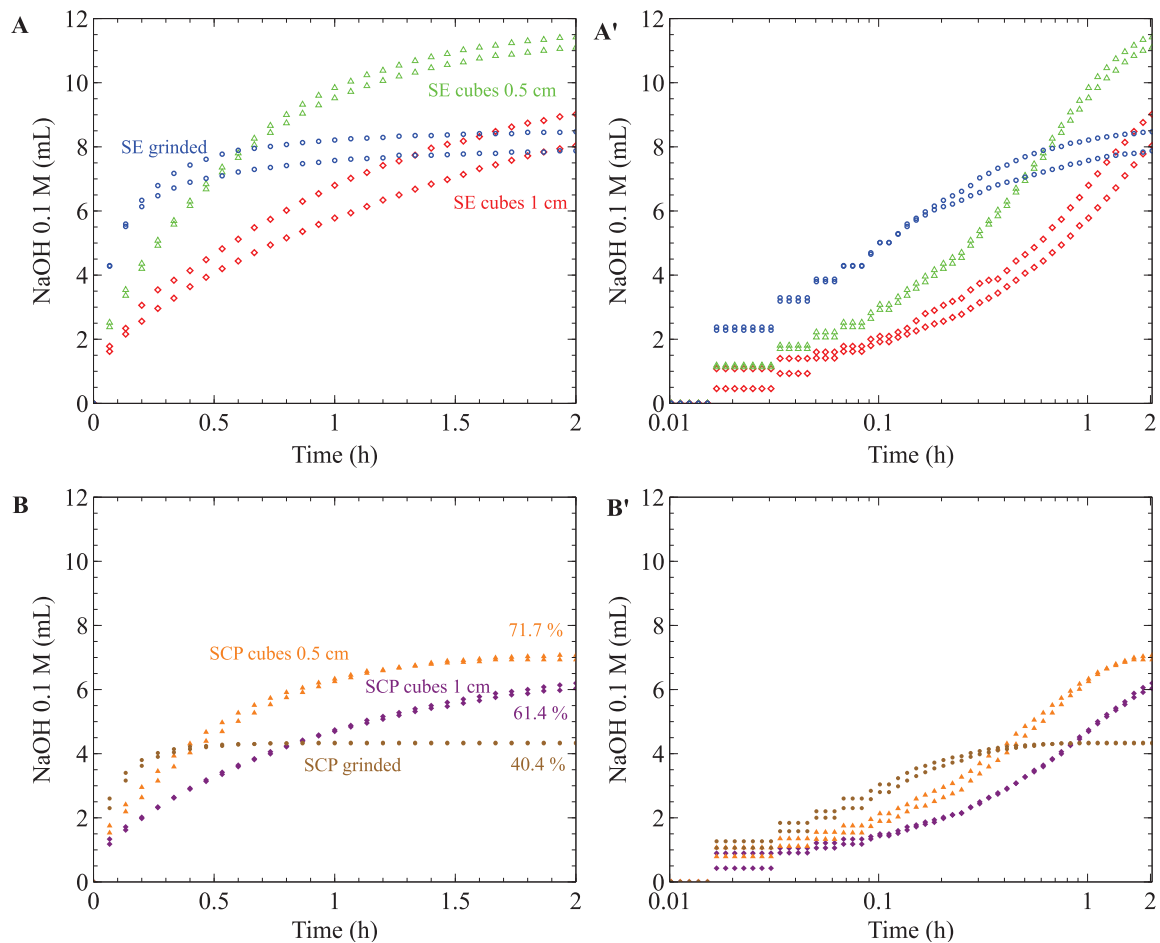


Figure 3.2 – Influence of solid emulsion fragment sizes on the pH-stat titration volumes during the intestinal phase of digestion (preceded by a 2 h gastric phase) for: (A) The solid emulsion (*SE*) when grinded (blue), and cut into cubes of 0.5 cm (green) or cubes of 1 cm (red). (B) The solid continuous phase (*SCP*) when grinded (brown), and cut into cubes of 0.5 cm (orange) or cubes of 1 cm (purple). Subfigures A' and B' represent the same data on a semi-log scale.

less clear, for the 0.5 cm *SE* cubes after about 1.5 h, and such phenomenon was far from being reached for the 1 cm *SE* cubes. The most surprising result is that the final volume of titrant added was more important for the 0.5 cm *SE* cubes than for the grinded matrix. The volume of titrant added after 2 h of intestinal digestion for the 1 cm *SE* cubes was still increasing so that it is difficult to know whether it would have ended up to an even higher extent. Similar observations can be made with the *SCP* matrices that reflects proteolysis kinetics only (Fig. 3.2B and B'), except that real plateau values were reached, and in slightly shorter delays than with the *SE* matrices. These results confirm that the shape of titration curves in Fig. 3.2A were largely dominated by proteolysis reactions, which were therefore ongoing much faster than lipolysis (Mat *et al.*, 2016).

Visual observations made during digestions support the above conclusions. Only the grinded *SE* gels completely disappeared by the end of the intestinal phase. 0.5 cm *SE* cubes

had lost about half of their initial size and showed edge-rounded cubic shapes, and although 1 cm *SE* cubes were smoothed also, they were barely reduced in size. In the case of *SCP*, the disintegration process seemed to be more rapid with 1 cm cubes being nearly intact as well, but with 0.5 cm cubes almost completely disappeared visually.

From this first set of experiments, there is no doubt that proteolysis is largely dependent on the particle size, and that their disintegration process resembles to an erosion mechanism probably led by the slow diffusion of proteases into the protein network. Besides, the interfacial process of lipolysis is classically a slower process than proteolysis in liquid foods. In solid particles entrapping oil droplets, pancreatic lipase and its colipase must first gain access inside the protein network to reach their substrates. The same apply for bile salts that may help the enzyme action and the evacuation of lipolysis products from the droplet interface. If their capacity to diffuse within the matrix is limited, they might only gain access to oil droplets that are progressively released into the surrounding during the course of particles disintegration, a mechanism that would further slowdown the overall lipolysis kinetics. Nevertheless, the visual observations that disappearance of food particles was slower when oil was present might also be the sign of a more complex interaction between lipolysis and proteolysis.

All these observations emphasize the recommendation of grinding solid food prior to *in vitro* digestion since it allows observing the reactions up to a plateau (*SCP*) or a pseudo-plateau (*SE*). However, given the variety of foods, reported swallowing behaviors, and the *in vivo* observations that big intact particles can reach the latter stages of digestion, the physiological reality might differ. Thus, the choice of using controlled particles of several millimeters in size might still be of interest to gain knowledge about the digestive fate of solid foods.

If a slower rate of hydrolysis can be easily explained by a smaller surface area developed by bigger fragments, it is not as simple to relate larger final volumes of added titrant with larger particles. As shown next, another phenomenon is indeed to be considered.

3.2 Impact of particle sizes on pH equilibrium between gastric and the intestinal phases

The gels investigated so far were formed at pH 6.3. However, this initial pH of particles was necessarily modified during the gastric phase, performed at pH 3. According to Minekus *et al.* (2014), the amount of acid/base to adjust the gastric/intestinal mixtures at the proper pH (3 and 7, respectively) has to be determined in advance for the food under investigation since it

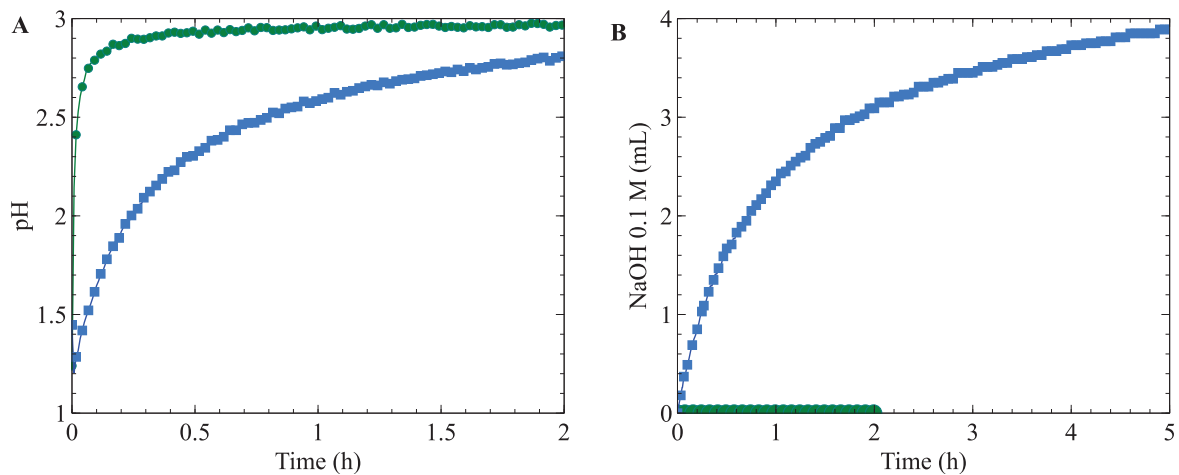


Figure 3.3 – (A) pH evolution during the gastric phase with no enzymes added the grinded *SCP* matrix (green) and the 0.5 cm *SCP* cubes (blue). (B) Evolution of titrant volumes measured by pH-stat titration during a subsequent intestinal phase with no enzymes added.

is governed by the matrix buffering capacity. When food particles are under investigation, as in the present study, one needs to ensure that pH is well equilibrated. This emphasizes the need to gain insight into the effect of the matrix, or its size, on pH adjustment itself. This is a critical issue when performing pH-stat measurements, as controlled pH is a prerequisite for proper determinations of degrees of hydrolysis (DH).

Figure 3.3A presents the pH evolution of the milieu during a gastric phase with no added pepsin for the 0.5 cm *SCP* cubes and the grinded *SCP*. It only took few minutes for the grinded gel to reach a pH close to 3, before it completely stabilized. In comparison, 2 h were not enough for the 0.5 cm *SCP* cubes to reach a pH stabilized close to 3 in the same experimental conditions. Figure 3.3B shows the results of pH-stat titrations during subsequent intestinal phases with no added enzymes. For the grinded matrix, there were no added titrant, meaning that these particles were small enough to avoid pH issues at the beginning of the intestinal phase. It should nevertheless be noticed that these grinded particles were very small since their mean size was of about 0.5 mm only (minimal Feret length). For 0.5 cm *SCP* cubes, which are only 10 times larger, considerable volumes of NaOH solution were added: 3.1 mL after 2 h, and almost 4 mL after 5 h. An overnight experiment showed that 14 h was actually needed to reach a complete pH equilibrium (data not shown).

These results demonstrate that protons entrapped within food particles during the gastric phase can be released at very slow rate during the intestinal phase of digestion with particles of few millimeter in size only. A waiting time for the food to soak in the milieu before adding the enzymes might be enough to reach pH equilibrium for some solid food particles. For

example 5 min for 0.5 cm sweet potato cubes seem to be sufficient to reach pH equilibrium (Drechsler and Ferrua, 2016). However, our present findings show this might prove difficult for matrices with higher buffering capacities. Being aware of this phenomenon might also be of particular interest when comparing matrices of different structures, or different types of food, which are susceptible to show different buffering capacities (Mennah-Govela *et al.*, 2015). When occurring, such effects indeed lead to unwanted pH variations, with important possible consequences in terms of enzyme activities during static *in vitro* gastro-intestinal digestions.

As a matter of course, this is even more critical when pH-stat is used to monitor the intestinal phase of digestion since a pH out of equilibrium should lead to an over-titration. These experiments were also designed to show, and estimate, the importance of this 'proton sponge' effect in our conditions. According to our results, 7.0 mL and 3.1 mL were added for the 0.5 cm *SCP* cubes during the regular digestion protocol and during the corresponding no-enzyme experiments, respectively. The difference of 3.9 mL is close to the volume added for the *SCP* grinded gel digested using the regular protocol (4.3 mL), indicating that the contribution of this effect was considerable in our first set of experiments. The small difference between the calculated 3.9 mL and the measured 4.3 mL might have arisen from the establishment of slightly different pH gradients within the cubes in presence and in absence of pepsin during the gastric phase.

3.3 Intestinal digestion of the matrices adjusted at pH 7

In order to validate the above described mechanism and properly estimate the kinetics of proteolysis, SE_{pH7} and SCP_{pH7} matrices were prepared and digested for 2.5 h for grinded and 0.5 cm cubes, and up to visual disappearance for the 1 cm cubes. Moreover, only the intestinal phase of digestion was performed in this set of experiments to avoid pH issues related to a preceding gastric phase. Figure 3.4 shows the results on both linear and semi-log scales for the 3 particle sizes, as expressed in titrant volumes (mL) for SE_{pH7} (Fig. 3.4A and A'), and in DH (%) for SCP_{pH7} (Fig. 3.4B and B') according to Eq. 3.1. Degrees of lipolysis were also determined (Fig. 3.4C and C') by considering in Eq. 3.2 the difference between the volumes of titrant between the SE_{pH7} (accounting for both lipolysis and proteolysis) and SCP_{pH7} matrices (accounting for proteolysis only). DH values obtained after 2.5 h of intestinal digestion for both lipids and proteins are also summarized in Table 3.2.

Proteolysis and particle size: As expected with this experimental approach, protein hy-

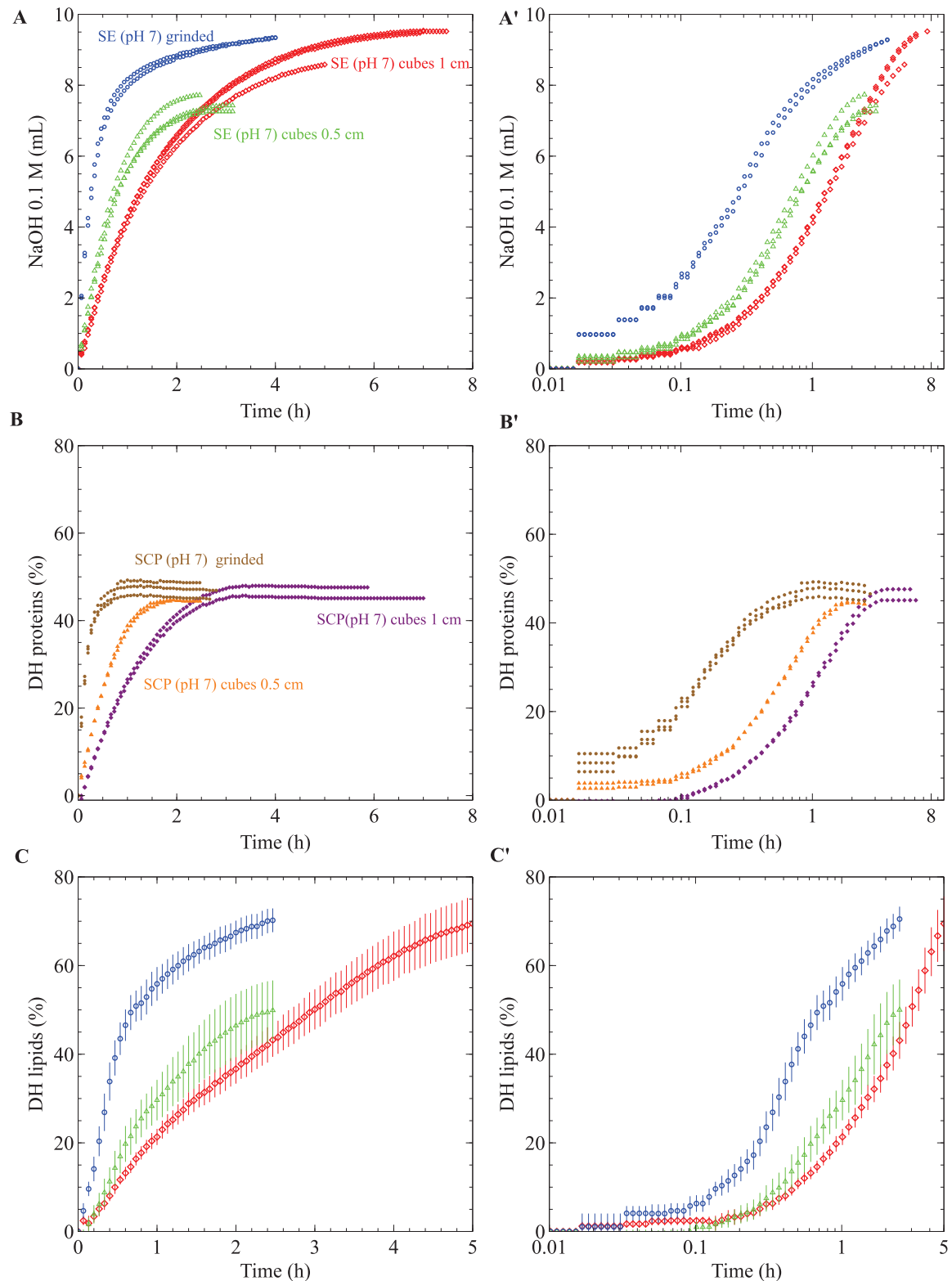


Figure 3.4 – Influence of solid emulsion fragment sizes (at pH 7.0) on the hydrolysis kinetics monitored by pH-stat during their intestinal digestion (with no preceding gastric phase) for: (A) The solid emulsion (SE_{pH7}) when grinded (blue), and cut into cubes of 0.5 cm (green) or cubes of 1 cm (red). (B) The degree of proteolysis of solid continuous phase (SCP_{pH7}) when grinded (brown), and cut into cubes of 0.5 cm (orange) or cubes of 1 cm (purple). (C) The degree of lipolysis of the solid emulsion (SE_{pH7}). Subfigures A', B' and C' represent the same data on a semi-log scale.

Table 3.2 – Degrees of hydrolysis at different times of intestinal digestions estimated from pH-stat measurements on the matrices prepared at pH 7.0 (mean values \pm SD over 3 repetitions). K (h^{-1}) are the rate constant of the proteolysis kinetics as estimated with the SCP_{pH7} matrices. The total surface area developed by 5 g of the studied matrices is indicated.

Matrix (Surface area, cm^2)	K proteolysis (h^{-1})	Time (h)	Degree of proteolysis (%)	Degree of lipolysis (%)
grinded matrix (183.7)	6.14	2.5	47.0 ± 2.3	70.6 ± 2.8
0.5 cm cubes (48)	1.72	2.5	42.5 ± 3.7	50.0 ± 6.9
1 cm cubes (24)	0.56	2.5 5	44.6 ± 2.0 48.3 ± 2.4	43.3 ± 3.6 69.5 ± 6.1

drolysis ended to real plateaus and at similar DH values whatever the initial particle size (Fig. 3.4B and B'). As previously observed, plateau values were reach earlier for smaller particles: at about 1 h for grinded SCP_{pH7} , 2 h for 0.5 cm SCP_{pH7} cubes, and 3.5 h for 1 cm SCP_{pH7} cubes, hence confirming that the bigger the particle, the slower protein hydrolysis kinetics. The observation that plateau values were similar in all experiments, with DH close to 45 % (Table 3.2), shows that particle size had no effect on the final extent of intestinal proteolysis. It induced kinetic effects, only. The present results also confirm that over-titration due to a pH disequilibrium effectively took place in the previous set of experiments of the present paper. We may add that we previously reported a larger final degree of proteolysis, around 80 %, for grinded particles of comparable gels (with sizes ranging from 2 to 5 mm) in another study (Mat *et al.*, 2016). According to the present findings, it is therefore probable that pH-stat over-titration did take place during the corresponding experiments, hence illustrating the importance of being very cautious when adjusting the pH of the intestinal phase on food particles.

As an additional analysis, results plotted in Fig. 3.4B were also fitted with a first order function to estimate the proteolysis rate constants:

$$DH = DH_{max} \times (1 - e^{-Kt}) \quad (3.3)$$

where DH_{max} (in %) corresponds to the horizontal asymptote of the curve and K (in h^{-1}) is the rate of the reaction. Estimated K values are gathered in Table 3.2 together with the surface area developed by each particle sizes (in cm^2). In accordance with visual observation of the curves, a linear correlation ($R^2 = 0.996$) was found between these two quantities, meaning that proteolysis rate constant of SCP_{pH7} was essentially proportional to the surface area developed by the particle, and hence inversely related with particle sizes.

Lipolysis and particle sizes: Lipolysis kinetics should be analyzed with caution since they were estimated from the difference between two matrices that vary in composition: SE_{pH7} and SCP_{pH7} . Nevertheless, results of Fig. 3.4C and C' clearly show that the larger the particle, the slower the lipolysis, as observed for proteolysis. There was sharp increase of lipolysis for grinded SE_{pH7} during the first 0.6 h, before the reaction kinetics seemed to slow down. This apparent slowdown of the reaction corresponds well with the visual observation that most of the smallest particles disappeared by that time. For the cubic pieces, the initial rise was much slower with no clear discontinuities in the overall kinetics. These results highlight that oil was more readily accessible with the grinded matrix than with cubes.

Interaction between lipolysis and proteolysis: For the grinded emulsions, the ongoing proteolysis presumably released rapidly the entrapped oil droplets, rendering them accessible for lipolysis. After about 0.6 h, the titration corresponds mainly to the lipolysis of released oil droplets and of the destabilized fraction formed upon grinding. Moreover, oil-in-water emulsions stabilized by whey proteins have been reported to be prone to coalescence during the intestinal phase of *in vitro* digestion (Li *et al.*, 2013; Mun *et al.*, 2007; Sarkar *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009), which may lead to a dramatic slowdown of the lipolysis rate (Giang *et al.*, 2015). The reduction of the lipolysis kinetics at about 0.6 h for grinded particles may therefore result from the destabilization of the oil droplets released from gel particles. For cubes, the proteolysis reaction was much slower so that lipases most certainly got access to oil droplets more progressively. A faster rate of lipolysis was observed with the 0.5 cm cubes compared to the 1 cm cubes, but the difference was much less marked than for proteolysis. Moreover, the final extent of lipolysis after visual disappearance of the matrices (at about 2.5 h and 5 h for 0.5 cm and 1 cm SE_{pH7} cubes, respectively) was significantly smaller for the 0.5 cm cubes. It is therefore probable that the phenomenon described for grinded particles also took place for the 0.5 cm cubes: release and destabilization of oil droplets in the digestive milieu that slowdown the lipolysis kinetics. For 1 cm cubes, the much slower proteolysis kinetics may have led to a much slower release of entrapped oil droplets, which could therefore be hydrolyzed to greater extents before having a chance to enter in contact with other droplets. In other words, the effect of particle size on lipolysis kinetics would be the result of a kinetic competition between the release of oil droplets, governed by the proteolysis kinetics, the destabilization of released oil droplets (probably coalescence), and the pancreatic lipolysis rate.

Digestions coupled with confocal microscopy: Confocal microscopic observations were performed on 0.5 and 1 cm SE_{pH7} cubes during separated *in vitro* digestions. This experiment was designed to gain insight into the microscopic changes occurring during particle disintegration. Figure 3.5 shows microscopic images taken at different digestion times: 30 and 90 min for 0.5 cm cubes, and after 30 min for 1 cm cubes. Mosaic composition with a focus on the surface of the cubes gives an illustration of the ongoing process. These observations show that extended erosion happened at the cube surface, which led to important oil leakage. Some oil cavities were found empty meaning that some oil droplets were released from the protein network. Interestingly, close to the surface of the cubes, a certain amount of oil droplets was coalesced even though they were still entrapped within the network. This is something that was not observed in the matrix in its initial state (Mat *et al.*, 2016). This lipid layer certainly slows down the diffusion of proteases towards the inner part of the particles, and may explain why disappearance of the cubes was longer to achieve for SE than SCP matrices, *i.e.* an antagonist effect of lipid destabilization on proteolysis. These observations are also consistent with the above interpretation on the interaction between proteolysis and lipolysis, but further show that oil droplets do not necessarily need to be released in the surrounding to coalesce.

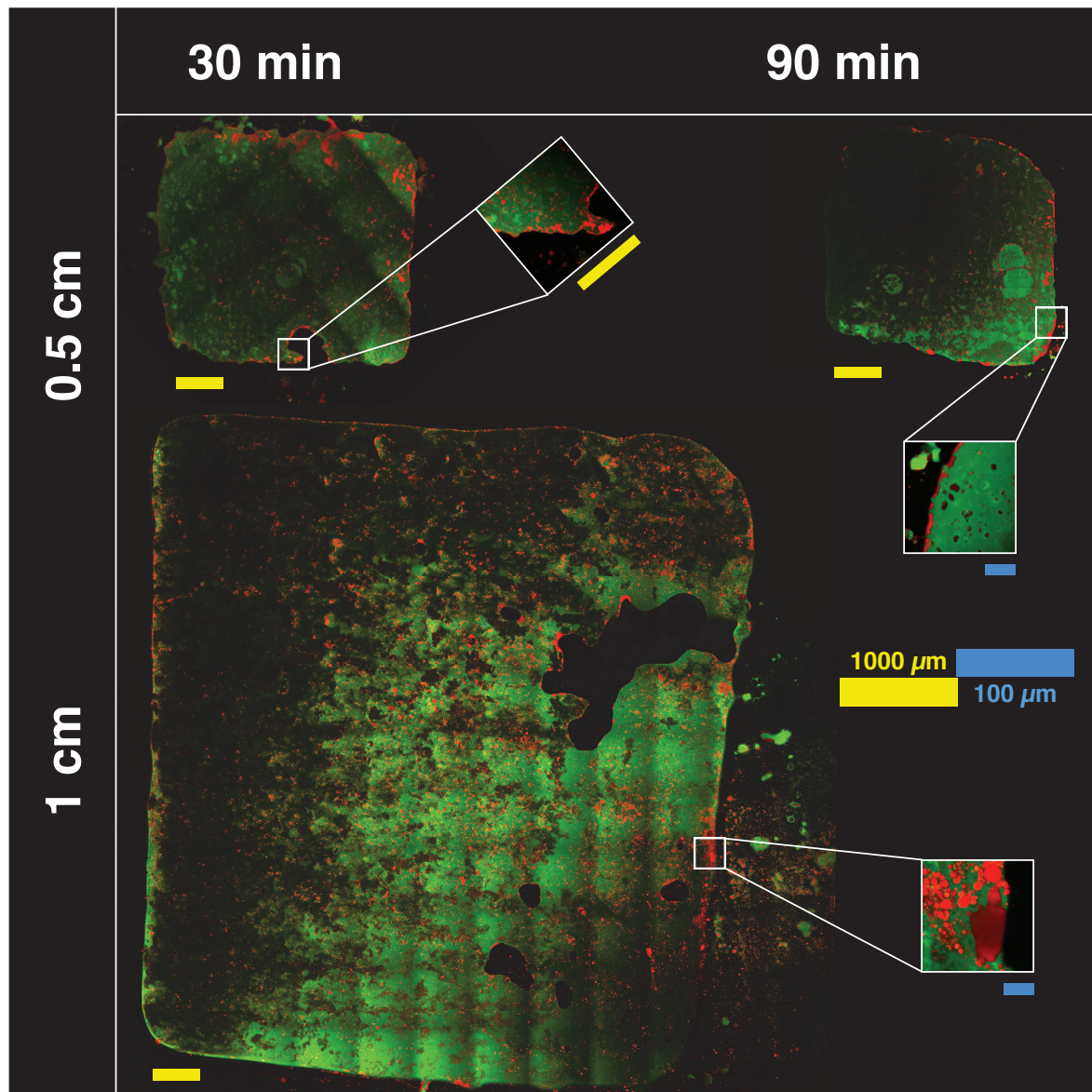


Figure 3.5 – Confocal microscopy observations for the 0.5 cm and 1 cm SE_{pH7} cubes after incubation in a simulated intestinal fluid for 30 or 90 min. Implantation of oil droplets (red), and their degree of coalescence, is visible in the protein network (green).

4 Conclusions

This study focused on the pH-stat monitoring of *in vitro* digestion of solid emulsions, made of both lipids and proteins, and more particularly on the effect of the bolus particle size. An important ‘proton sponge’ effect was highlighted between the gastric and the intestinal phase. Increasing the size of the food particles increased this phenomenon, which led to an over-titration by pH-stat during the intestinal phase. These results demonstrate that one should be very cautious when willing to study *in vitro* digestion of solid particles, especially when pH-stat titration is to be used. By studying the intestinal digestion of similar matrices, but prepared at pH 7.0 to avoid pH issues, the kinetics of the intestinal proteolysis were found

proportional to the surface area developed by the particles, but the final degree of proteolysis was unaffected by particle size. The initial rate of the lipolysis kinetics were also slower for larger particles, but the faster disintegration of small particles seemed to promote the release of entrapped oil droplets and the further occurrence coalescence, which significantly reduced the lipolysis kinetics. Large particles, which disintegrate more slowly, were therefore associated with greater extent of lipolysis when particles were visually entirely digested. These observations might be of physiological relevance when pieces of food of several millimeters in size arrive into the stomach or the intestine.

Our findings also bear consequences on how to properly perform *in vitro* static digestions of solid foods. Grinding the matrices into very small particles (0.5 mm in the present study) was shown to be an efficient way to avoid the ‘proton sponge’ effect. According to the considerable pH issues we obtained with cubes of 0.5 cm, *i.e.* only 10 times larger than the grinded particles, great care should be taken when reducing solid food into particles prior to *in vitro* gastro-intestinal digestion. A preliminary soaking delay before launching the intestinal phase can be a wise idea, especially when willing to perform pH-stat titration.

Acknowledgments

This work received support from the French National Research Agency under the "Investissements d’Avenir" program (reference No. ANR-11-IDEX-0003-02). The author would like to thank Gabrielle Moulin (UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 91300, Massy, France) for her guidance over the confocal microscopy.

À retenir

L'objectif de cette étude portait en premier lieu sur l'effet de taille des fragments de l'émulsion solide sur la cinétique d'hydrolyse des nutriments. La méthode de digestion statique avec suivi par pH-stat mis au point dans le chapitre précédent a ainsi été appliqué à 3 tailles de morceaux. Un fort effet ralentissant des hydrolyses a été observé avec des tailles croissantes. Cependant il doit être nuancé. En effet on observe durant la phase intestinale un important relargage de protons, d'autant plus grand si les tailles sont grandes. Ces protons ont pour origine le milieu acide de la phase gastrique préliminaire et le déséquilibre de pH entre l'intérieur de la matrice (pH 6,3) et son milieu de digestion. La conduite du protocole de digestion avec pH-stat doit tenir compte de cette contribution dont le résultat est une surtitration en phase intestinale. La recommandation d'Infogest de hacher les aliments a effectivement permis de minimiser ces effets. Dans la seconde partie du travail expérimental les émulsions ont été ajustées à pH 7, le pH de consigne de la phase intestinale, et la phase gastrique n'était pas réalisée afin de n'observer que spécifiquement l'effet de la taille des fragments sur les hydrolyses. Leur influence était importante sur la protéolyse de la phase continue et par conséquent sur la lipolyse avec un ralentissement des réactions si la taille augmente, directement corrélée à la surface d'échange des fragments dans leur milieu. Même si l'utilisation de morceaux de telles tailles n'est pas conseillée pour la conduite du protocole pH-stat, il était intéressant d'aller étudier cet effet qui met en lumière des mécanismes qui peuvent très bien avoir une réalité physiologique et les points critiques de la conduite de protocole *in vitro* sur des matrices solides.

La titration par pH-stat pour suivre les cinétiques d'hydrolyse des protéines par la pepsine en conditions de pH statique et dynamique

Sommaire

Présentation de l'article	110
Abstract	111
1 Introduction	113
2 Theoretical considerations	115
3 Materials and method	117
3.1 Materials	117
3.2 Model food	117
3.3 Gastric <i>in vitro</i> digestions	118
3.3.1 Static pH conditions (pH = 3)	119
3.3.2 Dynamic pH conditions (from pH 6.3 down to 2)	119
3.4 Buffering capacity and treatment of data obtained in dynamic pH conditions	120
3.5 Degree of hydrolysis measured by the OPA method	120
4 Results and discussion	121
4.1 Gastric digestions in static pH conditions (pH = 3)	121
4.2 Gastric digestions in dynamic pH conditions (from pH 6.3 down to 2)	123
4.2.1 Titration curves	123
4.2.2 Buffering capacities and acid-base equilibrium of the peptide's Cterm carboxylic groups	125
4.2.3 Evolution of DH during both types of <i>in vitro</i> gastric digestions	126
5 Conclusions	130
Acknowledgments	130
À retenir	131

Présentation de l'article

Dans le travail expérimental présenté dans les articles précédents le pH-stat a été utilisé pour suivre les réactions d'hydrolyse durant la phase intestinale de digestions *in vitro*. Si une majorité d'études *in vitro* se focalisent sur la phase intestinale, la prise en compte de la phase gastrique ne devrait pas être négligée dans un protocole le plus complet possible, comme le souligne [Minekus *et al.* \(2014\)](#). Lors de la phase gastrique, l'environnement de la matrice alimentaire change drastiquement, avec un apport d'enzymes particulières (pepsine et lipase gastrique). Si l'action de ces enzymes n'est pas majoritaire par rapport à celles de la phase intestinale, elle n'est pas négligeable vis-à-vis de l'hydrolyse mais aussi, et surtout, vis-à-vis de l'évolution de la structure de la matrice. Par exemple, dans le cas des émulsions, l'interface huile/eau peut être modifiée dès la phase gastrique ce qui peut impacter fortement leur stabilité avant même la phase intestinale.

Ce troisième article a pour principal objectif d'adapter la titration par pH-stat au suivi de la dégradation des protéines par la pepsine durant la phase gastrique. En effet, les équilibres acide-base des fonctions carboxyliques et amines portées par les carbones et azotes terminaux des peptides produits semble indiquer qu'à pH acide les carboxyles tendent à conserver leur proton pendant que les amines en consomment un. La titration par un acide, typiquement HCl, devait donc être possible. Le travail présenté ici a été réalisé sur l'émulsion liquide pour éviter les soucis potentiels liés aux émulsions solides qui ont été exposés dans le chapitre précédent. Dans un premier temps, une titration a été menée à pH constant ($pH = 3$) de façon très similaire au pH-stat des phases intestinales afin de vérifier la pertinence de nos hypothèses. Dans un second temps, le titrateur a été programmé pour induire une diminution progressive du pH : depuis le pH natif de la matrice (6.3) jusqu'à $pH = 2$ en environ 1 h, suivi d'un maintien à $pH = 2$ pour atteindre 2 h de digestion gastrique. Ce deuxième protocole permet de se rapprocher de la réalité physiologique.

Les résultats de ces deux expériences ont été regroupés et présentés dans un projet d'article à soumettre au journal *Food & Function*.

Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: *In vitro* gastric digestions in static and dynamic pH conditions

Damien J.L. Mat^{a,b}, Thomas Cattenoz^a, Isabelle Souchon^a, Camille Michon^b, Steven Le Feunteun^{a,*}

^a UMR GMPA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78850, Thiverval-Grignon, France

^b UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 91300, Massy, France

* Corresponding author : steven.le-feunteun@inra.fr

Abstract

The pH-stat technique is very popular to assess the kinetics of lipid or protein hydrolysis during *in vitro* intestinal digestions, *i.e.* around pH 7. The main objective of this study was to demonstrate that pH-stat is also very well adapted to the monitoring of pepsin hydrolysis during *in vitro* gastric digestions, *i.e.* at acidic pH. An oil-in-water emulsion containing 10 wt% oil and 15 wt% whey proteins, used as a model of complex foods, was submitted to 2 different protocols of simulated gastric digestion. In a first part, pH-stat experiments were conducted at a constant pH of 3 to show that protein hydrolysis by pepsin can be adequately monitored in the gastric conditions recommended in the recently proposed standardized static *in vitro* digestion protocol. In a second part, the pH-stat device was used to run gastric digestion in dynamic pH conditions, *i.e.* with a progressive acidification of the medium (from pH 6.3 down to 2 in 1h), which better mimics the physiological reality of the stomach. Such experiment was also run before (with no pepsin) and after (with a pepsin inhibitor) pepsin digestion to estimate the buffering capacity of the neo-formed peptides from the ones measured on the undigested and digested model foods. Results suggest that the mean pK_A of peptide's Cterm carboxylic groups was of about 4.16, with about 95 % of the peptides detected at $pH = 3$, and 100 % for $pH \leq 2.5$. The evolution of pepsin activity was assessed quantitatively in all experiments based on these results through the calculation of degrees of hydrolysis (DH). Although the time evolution of DH was different in static and dynamic pH conditions, they ended to a similar extent after 2 h of digestion (about 3 %), a conclusion that was validated using the ortho-phthalaldehyde (OPA) method. Overall, the pH-stat method proved to be very worthy to study pepsin hydrolysis of proteins during *in vitro* gastric digestion in both static and dynamic pH conditions.

Highlights

- pH-stat was experimented in simulated gastric conditions to monitor pepsinolysis of complex matrices.
- It was successfully performed on food matrices containing whey proteins.
- Titration was also performed to proceed to digestions in acidifying conditions closer to physiological conditions.
- Both methods gave about 3 % degree of hydrolysis after 2 h and are found accurate and reproducible.

Keywords

In vitro gastric digestion; Pepsin; Proteolysis; pH-stat; Emulsion-type food models

1 Introduction

Stomach is the first compartment of the digestive tract after food has been swallowed. During the gastric phase of digestion, the food is mixed with fluids that dramatically lowers its pH to about 2-3 in 1 to 2 h thanks to the HCl production of lining cells (Dressman, 1986; Malagelada *et al.*, 1979). Enzymes are also secreted, notably pepsin and gastric lipase, initiating the hydrolysis of proteins and lipids, respectively. Hydrolysis in the stomach is relatively limited (to around 10 %) (Griffiths, 2012; Norton *et al.*, 2014) but is of particular interest to understand the effects of food properties on its enzymatic degradation kinetics and possible consequences on gastric emptying. At the end of the gastric phase, the resulting mixture, the chyme, is transiting to the intestinal compartment, where nutrients are further hydrolyzed and absorbed.

In the field of food sciences, *in vitro* digestion experiments constitute a powerful means to investigate the effects of food composition and structure on digestion, which is triggered by the growing interest of designing foods with particular nutritive properties (Golding and Wooster, 2010; Guerra *et al.*, 2012; Ménard *et al.*, 2014; Wickham *et al.*, 2009). They are used for a great number of research purposes, such as the modulation of lipid digestion of emulsions by varying their chemical-physics properties (Singh *et al.*, 2009), the quality of infant formulas for efficient delivery of hypoallergenic proteins (Guo *et al.*, 1995), the comparative rate of digestion of proteins of interest (Luo *et al.*, 2015), etc. *In vitro* experiments present the great advantage of being a relatively fast and inexpensive way to study food digestion, and allow to avoid, or at least to back up, *in vivo* studies, which are impaired with high cost, complexity, time consumption and variability (inter and intra individual).

In vitro digestion protocols mostly fall into two categories (Guerra *et al.*, 2012). On the one hand, dynamic protocols try to mimic at the most the different compartments of the human digestive tract: physical, chemical and mechanical transformations of the food are simulated by dynamically controlled transit fluxes, pH, and/or digestive fluid secretions. On the other hand, mono-compartmental static models offer simplicity, which explains a more widespread use. They generally immerse the food in a medium containing simulated digestive fluids to perform gastric and/or intestinal digestion. Moreover, to overcome the lack of homogeneity in the protocols, an harmonized static protocol was recently proposed, based on a consensus of international experts (Minekus *et al.*, 2014).

Besides, the pH-stat titration is probably the most commonly employed method to monitor hydrolysis reactions, and therefore appears as a highly complementary approach to *in vitro* digestion experiments. It is based on the fact that in adequate pH conditions, nutrient

hydrolysis leads to pH modifications of the medium. In response, an automatic addition of an acidic or basic solution maintains the pH constant, so that the titration rate is proportional to the reaction rate. The quantity of titrant added can be converted into a degree of hydrolysis of the considered nutrient. Overall, pH-stat is a simple, fast, reproducible, and nondestructive way to investigate the kinetics of enzymatic digestion of foods. In this field of research, this method is very popular to monitor lipolysis reactions during a simulated intestinal digestion at *pH* 7 or above, during which a base is used to titrate the protons released by the fatty acids produced (McClements and Li, 2010b; Williams *et al.*, 2012; Wooster *et al.*, 2014). In such pH conditions, it is also possible to follow kinetics of protein hydrolysis (Asselin *et al.*, 1989; Camacho *et al.*, 2001; Spellman *et al.*, 2003; Turgeon *et al.*, 1991), hence enabling intestinal proteolysis kinetics to be characterized as well.

In a previous study (Mat *et al.*, 2016), we showed that pH-stat titration can indeed be used during the intestinal phase of *in vitro* digestion to continuously monitor both the lipolysis and proteolysis kinetics of a model of complex foods. The approach proved efficient at exploring the influence of food structure on its intestinal *in vitro* digestion kinetics, which may be of use for a rapid screening of food compositional and/or structural effects on digestion. Although it is theoretically possible to follow proteolysis in such acidic conditions, no studies could be found that resort to pH-stat experiments during the course of gastric digestion experiments. Indeed, at low pH, the amino groups produced during the hydrolysis of a peptide bond consume a proton, rendering titration by an acidic titrant (typically HCl) feasible (Nielsen, 1997). Associating pH-stat titration during the gastric phase of *in vitro* digestion might prove useful in the ongoing effort to gain knowledge on the effects of food properties on the gastric phase of digestion. In fact, it is even surprising that almost no study resorts to pH-stat monitoring of the pepsin activity when considering the great number of articles that investigate the effects of food structure on gastric digestion, and the popularity of the pH-stat technique for the intestinal phase.

The aim of this study is to demonstrate that pepsin proteolysis can be easily and accurately monitored by pH-stat during the course of *in vitro* gastric digestions of an emulsion-type food model made of 15 wt% whey proteins and 10 wt% of oil, which constitutes a good model of complex food matrices. Two different protocols of *in vitro* gastric digestions were investigated. The first corresponds to the gastric phase of the recently proposed harmonized static *in vitro* digestion protocol (Minekus *et al.*, 2014), during which the pH was maintained constant at 3 for 2 h. The second protocol was designed to achieve a controlled acidifying kinetics, from the native pH of the food to *pH* 2 in about 1 h, before maintaining the medium

at pH 2. This latter constitutes a proposal to go beyond purely static digestions, and advance towards dynamic pH conditions of digestion, more in line with the physiologic reality. For both types of experiment, it is shown how to convert titrant volumes into degrees of hydrolysis, with a validation of our results according to independent measurements using the ortho-phthalaldehyde (OPA) method.

2 Theoretical considerations

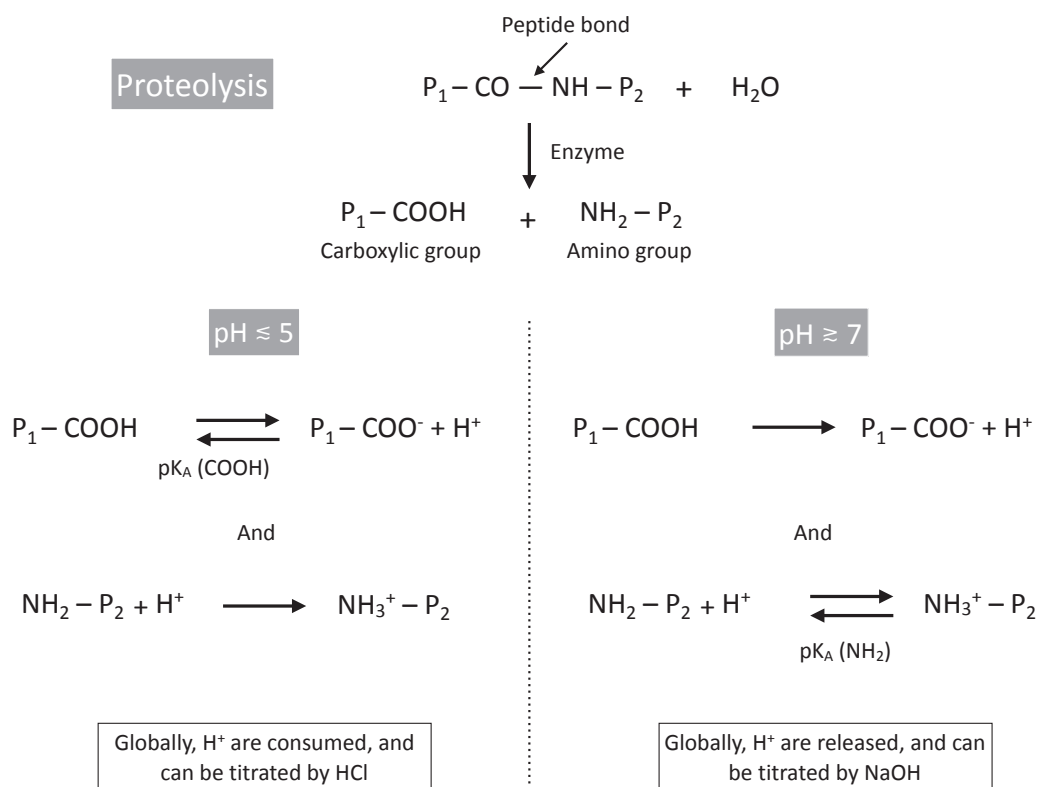


Figure 4.1 – Schematic representation of protein hydrolysis by a protease, and of the principles of pH -stat titration at $pH \gtrsim 7$ and $pH \lesssim 5$.

Fig. 4.1 shows the protein hydrolysis reaction and schematically illustrates the principles of the pH -stat titration method at both $pH \gtrsim 7$ and $pH \lesssim 5$. Although no experiment was performed at neutral or basic pH in the present study, it is worth reminding the principles of pH -stat titration in such conditions to draw a parallel with the principles of acid titration of proteolysis at acidic pH .

pH-stat titration at $pH \gtrsim 7$: As illustrated in Fig. 1, during the hydrolysis of a peptide bond, one carboxylic group ($-\text{COOH}$) is produced along with one amino group ($-\text{NH}_2$), at the Cterm and Nterm of the two peptides produced, respectively. At neutral or basic

pH, the neo-formed carboxylic groups release their proton, which may therefore be titrated by a basic solution (NaOH typically). However, most of the coproduced amino groups also consume a proton to form ammonium groups at neutral pH, hence counteracting the majority of protons released by the carboxylic groups. To convert the volumes of basic titrant into degrees of hydrolysis (DH in %) of proteins, which represent the percentages of hydrolyzed peptide bonds, one therefore need to take the mean degree of dissociation of amino groups at the pH considered, α_{NH_2} , into account according to the following equation (Spellman *et al.*, 2003; Turgeon *et al.*, 1991):

$$DH = 100 \times \frac{V \times N}{m \times h_{tot}} \times \frac{1}{\alpha_{\text{NH}_2}} \quad (4.1)$$

where V is the volume of titrant (mL), N its normality (eq/mL), m is the protein mass (g), and h_{tot} is the number of peptide bonds per gram of proteins (8.8×10^{-3} eqv/g in whey proteins, according to Spellman *et al.* (2003)).

Besides, it can be demonstrated that α_{RNH_2} can be estimated from the pK_A of the amino groups through (Adler-Nissen *et al.*, 1983):

$$\alpha_{\text{NH}_2} = \frac{10^{pH-pK_A(\text{NH}_2)}}{1 + 10^{pH-pK_A(\text{NH}_2)}} \quad (4.2)$$

pH-stat titration at pH $\lesssim 5$: In acidic conditions, the chemical equilibria are reversed. The acid/base equilibrium of the amino groups is entirely in favor of the protonated form ($-\text{NH}_3^+$). One proton is thus consumed for each hydrolyzed peptide bond, and may therefore be titrate by an acid solution, HCl typically. Meanwhile, the co-produced carboxylic groups are in equilibrium between the deprotonated form, which released proton counteracts the one consumed by the amino group, and the protonated form, which has no pH consequences. Thus, at acidic pH, one should take into account the mean degree of association of the carboxyl groups, $1 - \alpha_{\text{COOH}}$, to convert volumes of acid titrant into DH:

$$DH = 100 \times \frac{V \times N}{m \times h_{tot}} \times \frac{1}{1 - \alpha_{\text{COOH}}} \quad (4.3)$$

with α_{COOH} , the mean degree of dissociation of the carboxylic groups produced, which can also be estimated through:

$$\alpha_{\text{COOH}} = \frac{10^{pH-pK_A(\text{COOH})}}{1 + 10^{pH-pK_A(\text{COOH})}} \quad (4.4)$$

Acid titration during an acidifying kinetics: If Eq. 4.3 can be used to estimate degrees of hydrolysis when pH is maintained constant by acid titration, the situation is slightly different during the course of an acidification because most of the acid added is used to counteract the buffering capacity of the sample. The easiest way to take into account this buffering effect is to run a blank experiment (with no enzyme), so that the enzyme activity is related to the difference between the volumes of acid added in presence and in absence of enzyme. With such an experimental strategy, Eq. 4.3 becomes:

$$DH = 100 \times \frac{(V_{DD}(pH) - (V_{BD}(pH))) \times N}{m \times h_{tot}} \times \frac{1}{1 - \alpha_{COOH}} \quad (4.5)$$

with $V_{DD}(pH)$ and $V_{BD}(pH)$ the volumes of acid added (mL) as a function of pH during digestion (DD) and before digestion (BD), *i.e.* in presence and absence of the proteolytic enzyme, respectively. It is indeed noteworthy that V_{DD} , V_{BD} and α_{COOH} all vary with pH, and that the subtraction between V_{DD} and V_{BD} is only valid for identical pH values, not time. To determine the evolution of DH with time, one therefore needs to interpolate V_{DD} and V_{BD} at identical pH values to solve Eq. 4.5, before analyzing the results as a function of the corresponding times in the DD experiments. As a matter of course, one also needs to estimate the values taken by α_{COOH} as a function of pH to solve Eq. 4.3 and Eq. 4.5. Such data will be presented as a part of the results and discussion section.

3 Materials and method

3.1 Materials

Whey protein isolate (WPI) powder, branded as Prolacta 95 (95 wt% on dry powder), was purchased from Lactalis, France. Rapeseed oil (Fleur de colza, Lesieur, France) was bought at a local supermarket. Porcine pepsin (P6887) and pepstatin (P5318), were obtained from Sigma-Aldrich, France. The pepsin enzymatic activity was determined according to the assay described in Minekus *et al.* (2014). Water was Milli-Q water and all other materials were of standard analytical grade.

3.2 Model food

An oil-in-water liquid emulsion-type model food containing 15 wt% of whey proteins and 10 wt% of rapeseed oil was prepared. It was chosen for comparison purposes with our

previous study (Mat *et al.*, 2016), and because it can be considered as an interesting model of complex foods. It was prepared in a semi-industrial way as follows. WPI was dispersed in water with a powder/liquid mixer (CMS 2000 module, IKA, Germany) connected to a 30 L vessel in a recirculating arrangement. Proteins were allowed rehydrating for 1 h at the minimal circulation speed to avoid heating. Then, oil was poured into the vessel and the rotation speed of the mixer was adjusted to 4,770 rpm to create enough shear to prepare a coarse emulsion. After a 15 min interval (to reach a steady state regime), the emulsion was progressively collected and further refined in a two-stage high pressure homogenizer (NS2002H, GEA Niro Soavi Laboratory, Italy), operating at 400 and 100 bar in the first and second stages, respectively. Collected fractions, made of 15 wt% proteins and 10 wt% oil, were then stored at -80 °C and freeze-dried (Lyofal, France). The dried emulsion was rehydrated on the day of the *in vitro* experiments to recover the native emulsion composition.

The oil droplet size distribution of the emulsions was controlled at each step of their preparation using a laser light scattering particle size analyzer (Mastersizer 2000, Malvern, France) using 1.47 as the refractive index of the oil, 1.33 as the refractive index of the dispersant (water) and 0.001 as the absorption value of the emulsion. Repeatability of the droplets sizes after rehydration of the emulsion prior to digestion was ensured. Sizes were centered around a major mode at 3.8 μm , with two minor modes at 0.2 and 50 μm .

3.3 Gastric *in vitro* digestions

Gastric *in vitro* digestion experiments were carried out in 50 mL Schott bottles immersed in a jacketed beaker filled with water that was maintained at 37 °C by heat water circulation in the double wall. The whole set was mounted on a magnetic stirrer operating at 375 rpm, and was equipped with an automatic pH-stat titration unit (Titroline7000, VWR, France) using a data acquisition frequency of 1 s. The digestion protocol followed all the recommendations of Minekus and co-workers (Minekus *et al.*, 2014), except that NaHCO_3 salts were replaced by NaCl in the electrolyte solutions to avoid possible pH variations induced by the degassing of CO_2 (Mat *et al.*, 2016). Briefly, based on a final digestion volume of 30 mL, 7.5 g of the model food was rehydrated and weighted in the bottle. 7.5 mL of simulated salivary fluid (with no amylase) and 13.5 mL of simulated gastric fluid (with no pepsin) were added and were let to equilibrate at 37 °C. As further detailed, the *in vitro* gastric digestion experiments were launched for 2 h according to either static or dynamic pH conditions. All measurements were made in triplicates.

3.3.1 Static pH conditions (pH = 3)

The pH of the reaction medium was first adjusted at 3.0 using a 1 N HCl solution, and the automatic titration unit was programmed in a pH-stat mode to maintain $pH = 3$ using a 0.05 N HCl as a titrant solution. The gastric digestion experiment was started by adding 1.5 mL of a pepsin solution to achieve a 2000 U/mL activity in the mixture and an initial gastric volume of 30 mL. Titration was immediately turned on. At the end of the experiment, a 200 μ L sample was collected for further analysis of the degree of hydrolysis using the OPA method.

3.3.2 Dynamic pH conditions (from pH 6.3 down to 2)

This second protocol was designed to mimic the progressive acidification of the stomach content that takes place *in vivo*, and to test whether pepsin activity could still be monitored by titrimetry with these more complex, but more realistic, operating conditions. To this end, the initial pH of the reaction medium, which was of 6.3, was not modified initially. The automatic titration unit was still programmed in a pH-stat mode but with a target pH of 2, a 1 N HCl titrant solution, and a flux of titrant of 0.031 mL/min down to $pH = 2$. The HCl concentration and the flux of titrant were both set according to preliminary tests so as to recover a pH decrease from 6.3 down to 2 in about 1 h of experiment, with a neither too small nor too large volume of added HCl (*i.e.* < 3 mL, corresponding to less than 10 % of the initial volume).

Three different sets of experiments were carried out with these acidifying conditions. In the first set (BD, referring to “Before Digestion”), 1.5 mL of water (no pepsin) was added before launching the titration experiment in order to determine the buffering capacity of the undigested test food. In the second set of experiment (DD, referring to “During Digestion”), 1.5 mL of pepsin solution to achieve a 2000 U/mL activity in the mixture (as for the “static” conditions), were added before starting the experiment. At the end of these experiments in presence of pepsin, 36.7 μ L of a 10 mM pepstatin solution (6.859 g/L) were added in order to ensure a total pepsin inhibition (Marciniszyn *et al.*, 1977; Umezawa, 1976), a 200 μ L sample was collected for further analysis of the degree of hydrolysis using the OPA method, and the pH was risen back to 6.3 with a 6 N NaOH solution (\sim 450 μ L). The pH-stat experiment was launched once again thereafter to determine the buffering capacity of the digested test food, hence constituting the third set of experiments (AD, referring to “After Digestion”). At the end of these last experiments, a 200 μ L sample was collected for further analysis of the degree of hydrolysis using the OPA method.

3.4 Buffering capacity and treatment of data obtained in dynamic pH conditions

Buffering capacity: The buffering capacity expresses the resistance of the studied medium to a pH change, and rises from the sum of all individual present acid-base groups. The buffering capacity of the undigested and digested model foods were calculated from the data collected during the dynamic pH digestions performed before (BD) and after (AD) pepsin digestion. The calculation was performed at each pH according to the relation (Salaün *et al.*, 2005; Whittier, 1929):

$$BC(pH) = \frac{dB}{dpH} = \frac{(\text{volume of acid added}) \times (\text{normality of the acid})}{(\text{volume of the sample}) \times (\text{pH change produced})} \quad (4.6)$$

with $BC(pH)$ the buffering capacity at a given pH, dB the increment of acid added, and dpH the associated pH shift.

Data treatment: All calculations were made using Matlab[™] software (The MathWorks Inc., Natick, USA) equipped with the Statistics Toolbox. The main steps of the data treatment procedure were as follows. The times, volumes and pH values recorded by the pH-stat device in dynamic pH conditions varied from one experiment to another. The corresponding volumes and pH values were first linearly interpolated from 0 to 120 min with a step of 1 min, using the `interp1` function, to enable the calculation of means and standard deviations as a function of time over the 3 replicates for each set of experiments. To calculate the buffering capacities of undigested and digested model foods, the data obtained during the BD and AD experiments were individually smoothed (linear function over 5 consecutive points) to recover strictly increasing volumes in all datasets. First order derivative values of volumes and pH were then obtained by applying the Savitsky-Golay algorithm (Savitzky and Golay, 1964) with a linear fit over 21 points, and used to solve Eq. 4.6, before calculating means and standard deviations. Times, volumes, and buffering capacity values of all experiments were then linearly interpolated, using the `interp1` function, to the mean pH values obtained for the set of experiment during digestion (DD). This last step was performed to enable solving Eq. 4.5 and plotting the results according to pH when needed.

3.5 Degree of hydrolysis measured by the OPA method

Degrees of hydrolysis (DH) of proteins were measured on the samples collected at the end of all gastric digestion experiments using the OPA (ortho-phthalaldehyde) method, according

to the protocol of Spellman and co-workers (Spellman *et al.*, 2003) with no addition of SDS. It consisted in measuring the absorbance at 340 nm of the complex formed between the amino groups of peptides and OPA in the presence of NAC (N-Acetyl-L-cysteine) with a UV-Vis spectrophotometer (Evolution 201, Thermo Scientific). The difference of absorbance, ΔAbs , between the hydrolyzed and unhydrolyzed samples therefore provides the number of amino groups produced during the proteolytic reaction (Church *et al.*, 1985), from which degrees of hydrolysis (%) can be calculated according to:

$$DH = 100 \times \frac{d \times \Delta Abs}{\epsilon \times m \times h_{tot}} \quad (4.7)$$

where ϵ is the molar extinction coefficient at 340 nm (6363.4 M⁻¹.cm⁻¹ as obtained from a calibration curve made with leucine), d is the dilution factor.

4 Results and discussion

4.1 Gastric digestions in static pH conditions (pH = 3)

The first aim of this study was to test the efficiency of the pH-stat method to monitor the pepsin hydrolysis of a food during a static *in vitro* gastric digestion. Fig. 2 presents the results obtained over 3 repetitions using the protocol of Minekus *et al.* (2014). The trend is typical of an enzymatic reaction, with a high initial rate of reaction followed by a progressive slowdown (Fig. 4.2A). During the second hour of digestion, the slow but continuous increase shows that pepsin activity was low but not null at the end of the experiments. Switching the time axis to a logarithmic scale (ig. 4.2B) clearly gives the indication that the reaction was not ended. Moreover, beyond ~ 20 min the kinetics was clearly a linear function of the logarithm of time ($R^2 = 0.9996$). By the end of the digestion, a mean of 6.95 ± 0.34 mL of titrant solution (0.05 N HCl) was added.

The degree of hydrolysis (DH) estimated using the OPA method on the end samples was 3.70 ± 0.89 % (Table 4.1). This value is consistent with the high resistance of native whey protein to pepsin activity, providing that DH typically ranges around 15 % after pepsin digestion (Griffiths, 2012; Norton *et al.*, 2014). For comparison on whey proteins, Kim *et al.* (2007) found values in the range 4-10 % after 2 h of pepsin digestion, and Asselin *et al.* (1989) reported a value as low as 1.7 % after a 4 h experiment. Indeed, β -lactoglobulin, the major protein of whey, has been reported to be rather resistant to pepsinolysis thanks to its native conformation, particularly stable at low pH (Astwood *et al.*, 1996; Fu *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 1995; Kitabatake and Kinekawa, 1998). Susceptibility to pepsin hydrolysis is increased when

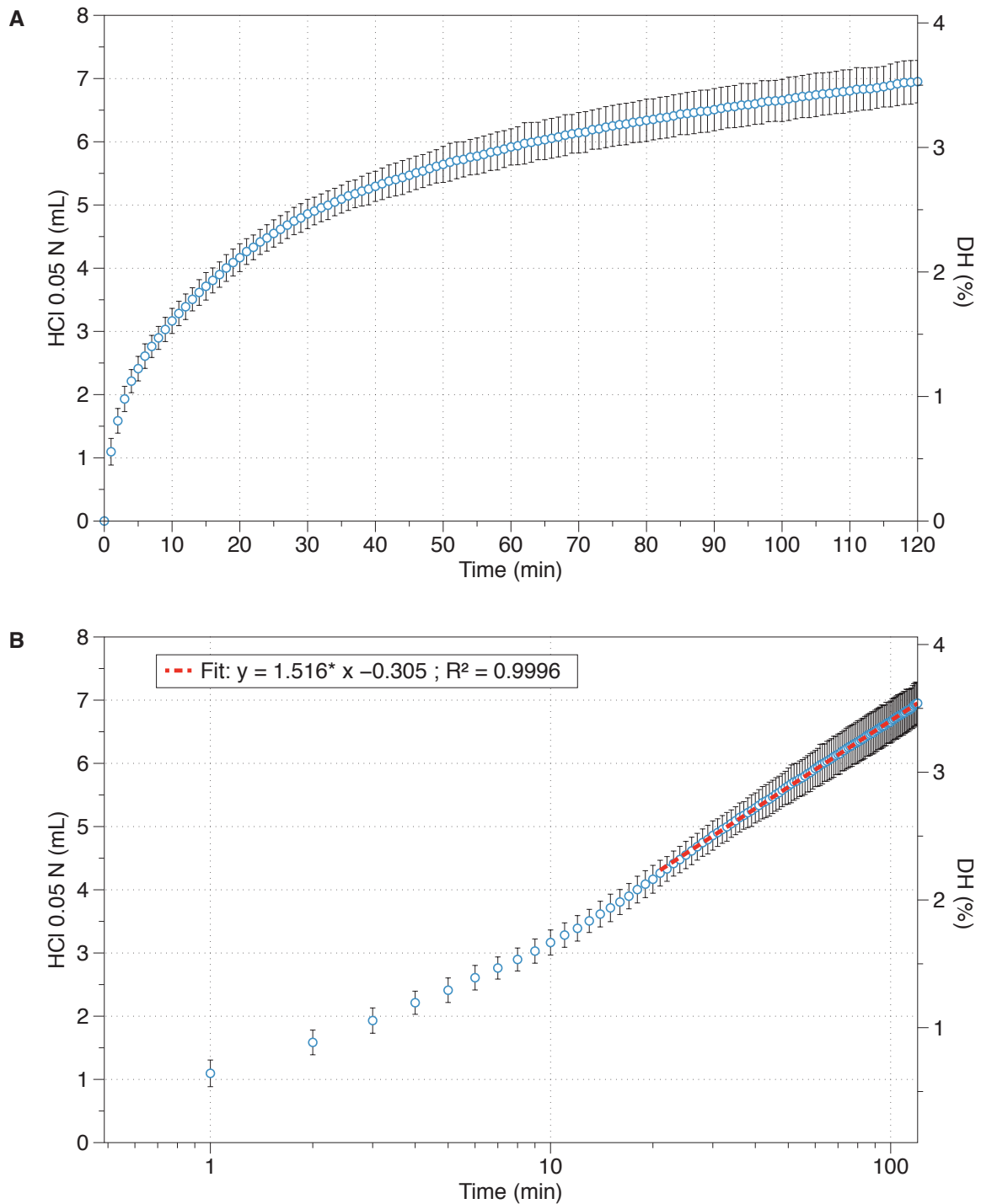


Figure 4.2 – pH-stat acid titration profile of the model food during the *in vitro* gastric digestions in static conditions ($pH = 3$): (A) on a linear scale, (B) on a semi-log scale (with linear fit, dash-dotted line). Values are mean \pm SD over 3 repetitions. DH values on the right-hand y-axis were estimated using $\alpha_{\text{COOH}} = 0.045$ (see section 4.2.2 in Eq. 4.3).

Table 4.1 – Degree of hydrolysis (%) measured by OPA method, and from pH-stat measurements, at the end of the different sets of *in vitro* gastric digestions: pH-stat at pH 3, and pH-stat with an acidifying kinetics before (BD), during (DD), and after digestion (AD).

Set of experiments	OPA	pH-stat
pH-stat at pH 3	3.70 ± 0.89	3.53 ± 0.17
BD experiments	-0.57 ± 0.64	
DD experiments	3.60 ± 0.53	3.05 ± 0.41
AD experiments	2.87 ± 0.36	

proteins are denatured by heat treatment (Reddy *et al.*, 1988). Moreover, reversing Eq. 4.3 with this DH value of 3.70 % and a volume of titrant of 6.95 mL leads to a mean degree of dissociation of peptide’s Cterm carboxylic groups, α_{COOH} , of about 0.09, corresponding to a mean pK_A of about 4.0 according to Eq. 4.4. In other words, more than 90 % of the pepsin activity would effectively be titrated at pH 3. This estimation will be further refined and discussed in the light of the results obtained in dynamic pH conditions.

4.2 Gastric digestions in dynamic pH conditions (from pH 6.3 down to 2)

4.2.1 Titration curves

Fig. 4.3 shows the evolution of the volume of titrant (1 N HCl) and of the pH for the 3 sets of experiments performed in dynamic pH conditions, *i.e.* with a progressive acidification of the medium (BD, DD, and AD). The rate of HCl addition to reach $\text{pH} = 2$ was the same in all experiments (0.031 mL/min) as programmed in the pH-stat experimental setup (Fig. 4.3A). This rate was used to produce a slow acidifying kinetics, that reached pH 2 in about 60 min (Fig. 4.3B), in order to better mimic the reality of human gastric conditions (Dressman, 1986; Malagelada *et al.*, 1979). The last stage of the experiments, *i.e.* after pH 2 was reached, therefore corresponds to a classical pH-stat experiment. The volumes (and hence time) needed to reach pH 2 slightly differed between experiments. In the absence of pepsin, 1.89 mL (61 min) of titrant was needed to counteract the buffering capacity of the medium. This volume did not increase further during the second stage of the experiment. This strongly suggests that no acid hydrolysis of proteins took place, a finding that was further confirmed by the OPA results ($\text{DH} = -0.57 \pm 0.64$ %, Table 4.1).

The volume added to reach pH 2 increased to 2.08 mL (65 min) in presence of pepsin, because of the amino groups of the peptides produced consume protons at acidic pH. During the second stage of these experiments, the slow but progressive increase of HCl volume (up to 2.20 mL at 120 min, Fig. 4.3A) reflects the continuity of the pepsin activity. At the end of the experiment, the DH value 3.60 ± 0.53 % according to the OPA method (Table 4.1).

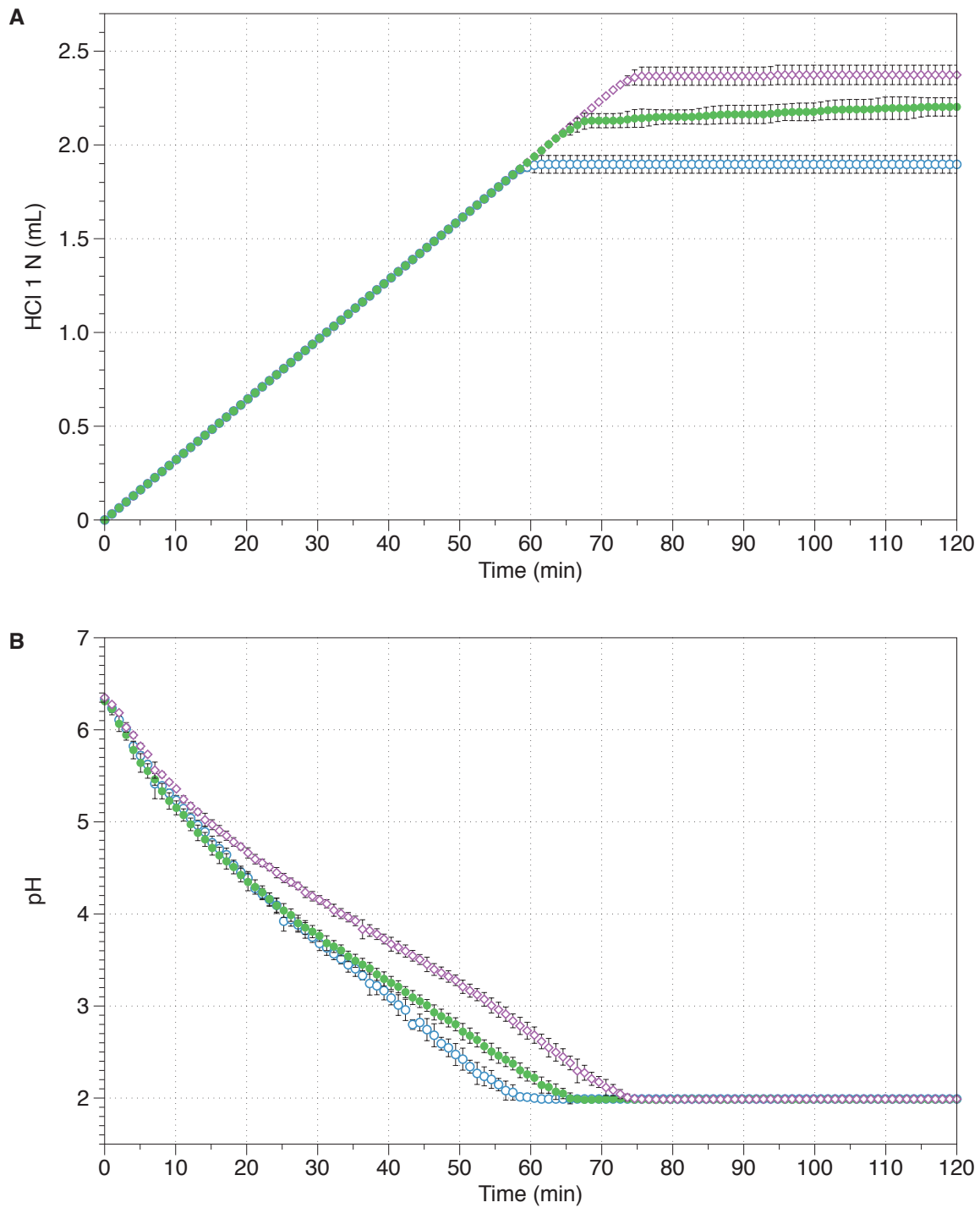


Figure 4.3 – Evolution of the volume of titrant (A) and of the pH (B) during the *in vitro* gastric digestions in dynamic pH conditions (from pH 6.3 down to 2): (open circles) before digestion (BD, no pepsin), (filled circles) during digestion (DD, with pepsin), and (open diamonds) after digestion (AD, with a pepsin inhibitor). Values are means \pm SD over 3 repetitions.

The last set of experiments, obtained after the addition of a pepsin inhibitor (pepstatin) at the end of the DD experiments, needed 2.36 mL to reach pH 2. This value is slightly above the 2.20 mL added at the end of the pepsin digestion experiments because of the greater initial volume of the medium (*i.e.* dilution effects induced by the addition of titrant in the DD experiments, and the subsequent pH neutralization and pepstatin addition). Indeed, the constant volume of added titrant obtained in the second stage of the experiment (2.36 mL at 75 min and 2.37 mL at 120 min) shows that the residual activity of pepsin in presence of pepstatin was negligible. This was also confirmed by the OPA method, which provided a final DH of 2.87 ± 0.36 %, to be compared with the 3.60 ± 0.53 % found at the end of the DD experiments (Table 4.1).

Besides, as can be seen from Fig. 4.3B, the pH measured before (BD) and during (DD) pepsin digestion are starting to diverge around pH 4, at $t \sim 25$ min, while being undistinguishable before. This could signal the beginning of pepsin action. However, the sensitivity of our titration experiments also increases with decreasing pH, as it depends on the degree of dissociation of the peptides' Cterm carboxylic groups. To deepen our analyses of the results and draw clear conclusions, the acido-basic equilibrium of these carboxylic groups was more rigorously estimated from the buffering capacity of the undigested and digested foods.

4.2.2 Buffering capacities and acid-base equilibrium of the peptide's Cterm carboxylic groups

Fig. 4.4A presents the buffering capacity of the undigested (BC_{undig}) and digested (BC_{dig}) model foods, calculated with Equation 6 from the BD and AD experiments, respectively. The buffering capacity of the undigested model food (Fig. 4.4A, open circles) increases from pH 6 up to a local maximum, at $pH \sim 3.6$. This maximum is consistent with previous results on proteins and is mainly due to the acidic amino acids, which contain carboxylic groups in their side chain (Salaün *et al.*, 2005; Whittier, 1929). After pepsin digestion (Fig. 4.4A, open diamonds), the buffering capacity increased between pH 2.7 and 5.3, with a maximum about 23 % higher than before digestion at 3.7. This increase is related to the supplemental buffering effect induced by the neo-formed carboxylic groups of the peptides' Cterm end, which contribution can be estimated by subtracting the two curves (Fig. 4.4A, filled circles). These data suggest that the pK_A of these Cterm carboxylic groups are distributed on a relatively large pH range, from about 5.5 to 2.5. This also means that peptides cannot be detected by acid titration above pH 5.3, and that all of them are titrated below pH 2.5. The maximum and center of the mode was at pH 4.16, which is indicative of the mean pK_A

(Salaün *et al.*, 2005). This value is in very good agreement with the one previously estimated from the pH-stat experiments in static conditions, and appears consistent with the mean pK_A of 3.75 reported for the carboxylic groups of proteins (Nielsen, 1997), and with the local maximum in the buffering capacity at about 4.2 for rennet whey and 4 for whey concentrates (Salaün *et al.*, 2005; Whittier, 1929).

4.2.3 Evolution of DH during both types of *in vitro* gastric digestions

Fig. 4.4B (circles) shows the cumulative buffering capacity of peptides (BC_{pep}^{cumul}) as a function of pH, for which the negative values observed below pH 2.5 (Fig. 4.4A) were neglected. This variable more clearly illustrates that all peptides are titrated below pH 2.5, and can be used to estimate the average degree of dissociation of peptides' Cterm carboxylic groups (α_{COOH} , squares in Fig. 4.4B) as a function of pH according to:

$$\alpha_{COOH}(pH) = 1 - \frac{BC_{pep}^{cumul}(pH)}{BC_{pep}^{cumul}(pH = 2)} \quad (4.8)$$

From this latter relation and our experimental data, we obtained $\alpha_{COOH} = 0.045$ at $pH = 3$, meaning that about 95 % of the peptides produced are in fact titrated at pH 3. Our previous, but most probably less accurate, estimation of α_{COOH} at pH 3 (0.090, see section 4.1) was thus rather good. The value of $\alpha_{COOH} = 0.045$ was therefore used in Eq. 4.3 to estimate the evolution of DH during the pH-stat experiments in static conditions, which led to a corrected final DH of 3.53 ± 0.17 % (Table 4.1 and right hand y-axis of Fig. 4.2).

Similarly, Eq. 4.5 was used to estimate the evolution of DH during the course of the digestions in acidifying conditions as a function of both time and pH, as shown in Fig. 4.5A and B, respectively (note that results in the 60-65 min range are impaired with anomalous variations related to interpolation issues close to $pH = 2.0$). Two slightly different sets of results are presented for comparison purposes. The first set (DH_{approx} , circles) was obtained assuming that $\alpha_{COOH} = 0$ in Eq. 4.5, *i.e.* that the peptides produced were titrated at all pH. The second set (DH , solid red line) was obtained by integrating Eq. 4.8 within Eq. 4.5, and by neglecting the negative values obtained in the first 20 min of digestion arising from experimental uncertainty of few μL when subtracting $V_{BD}(pH)$ from $V_{DD}(pH)$ in Eq. 4.5. These latter estimates of DH thus account for the greater sensitivity of titration method as the pH decreases.

It can be inferred from Fig. 4.5A that no hydrolysis could be detected within the first

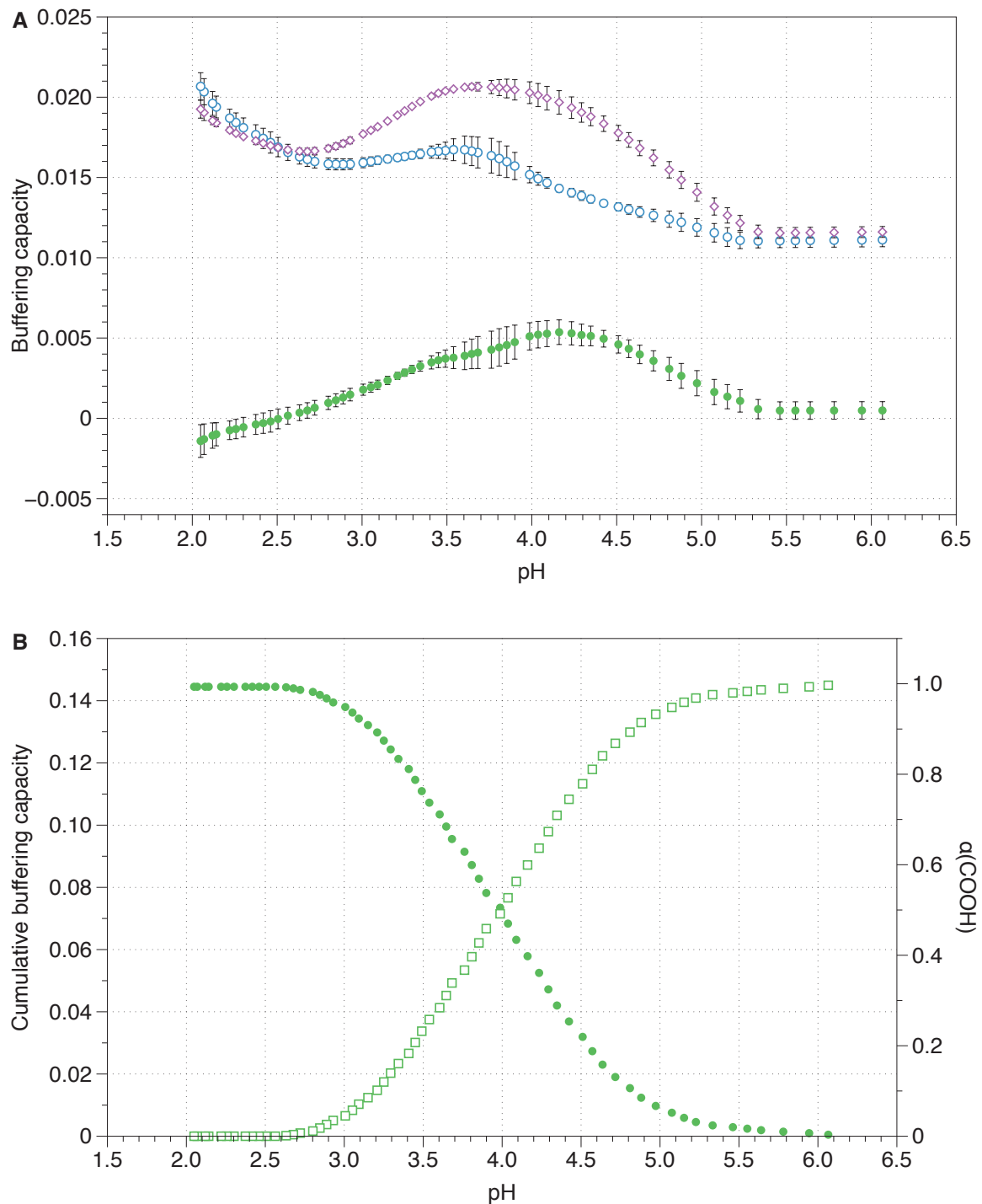


Figure 4.4 – (A) Buffering capacities of the model food before digestion (open circles), after digestion (open diamonds), and their difference (filled circles) which is indicative of the buffering capacity of the neo-formed peptides' Cterm carboxylic groups. Values are means \pm SD over 3 repetitions. (B) Cumulated buffering capacities induced by the neo-formed peptides (filled circles) and corresponding degree of dissociation of the peptides' Cterm carboxylic groups according to Eq. 4.7 (open squares).

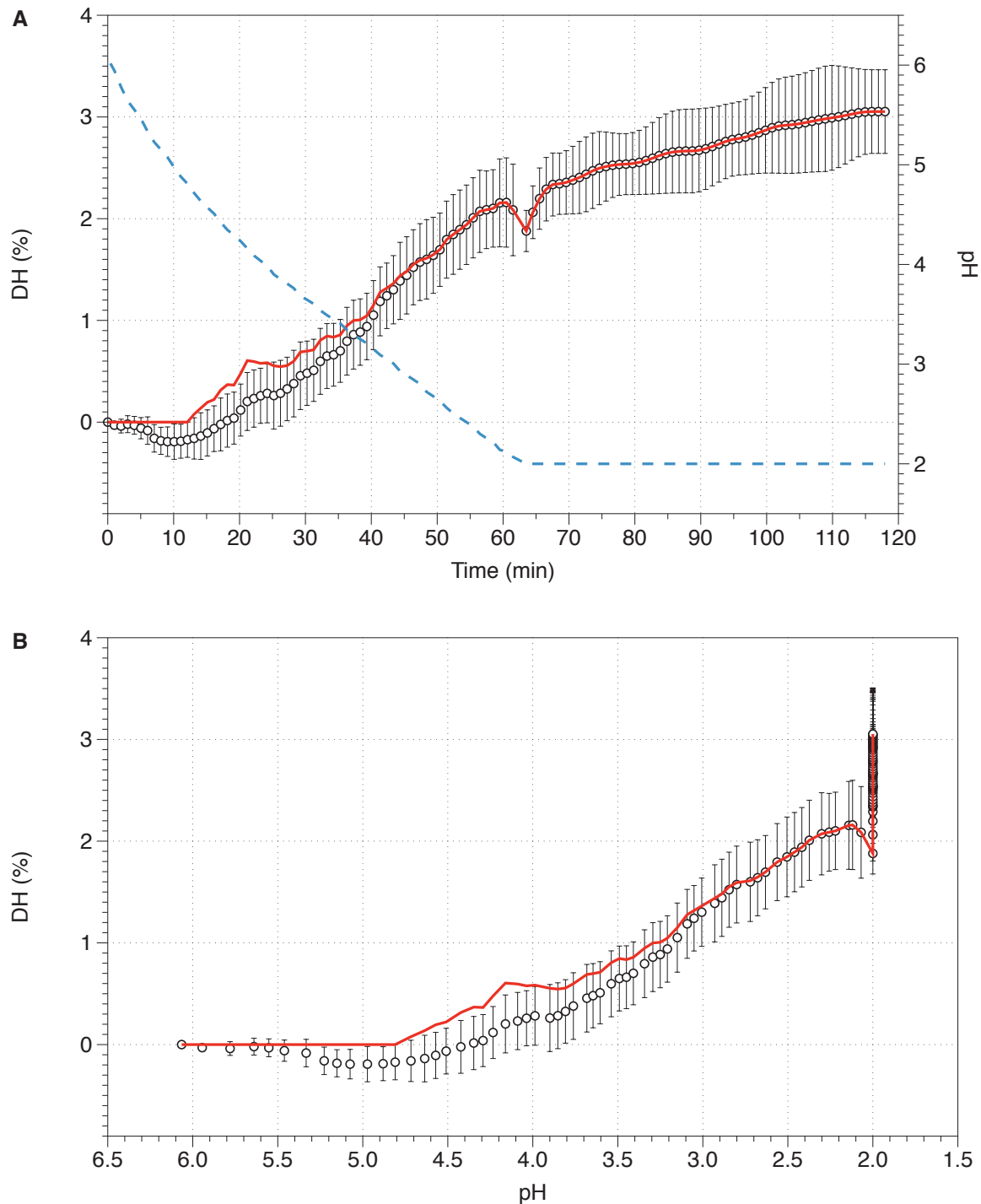


Figure 4.5 – Evolution of the degree of hydrolysis (DH) during the *in vitro* gastric digestion with dynamic pH conditions of the model food (DD) as a function of time (A) and pH (B): (circles) and (solid line) calculated according to Eq. 4.5 without and with considering the evolution of the mean degree of dissociation of peptides' Cterm carboxylic groups as a function of pH. Values are means \pm SD over 3 repetitions (for each data set, BD, DD and AD). The dash-dotted line in (A) shows the pH evolution as a function of time.

~ 20 min, and that pepsin became significantly active afterwards, with a degree of hydrolysis that steadily increased throughout the course of the acidifying kinetics (from $DH = 0$ up to 2.31 %), and after pH 2 was reached. The final DH was estimated to be 3.05 ± 0.41 %, which fall in-between the 3.60 ± 0.53 % and 2.87 ± 0.36 % estimated from the OPA method at the end of the DD and AD experiments, respectively (Table 4.1). This finding therefore validates the experimental and data treatment approaches. Such DH values, obtained after 2 h of gastric digestion in dynamic pH conditions are also close to the one obtained after 2 h at $pH = 3$ (3.53 ± 0.17 %, Table 4.1), *i.e.* with the conditions recommended in the international consensus static protocol (Minekus *et al.*, 2014). Our results therefore suggest that the endpoint of the gastric phase of the consensus protocol is very similar to what can be obtained with a more realistic pH profile (*i.e.* slow acidifying kinetics), concerning protein hydrolysis.

When plotted against pH (Fig. 4.5B), it clearly appears that pepsin started to be active in the pH range 5-4.5. This is also in very good agreement with the pepsin activity against pH that is reported in the literature, with almost no activity at pH 5.5 which rises up to 70 % at pH 4.5 and shows significantly higher activity in the 4 to 2 pH range (Barrett *et al.*, 2004; Piper and Fenton, 1965). Finally, very little difference was observed between the estimated DH_{approx} , and the more rigorous calculus of DH that considers the mean degree of dissociation of the peptides' Cterm carboxylic groups (α_{COOH}). This results from the balance between pepsin activity and the value taken by α_{COOH} as a function of pH. At high pH, peptide detection by titration is not possible because the neo-formed carboxylic groups are almost all protonated ($\alpha_{COOH} = 1$). However, since pepsin becomes active only at relatively low pH, a reasonable number of peptides can already be detected by titration when they start being produced (*e.g.* $\alpha_{COOH} \sim 0.5$ at pH 4, meaning that 50 % of the peptides produced can be detected). The factor $1/(1 - \alpha_{COOH})$ in Eq. 4.5 thus rapidly tends to be negligible. This is an interesting finding from a practical point of view, since it means that a very good approximation of the DH evolution can be obtained without considering this variable when willing to undertake *in vitro* gastric digestion with an acidifying kinetics, as in the present study. It only requires running two experiments (in presence and absence of pepsin) and uses Eq. 4.5 with $\alpha_{COOH} = 0$. Note besides that this latter conclusion should still hold when studying the digestion of soluble proteins in presence of a gastric emptying kinetics, as classically performed with dynamic *in vitro* gastro-intestinal systems.

5 Conclusions

This study shows that pH-stat titration at acid pH is well adapted to the determination of the kinetics of protein hydrolysis by pepsin, and more generally by acid proteases. This approach was successfully adapted to the continuous monitoring of protein hydrolysis during *in vitro* gastric digestions of an emulsion taken as a model of complex food in both static and dynamic pH conditions. Volumes of titrant can be easily converted into degrees of hydrolysis (DH) since 1 mol of H^+ added corresponds to 1 mol of hydrolyzed peptide bonds at $pH \leq 2.5$, and to about 0.95 mol at $pH = 3$, according to our results. Given the simplicity, the high reproducibility, and the low cost of pH-stat apparatus, the presented experimental strategies and knowledge might be valuable for static and even dynamic gastric *in vitro* digestion studies.

Acknowledgments

This work received support from the French National Research Agency under the "Investissements d'Avenir" program (reference No. ANR-11-IDEX-0003-02). The author would like to acknowledge Pablo Granda (INRA, UMR Ingénierie Procédés Aliments, SP2 team, Massy, France) for his guidance over the use of the industrial emulsification process.

À retenir

L'objectif de cette étude essentiellement méthodologique était d'implémenter les possibilités d'un titrateur automatique pour étudier l'hydrolyse des protéines par la pepsine durant une phase gastrique *in vitro*. Une première proposition faite ici était celle du pH-stat à $pH = 3$, valeur recommandée par [Minekus et al. \(2014\)](#). Ce protocole a permis de suivre l'action de la pepsine de manière très similaire à ce qui peut se faire en phase intestinale. De plus, contrairement au suivi de la protéolyse en phase intestinale, l'erreur faite sur les degrés d'hydrolyses est a priori très faible pour des conditions de $pH \leq 3$ car le facteur correctif à appliquer est proche de 1. En seconde approche, la titration a été utilisée pour réaliser une descente de pH du pH natif de la matrice à $pH 2$, en environ 1 h, ce qui permet de se rapprocher plus de la réalité physiologique. L'approche expérimentale proposée a permis de remonter au suivi dynamique de l'hydrolyse des protéines, et a de nouveau montré une très bonne justesse dans la détermination des degrés d'hydrolyse. Ces approches pourraient facilement se voir adapter à d'autres matrices complexes ou d'autres protéines et démontrent que la titration acide-base est une méthode bien adaptée au suivi de la protéolyse gastrique dans des protocoles de digestion *in vitro* en mode statique, mais aussi en mode semi-dynamique.

Chapitre 5

Digestion *in vitro* séquentielle avec suivis pH-stat : influence des paramètres de structure et interaction entre protéolyse et lipolyse

Sommaire

Présentation de l'article	134
Abstract	135
1 Introduction	137
2 Materials and method	139
2.1 Materials	139
2.2 Designed food matrices	139
2.3 Characterization of the matrices	142
2.4 <i>In vitro</i> digestions	142
2.5 Determination of degrees of hydrolysis	144
3 Results and discussion	145
3.1 Structure parameters effect on hydrolysis during the gastric digestion	145
3.2 Structure parameters effect on hydrolysis during the intestinal digestion	147
3.2.1 Effect on the overall titration levels and on proteolysis . . .	147
3.2.2 Effect on lipolysis	151
3.3 Inhibition of lipolysis during the intestinal digestion	153
4 Conclusions	155
Acknowledgments	155
À retenir	156

Présentation de l'article

Les 3 précédents chapitres développaient sur le plan méthodologique l'usage du pH-stat pour le suivi des hydrolyses de matrices complexes de type émulsion stabilisée à l'aide de protéines au cours de la digestion gastro-intestinale. Ils démontraient de plus que cette approche permet de distinguer la digestion des protéines de la digestion des lipides et de détecter des effets liés à la structure de l'émulsion. Néanmoins, dans la première campagne de mesure dont les résultats sont présentés dans le Chapitre 2, les deux émulsions étudiées différaient à la fois par la structure de la phase continue (protéines solubilisées à l'état natif dans la phase continue liquide, ou protéines dénaturées thermiquement conférant à l'émulsion des propriétés de solide) et par les caractéristiques de la phase dispersée (petites gouttelettes dans l'émulsion liquide et grosses gouttelettes avec des protéines dénaturées thermiquement à l'interface dans l'émulsion solide). Afin de découpler les effets, de mieux comprendre la contribution de chaque caractéristique de structure, et de les hiérarchiser, le procédé de fabrication a été modifié dans ce dernier chapitre afin de ne faire varier qu'un paramètre de structure à la fois. Sur le plan méthodologique le protocole intégrait l'expérience acquise au cours des précédentes campagnes et proposait de procéder à une titration acide par pH-stat à pH 3 pour mimer la phase gastrique suivie d'une titration basique à pH 7 pour mimer la phase intestinale.

Les résultats de ces expériences sont présentés sous forme d'un projet d'article à soumettre au journal *Food Research International*.

Sequential *in vitro* gastro-intestinal digestions with pH-stat: influence of structure parameters and interaction between proteolysis and lipolysis

Damien J.L. Mat^{a,b}, Isabelle Souchon^a, Camille Michon^b, Steven Le Feunteun^{a,*}

^a UMR GMPA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78850, Thiverval-Grignon, France

^b UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 91300, Massy, France

* Corresponding author : steven.le-feunteun@inra.fr

Abstract

Beyond composition, structure of food matrices has the potential to modulate the nutrients availability to the organism during digestion. *In vitro* digestion can give a unique insight on structure effects occurring with complex matrices since, contrary to *in vivo* studies, mechanisms of deconstruction, and their kinetics can be identified. The aim of this study was to better understand the competition structural effects on lipolysis and proteolysis of three parameters: the protein state in the continuous phase and at the oil/water interface and the size of the dispersed lipid droplets. Six different systems, each one differing by at least one structure characteristic were prepared using controlled heat and mechanical treatment. All of them had strictly the same composition (15 wt% whey proteins, with or without 10 wt% oil) chosen in order to be realistic as a model food. They were all submitted to a sequential gastric then intestinal *in vitro* digestion using a pH-stat that was efficiently implemented to monitor the evolution of the degree of hydrolysis of proteins during the gastric phase, and of proteins and lipids during the intestinal phase. The physical state of the bulk, as well as the oil droplets size proved to act as major structural levers to modulate the hydrolysis. Heat-denatured proteins are more easily hydrolyzed thanks to a higher sensitivity to pepsin during the gastric phase. Interaction between proteolysis and lipolysis were observed in emulsion-type matrices. A liquid continuous phase made of native proteins led to a faster release of both nutrients. Moreover, tiny oil droplets led to a higher degree of lipolysis if they are entrapped in a solid continuous phase. Finally, a pancreatic lipase inhibitor, Orlistat was proved to be an efficient way to specifically study the proteolysis of food matrices where lipids are present.

Highlights

- Four emulsions of same compositions but different structures were prepared
- Processes allowed variation in their structures from nano to macro scale
- pH-stat was implemented to follow sequential gastro-intestinal hydrolysis
- Mainly the bulk phase physical state and oil droplet sizes modulate hydrolysis

Keywords

In vitro digestion; pH-stat; Food structure; Whey proteins; Hydrolysis synergies; Lipase inhibitor

1 Introduction

Food products are characterized by their structure at different spatial scales from macro to micro and even nano levels. Molecules of interest such as vitamins, minerals,... are typically in the nanometer scale. They are embedded in structures organized at a scale in between nanometer and micrometer which can be made of polymer network (unit-structure of about 10 or 100 nm) or droplet (0.1 to 5 μm , typically). Food structure has been identified as a potent lever in nutrition studies to control or modulate nutrients accessibility and delivery during the digestion (Norton *et al.*, 2014; Turgeon and Rioux, 2011). Nowadays, several food related diseases such as obesity or sarcopenia must be fought. Moreover, the interest in fine-tuned diets (sports nutrition, allergenicity reduction) increases. In these contexts, differentiating structures through a tailored formulation leading to different digestive fate for the nutrients in terms of kinetics and/or digestibility is of great interest (Fardet *et al.*, 2013; Norton *et al.*, 2015).

Human digestion is a complex sequence of transformations of the food where nutrients are made accessible for absorption by the organism prior to metabolization. Important mechanical and biochemical treatments happen during the mouth, stomach and intestines digestive sequence (Bornhorst and Singh, 2014; Griffiths, 2012; Stanfield, 2012). *In vitro* models for the simulation of the human digestion have been developed and proved a powerful tool to better understand the nutrients release. With different degrees of complexity in their engineering, they offer better reproducibility, reduce the costs and times needed, ease sampling and do not need ethical endorsement (Guerra *et al.*, 2012; Venema *et al.*, 2009; Verhoeckx, Kitty *et al.*, 2015). Moreover, *in vitro* systems allow relevant insight into the chain of de-structuration phenomena occurring during digestion. Focus can be made on the mechanisms in play and their relative importance as a function of the structural properties of the food matrix. As simulation permits decoupling of the influent factors, food structures can be purposefully designed and their functionalities rapidly tested.

When considering lipids, which are dispersed as droplets in emulsions in most foods, size of the droplets influence the lipolysis. *In vivo*, a small size of oil droplets (0.7 μm) has been shown to lead to a faster and more extended lipolysis in the stomach and intestine in a 4 h time frame, compared to bigger ones (10 μm) (Armand *et al.*, 1999). This was also observed *in vitro* during the intestinal phase (Lundin *et al.*, 2008; McClements and Li, 2010b) and the gastric phase (Pafumi, 2002). This is explained by an increased interfacial area where lipolytic enzymes are active. Emulsifiers at the interface control the initial emulsion stability. In the changing chemical physics conditions of the digestive tract, the composition

of the interface may change while droplets can interact with each other, potentially leading to coalescence, reduced interfacial area and limited lipolysis. A more important destabilization during the gastric phase was observed *in vitro* for emulsions stabilized with proteins than with phospholipids which are smaller in size (Day *et al.*, 2014). The difference was also seen *in vivo* where phospholipid-stabilized emulsions led to a faster release of triglycerides in the blood. Thus, the choice of the emulsifier type is essential for the emulsion stability but also controls the facility for lipases to access their substrate when in competition with the emulsifiers or bile salts (Mun *et al.*, 2007; Nik *et al.*, 2010).

Proteins digestion can also be modulated by structure effects. Macrostructure has a strong influence *in vivo* where liquid milk proteins are more rapidly metabolized and procure less satiety compared to rennet gels of the same composition (Barbé *et al.*, 2013). In particular, thermal denaturation of β -lactoglobulin proteins and aggregation change their microstructure and can lead to improve hydrolysis by intestinal proteases (Stănciuc *et al.*, 2008) as well as by pepsin during the gastric phase (Guo *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2014b). With gelled whey proteins, different microstructures can be obtained by varying pH and temperature and duration of the heat treatment and can lead to digestion differences (Macierzanka *et al.*, 2012). Indeed, β -lactoglobulin, one of the main whey proteins, was found to be very resistant to gastric and intestinal phase (40 % remaining) when heated at 85 °C for 30 min at pH 5.2, compared to when heated at 70 °C for 24 h at pH 6.5 (10 % remaining). Moreover, when used as emulsifiers, milk proteins can show an enhanced susceptibility to hydrolysis by pepsin compared to in solution thanks to a change of their conformation upon adsorption (Macierzanka *et al.*, 2009).

A few studies focus on food emulsions rich in proteins. Embedding oil droplets in increasingly strong gelatin gels slows down pancreatic lipase diffusion into the proteinic matrix and lipolysis rate (Sarkar *et al.*, 2015). Disintegration of whey protein emulsion gels is more difficult during the simulated gastric phase for hard gels than for soft one and lead to delayed oil droplets release (Guo *et al.*, 2014b). Gels containing 1 μm droplets were less easily broken down by simulated stomach contractions than with 6 and 12 μm droplets-filled gels, with less coalescence observed, which could modulate further intestinal hydrolysis of both nutrients (Guo *et al.*, 2014a). However, simultaneous analysis of hydrolysis of lipids and proteins in emulsions is scarce in the literature, especially with food matrices containing substantial amount of proteins. Milk proteins and fat was digested in a simulated protocol in Kopf-bolanz *et al.* (2012) and the consumption of nutrients was then analyzed. However, methods used (chromatography with mass spectrometry, electrophoresis and spectrophotometry) limited

monitoring to a few time points and may not be suitable for more complex and solid matrices. Li (2012) digested *in vitro* emulsions stabilized by 1 wt% of either sodium caseinate, whey proteins or a small surfactant (Tween 20). pH-stat was used to follow lipolysis during the intestinal phase and electrophoresis during the gastric phase. While this is an attempt to a more complete protocol, previous studies of our team proved that pH-stat could be used to monitor proteolysis during both gastric and intestinal phases (Mat *et al.*, 2017a, 2016). However, these former works did not study the structure effects at the different spatial scales.

The objective of the present work was to explore the combined effects of the protein network, oil/water interface and lipid droplets dispersion structures on lipolysis and proteolysis during gastric and intestinal phase successively. This experimental strategy allowed studying a model food in rather realistic conditions in terms of structure complexity. Emulsions of the same composition (10 wt% oil, 15 wt% whey proteins) were designed to have texture and structure differences at the different scales ranging from nano to macro scales. Whey proteins were mostly in native or denatured form giving rise to liquid and solid macroscopic properties for the obtained emulsions, respectively. Lipid droplet size varied in their mean diameter from 1 to 20 μm . Finally, the structuring of the interface was also modified by changing the protein denaturation degree of the protein adsorbed at the interface. Each structure factor was discussed comparing protein and lipid behavior during gastric and intestinal *in vitro* digestion.

2 Materials and method

2.1 Materials

Whey protein isolate powder (Prolacta 95, 95 wt% on dry powder), was obtained from Lactalis, France. Rapeseed oil (Fleur de colza, Lesieur, France) was purchased at a local supermarket. Pepsin (P6887), pancreatin (P7545), pancreatic lipase (L3126) and bile extract (B8631), all of porcine origin, were obtained from Sigma-Aldrich, France, as well as the Orlistat lipases inhibitor (O4139). Activities of enzymes and bile salts concentration were determined according to the protocols described in Minekus *et al.* (2014). Water was Milli-Q water and all other materials were of standard analytical grade.

2.2 Designed food matrices

In total, 6 different food matrices were designed for the purpose of this study: 4 emulsions and 2 protein-only matrices, the later corresponding to the continuous phase of the emulsions.

Their composition is presented in Table 5.1, as well as their schematic structure and size characteristics.

A solid emulsion (SE) was produced based on to the protocol previously described in *Mat et al. (2016)*. Briefly, an emulsion was prepared with 0.3 wt% whey proteins and 30 wt% oil using a rotor-stator homogenizer (Polytron PT3100D) for 5 min at 10,000 rpm. It was then heated for 5 min at 70 °C. This preliminary step was made to ensure a certain amount of denaturation of the adsorbed proteins, and to test if their partial cross-linking at the interface could influence lipolysis. The warm emulsion was mixed with a solution of 22.3 wt% of proteins prepared on the side to achieve the final composition of 15 wt% proteins and 10 wt% oil. The preparation was then heated for 30 min at 80 °C in a water bath to perform gelation.

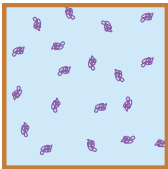

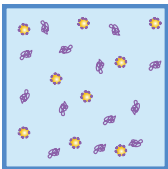
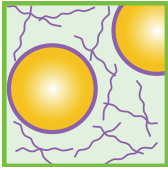
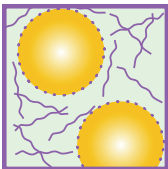
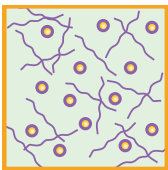
An equally composed liquid emulsion (LE) was prepared as described in *Mat et al. (2016)*. Briefly, it consisted in emulsification by the same rotor-stator treatment, followed by sonication (Bioblock Ultrasonic Processor 20 kHz, 130 W) for 10 min (effective time, with cycles of 10 s on / 10 s off) in order to further reduce the size of the oil droplets. The mean temperature in the emulsion was maintained under 30 °C with an ice bath.

The corresponding fat-free matrices consisted in a liquid 15 wt% whey protein solution for the liquid one (L-FFM), while its solid counterpart (S-FFM) was the same solution submitted to the 80 °C during 30 min heat treatment¹.

The other two emulsions were prepared in similar ways that the SE with slight variations. A 'cold' solid emulsion (SEc), was made with omission of the first, 70 °C, heat treatment, meaning that the whey proteins were not denatured before the dispersion of the droplets in the protein solution and then the heat treatment at 80 °C. An enhanced solid emulsion (SE+), in which the pre-emulsion was produced with a higher quantity of whey proteins (2/13 ratio on the final 15 wt% instead of 0.1/14.9) and a prolonged sonication step of 15 min was applied to produce oil droplets with similar sizes to the ones obtained with LE. These two additional emulsions were designed to change only one parameter at the time (interface structure and droplet size, respectively) when comparing to the LE, apart from the physical state of the continuous phase.

1. Pour les besoins de l'article, ce chapitre a choisi la nomenclature L-FFM et S-FFM pour les matrices sans matières grasses. L-FFM diffère de LCP du Chapitre 1 par le changement des protéines de lactosérum utilisées mais est strictement identique dans sa conception. S-FFM est strictement identique à SCP dans le Chapitre 3. Ces deux ne diffèrent de SCP du Chapitre 1 que par le changement des protéines de lactosérum utilisées mais sont de conception identique

Table 5.1 – Overview of the designed matrices. All matrices contain 15 wt% whey proteins. When lipids are present, they represent 10 wt% of the emulsion.

Matrix	Continuous phase state	Proteins heat treatment	Lipids	Pancreatic lipase inhibitor	G' for solid matrices (kPa)	D _{4,3} (μm)	Schematic representation
L-FFM	Liquid	Native	-	-	-	-	
S-FFM	Solid	Gelation at 80 °C	-	-	39.0 ± 1.3	-	
LE	Liquid	Native	+	-	-	1.22 ± 0.06	
SE	Solid	Gelation at 80 °C Pre-emulsion at 70°C	+	-	46.9 ± 4.4	18.83 ± 0.64	
SEc	Solid	Gelation at 80 °C	+	-	41.3 ± 0.5	19.13 ± 0.03	
SE+	Solid	Gelation at 80 °C Pre-emulsion at 70°C	+	-	68.8 ± 3.6	1.37 ± 0.01	

2.3 Characterization of the matrices

The oil droplets size distribution in the emulsions was controlled with a laser light scattering particle size analyzer (Mastersizer 2000, Malvern, France). The used refractive index values were 1.47 and 1.33 for the oil and the water (dispersant), respectively. A value of 0.001 was set as the absorption of the emulsion. The size is given as the volume-weighted mean diameter, calculated using $D_{4,3} = \Sigma n_i d_i^4 / n_i d_i^3$ and are reported in Table 5.1. Similar $D_{4,3}$ values were obtained for LE and SE+: $1.22 \pm 0.06 \mu\text{m}$ vs. $1.37 \pm 0.01 \mu\text{m}$. $D_{4,3}$ were larger and similar in the SEc and SE solid emulsions: 19.13 ± 0.03 and $18.83 \pm 0.64 \mu\text{m}$ respectively. All this $D_{4,3}$ are sensibly the same than in Mat *et al.* (2016), showing the good reproducibility of emulsions preparation.

The evolution of the rheological properties of the emulsions versus heating up to 80 °C was measured using a rheometer recording the storage modulus (G') rising upon gelation. The protocol used is strictly the same than in Mat *et al.* (2016) and final G' values are reported in Table 5.1. No significant difference was observed between the 3 solid emulsions, meaning that the size and the different interface structure don't affect the macroscopic solid properties of emulsions. In contrast, G' was slightly higher for emulsions than for protein-only matrices. This is the result of the interactions between both dispersed and continuous phases on the overall rheological properties of the gel.

2.4 *In vitro* digestions

For each digestion, the matrices were demolded and grinded with a domestic kitchen food chopper (Braun Turbo 600 W type 4191) for 3 s at the max power. The digestion experiments consisted in a 3-phase digestion almost identical to the one used in the previous study of (Mat *et al.*, 2016). It is based on the recommendations of the Infogest consortium (Minekus *et al.*, 2014) where details can be found on the enzymes activities used in the digestive medium. Digestions were proceeded in a 200 mL jacketed beaker maintained at 37 °C by water circulation in the double wall while constant agitation was made by an underlying magnetic stirrer (250 rpm). 7.5 g of the tested matrix was mixed in the beaker with 7.5 mL of simulated salivary fluid and authorized to reach temperature equilibrium. The oral phase here is only proceeded for electrolyte concentrations considerations and no enzymes were added.

Gastric phase pH-stat experiments: The pH probe and the titration cone of an automatic titration unit (Titroline7000, VWR, France) was put in place. 13.5 mL of gastric fluid without enzymes was then added, containing electrolytes and HCl 1 N to adjust the pH at 3.

Once pH and temperature equilibrium were achieved within minutes, 1.5 mL of a pepsin solution was added. Titration was immediately turned on. It was programmed to maintain pH constant at a value of 3 using a HCl 0.3 N as the titrant solution, and was carried out for 2 h.

Intestinal phase pH-stat experiments: At the end of the gastric phase, the beaker was disconnected from the water bath. It was placed on another set of water bath, titration unit and magnetic stirrer. The digested medium was completed with water to 33 mL in order to start the intestinal phase with the same volume independently of the volume of titrant added previously. 25.5 mL of intestinal fluids without enzymes was then added in the medium, containing electrolytes and NaOH 1 N to bring the pH at 7. 2.5 mL of a solution of bile (prepared on the side by melting bile extract in a 55 °C water bath) was then added to the mix. A frozen tube containing pancreatin and pancreatic lipase was immediately hydrated with the electrolyte solution and NaOH 10 N to bring the pH of the solution at 7. It was allowed for reach 37 °C by letting it in the water bath. After 10 min, the pH of the enzymes tube was checked to be 7 and adjusted. 5 mL of the enzymes solution was then added in the bottle to complete the intestinal fluid (33 mL) and launch the intestinal phase. The titration program was immediately started on for 2 h. The pH was maintained at a value of 7 with addition of NaOH 0.2 N as titrant.

Experimental program: All the 6 matrices described above were proceeded with this sequential protocol (Table 5.1). In order to experiment on the possibility to monitor proteolysis of matrices also containing lipids, the action of a lipases inhibitor, tetrahydrolipstatin, branded as Orlistat, was tested during additional digestions of the SE and LE matrices. In that case, gastric phase was carried out normally as described above. However, during the preparation of the intestinal phase, and before the addition of the enzymes, 660 µL of a solution of Orlistat was added in the medium in replacement of the same volume of water (solution Orlistat in DMSO at 4 mg/mL) to achieve a final concentration of 40 µg/mL. Moreover, no pancreatic lipase was mixed with pancreatin in these experiments to limit lipolytic activities to the lipase already contained in the pancreatin.

All digestion cycles were carried out at least in triplicates.

2.5 Determination of degrees of hydrolysis

Gastric proteolysis Estimation of the degree of hydrolysis (DH) of proteins during the gastric phase was made using calculations expressed in previous works (Mat *et al.*, 2017a). The volumes of titrant (V in mL) added during the gastric phase were converted into a degree of proteolysis with the equation:

$$DH_{prot_G} = 100 \times \frac{V \times N}{m \times h_{tot}} \times \frac{1}{1 - \alpha_{COOH}} \quad (5.1)$$

Where N the normality of the acid, m is the mass of proteins (in g) and $h_{tot} = 8.8$ meqv/g is the total number of peptide bonds in whey proteins (Spellman *et al.*, 2003). α_{COOH} is the mean dissociation value of the peptides carboxylic groups, linked to their pK_A by:

$$\alpha_{COOH} = \frac{10^{pH-pK_A(COOH)}}{1 + 10^{pH-pK_A(COOH)}} \quad (5.2)$$

Intestinal proteolysis Similarly, the degrees of intestinal proteolysis is determined by conversion of the volumes of titrant added for the protein-only matrices (L-FFM and S-FFM) during the intestinal phase titration:

$$DH_{prot_I} = 100 \times \frac{V \times N}{m_{prot} \times h_{tot}} \times \frac{1}{\alpha_{NH_2}} \quad (5.3)$$

α_{NH_2} is the mean dissociation value of the Nterm amino groups where:

$$\alpha_{NH_2} = \frac{10^{pH-pK_A(NH_2)}}{1 + 10^{pH-pK_A(NH_2)}} \quad (5.4)$$

The contribution of the digestive fluids alone was taken into account (*i.e.* a blank digestion experiment with no matrix added). Mean pK_A of proteins used in Eq.5.4 was determined by spectrophotometry by the OPA method using the same protocol than in Mat *et al.* (2016).

Intestinal lipolysis To estimate degrees of intestinal lipolysis, the volume of titrant added during the titration of the emulsion type matrices was subtracted by the mean contribution found for proteolysis alone (L-FFM or S-FFM). The degree of lipolysis was then calculated by:

$$DH_{lip} = 100 \times \frac{V \times N \times M_{lip}}{m_{lip} \times 2} \times \frac{1}{\alpha_{COOH}} \quad (5.5)$$

m_{lip} is the oil mass (in g), M_{lip} is the molecular weight (g/mol) of the triacylglycerols in the oil (calculated as 930 g/mol), and α_{COOH} is the mean degree of dissociation of free fatty acids'

carboxylic groups. α_{COOH} was estimated by complementary 12 h long intestinal digestions performed on reduced quantities (1.5 g) of a liquid emulsion made with 10 wt% rapeseed oil and 0.1 wt% whey proteins in order to reach 100 % release of fatty acids (controlled by the appearance of a sustained plateau during pH-stat measurements).

3 Results and discussion

3.1 Structure parameters effect on hydrolysis during the gastric digestion

In the first part of the experiments in this study all the emulsions and fat-free matrices were submitted to a gastric digestion with pH-stat. The degrees of hydrolysis (DH) obtained for proteolysis are reported in Table 5.2. Figure 5.1 shows the different kinetics of HCl added in the medium while operating the gastric digestions at a static pH 3. All emulsions and fat-free matrices show a classic first order exponential chemical increase kinetics, related to the enzymatic reactions occurring: a fast start of the reaction with a rapid increase of the HCL added followed by a progressive decreasing rate. However, as seen in Figure 5.1A, liquid matrices L-FFM and LE show differences compared to solid ones S-FFM and SE. The beginning of the reaction is slightly slower for SE and S-FFM compared to the L-FFM and LE. This can be related to the physical state of the protein phase: hydrolysis is accelerated in a liquid where the substrate is readily accessible compared to a solid, where enzymes must diffuse in the gel and only have access to the limited exchange area of the gel fragment prior to that. Moreover, the final DH of proteolysis is higher for S-FFM than for L-FFM (5.71 ± 0.21 vs. 3.78 ± 0.14 %). This can be understood as an enhanced susceptibility to hydrolysis by pepsin of the denatured proteins in the gel. Indeed, β -lactoglobulin, the major constituent of whey proteins, has been reported to be, in its native form, rather resistant to pepsin hydrolysis thanks to a conformation particularly stable at low pH (Astwood *et al.*, 1996; Fu *et al.*, 2002; Kitabatake and Kinekawa, 1998). However, its susceptibility to pepsinolysis is better when it is denatured by heat above 70 °C (Reddy *et al.*, 1988), which is related to an irreversible change in the conformation and the resulting exposure of previously buried hydrophobic areas.

Fat-free matrices showed trends that follow closely the kinetics of their emulsion counterparts (Fig 5.1A). They are almost equal for SE and S-FFM, while the L-FFM curve is slightly above the LE curve. This differentiation seems to take place quickly, during the first 10 min of the reaction while curves stay remarkably parallels during the rest of the titration. In the liquid emulsion, some of the whey proteins are adsorbed at the oil/water interface,

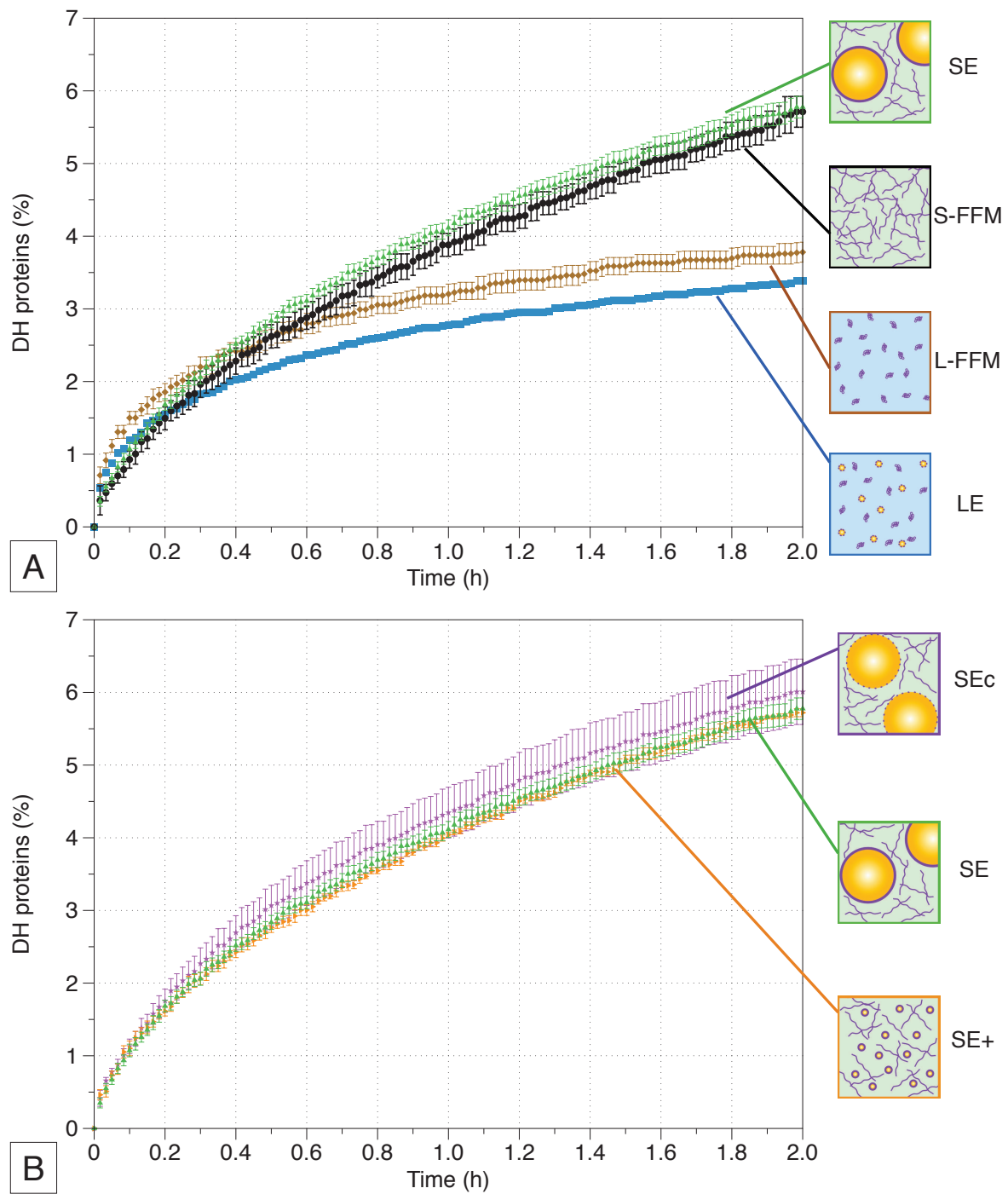


Figure 5.1 – Evolution of the degree of hydrolysis (DH) of proteins of the tested matrices in the course of pH-stat acid titration ($pH = 3$) in *in vitro* gastric conditions. Proteinic continuous phase matrices, liquid or solid (L-FFM, diamonds and S-FFM, dots, respectively). Emulsion matrices: liquid (LE, squares), solid (SE, up-triangles), solid emulsion with smaller droplets (SE+, right-triangles) and solid emulsion without pre-heating of the emulsion before gelation (SEc, stars). Error bars are given as the standard errors.

Table 5.2 – Degrees of hydrolysis (DH) by the end of the gastric phase, and of the intestinal phase. Errors are given as the standard errors.

* DH of proteins determined by pH-stat with Orlistat if inhibition of lipase by is considered complete.

Matrix	DH proteins gastric phase (%)	DH proteins intestinal phase (%)	DH lipids intestinal phase (%)
L-FFM	3.8 ± 0.1	51.7 ± 0.3	-
S-FFM	5.7 ± 0.2	57.4 ± 1.5	-
LE	3.4 ± 0.0	51.7 ± 0.3 (57.9 ± 1.2)*	62.5 ± 1.7
SE	5.8 ± 0.2	57.4 ± 1.5 (58.3 ± 0.9)*	47 ± 4.1
SEc	6.0 ± 0.5	57.4 ± 1.5	48.1 ± 1.9
SE+	5.7 ± 0.1	57.4 ± 1.5	72.7 ± 5.4

stabilizing the droplets. When adsorbing at the interface these proteins change of conformation and unfold themselves. It may modify their sensitivity to hydrolysis and explain the small difference of kinetics between L-FFM containing no adsorbed proteins and LE for which about 0.7 % of the whey proteins are adsorbed. This result is surprising in comparison to those of [Macierzanka *et al.* \(2009\)](#) who found that proteins adsorbed at the interface would be easier to digest than proteins in bulk.

Figure 5.1B shows the gastric titration kinetics for the 3 types of solid emulsions. It is observed that the trends for the SEc and the SE+ are very close to the one observed for the SE, and can be considered equals. Similar final degrees of hydrolysis were found (Table 5.2). Since the SE titration itself sticks very close to the one for S-FFM, these results are comforting the idea that only proteins are effectively accounted for by the titration and that the method is efficient at following the pepsinolysis.

At the end of the gastric phase, DH is ranging between 3.4 and 6.0 % depending on the matrix (Table 5.2). Those results are in line with low values found in the literature for whey proteins: 1.7 % after 4 h in [Asselin *et al.* \(1989\)](#) for native proteins, about 3 to 10 % after 2 h in [Kim *et al.* \(2007\)](#) for heated proteins, and 7.9 % for whey protein gels in [Luo *et al.* \(2015\)](#).

3.2 Structure parameters effect on hydrolysis during the intestinal digestion

3.2.1 Effect on the overall titration levels and on proteolysis

Following the gastric phase, matrices were proceeded into an intestinal phase with titration at static pH 7, which kinetics are presented in Figure 5.2. The final reached NaOH level is

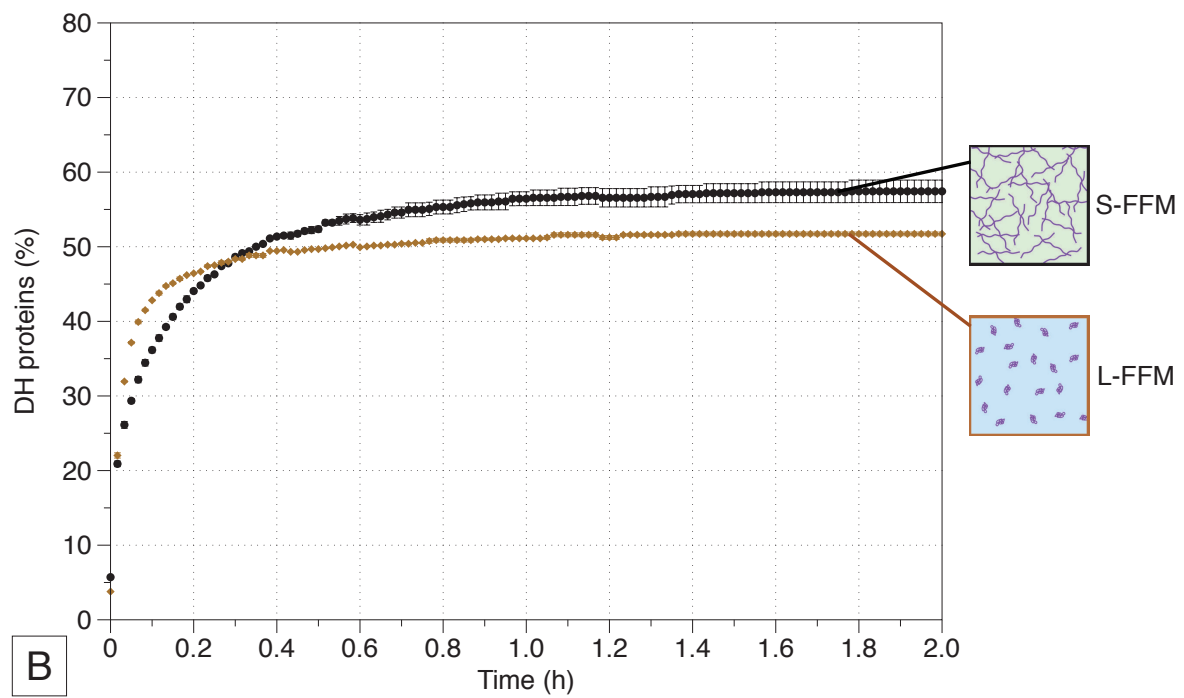
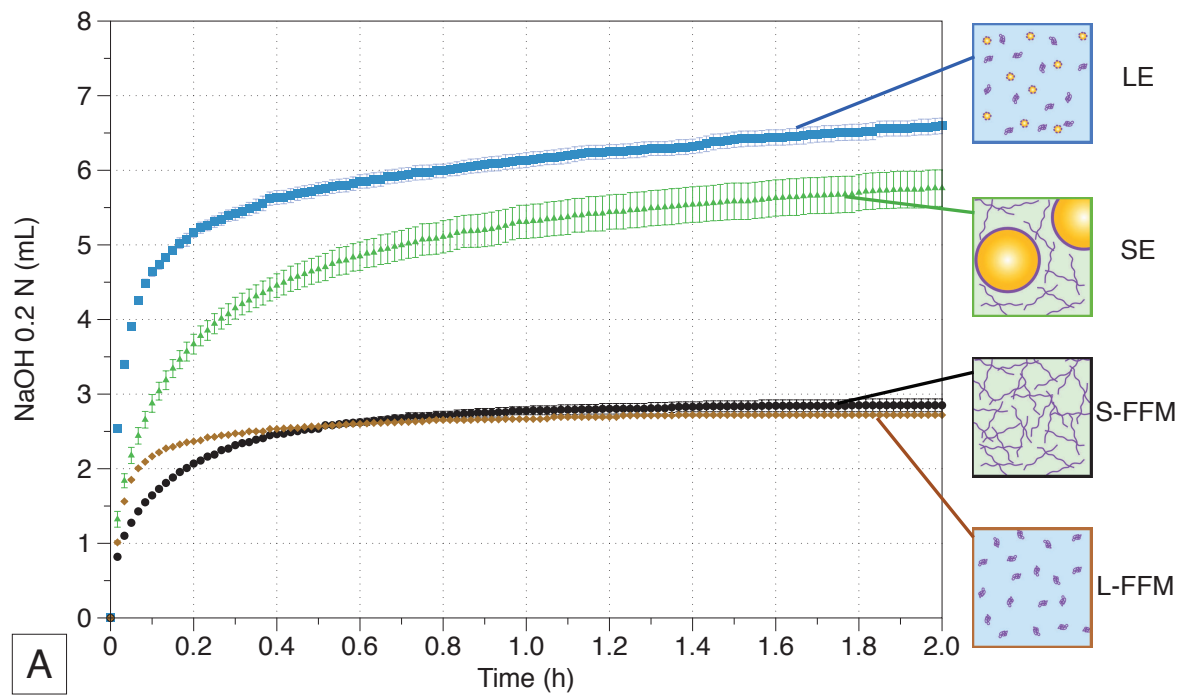
very similar for L-FFM and S-FFM, with 2.7 ± 0.0 mL *vs.* 2.8 ± 0.1 mL, respectively. The hydrolysis achieved during the intestinal phase seem to be similar. The effect of heat denaturation of whey proteins on the enhancement of hydrolysis was shown to be much less pronounced for the action of chymotrypsin (major constituent of pancreatic proteases) than for pepsin (Reddy *et al.*, 1988). In a previous work on similar matrices (Mat *et al.*, 2016), it was observed a bigger DH difference between gelled and native solubilized whey proteins in agreement with the better susceptibility of denatured proteins to hydrolysis described in the literature (Macierzanka *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2014b). However, a following study showed that performing a gastric digestion before the intestinal step infuses acidic gastric medium in the solid matrix that play the role of a ‘proton sponge’ (Mat *et al.*, 2017b). The H⁺ release during the intestinal phase largely modifies the intestinal phase titration mitigating the NaOH volume difference. The bigger the gel pieces, the enhanced this effect. That is why the S-FFM was grinded in the present study in order to reduce this artefact as much as possible. By the end of the experiment, both curves reach a constant level meaning that the reaction was complete. The total protein DH was calculated taking into account the protein DH achieved during the gastric phase (Figure 5.2C). Since S-FFM was more susceptible to hydrolysis by pepsin than L-FFM, the DH curves of the two matrices are differentiated from the beginning of the intestinal phase and reach a final constant level of 57.4 ± 1.5 and 51.7 ± 0.2 %, respectively. Indeed, *in vivo* gastric digestion only participate in a partial hydrolysis of nutrients while it is almost complete after the intestinal digestion. Thus, the 2 h period recommended by the Infogest protocol is sufficient when studying proteolysis, even with important protein amount in the composition of the tested product. In Fig. 5.2A and C, the effect of the physical state of the matrix is clear when focusing on the beginning of the curves. In a similar, and more substantial way than seen during the gastric phase, the reaction is occurring with a faster rate for the liquid matrix in comparison to solid one.

The same phenomena are also observed for LE and SE emulsions (Fig. 5.2A). However, the final levels of titrant are logically higher than with fat-free matrices since the additional contribution of lipolysis is also followed by titration in the case of emulsions. Moreover, the final levels are different after 2 h of intestinal digestion (6.59 mL and 5.76 mL for the LE and SE, respectively). As almost no difference was observed for their fat-free counterparts in the same conditions, this different final NaOH levels can be attributed to the lipolysis contribution. LE lipolysis seems to be more efficient SE one as confirmed in Figure 5.3.

Figure 5.2C also shows the kinetics for SEc and SE+. The titration obtained for SEc is very close to SE one. As observed during the gastric phase (Fig. 5.1), the influence

of the pre-heat treatment of the emulsion (denaturation of the proteins adsorbed at the interface before the denaturation of the protein in the bulk) does not give a measurable change on the proteolysis and lipolysis kinetics. Some authors demonstrated that the interface composition could influence the lipolysis extent (Day *et al.*, 2014). However, these results were obtained with liquid emulsions containing low protein concentrations. The emulsions studied here aimed to mimic real food and were formulated with much higher lipid and protein concentrations. It seems that in these experimental conditions the denaturation of the proteins adsorbed at the interface is not an important enough lever to modulate digestion of solid emulsions. The particular effect of cross-linking of interfacial β -lactoglobulin was also demonstrated not to influence lipolysis in *in vitro* intestinal digestions of liquid emulsions (Sandra *et al.*, 2008).

SE+ showed a different kinetics in comparison to all other matrices. The initial rate of the intestinal digestion reaction is in between the other solid products and the LE. The final level is the highest recorded for all matrices (7.11 mL). Since no difference was observed during titration of S-FFM, SE and SEc, these differences could be attributed to the lipolysis.



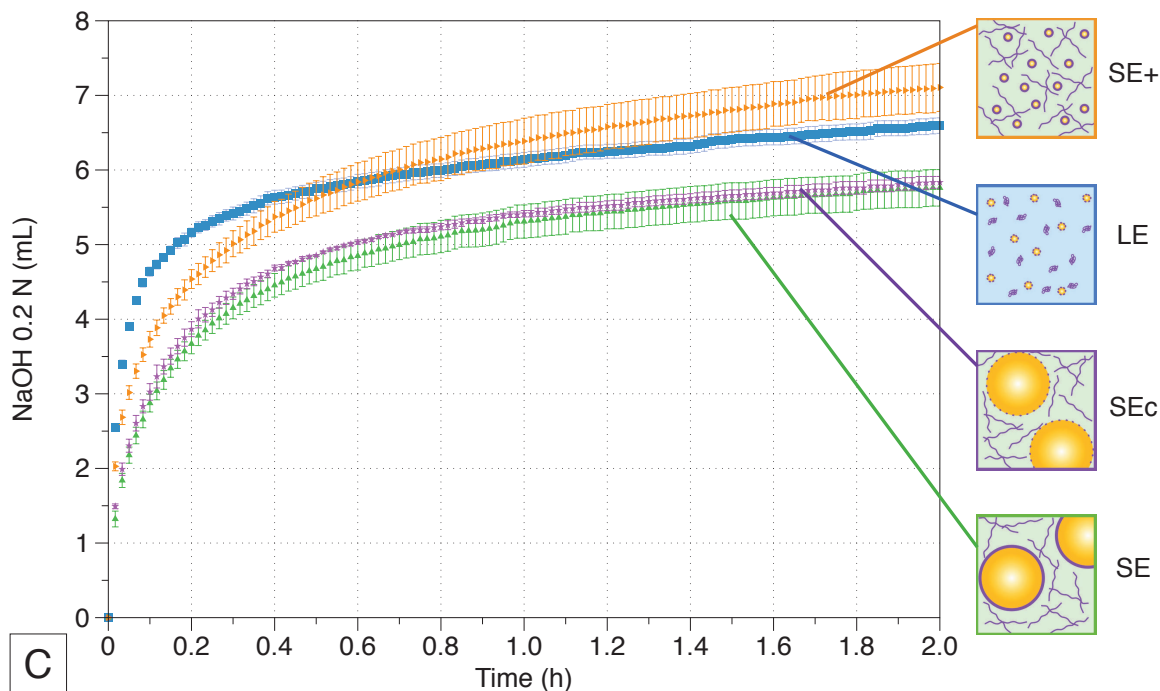


Figure 5.2 – Kinetics of digestion in the course of pH-stat basic titration ($pH = 7$) in *in vitro* intestinal conditions. Given as the total volume of titrant added (A and C) and as the degree of hydrolysis (DH) of proteins for fat-free matrices (B). Fat-free matrices, liquid or solid (L-FFM, diamonds and S-FFM, dots, respectively). Emulsions: liquid (LE, squares), solid (SE, up-triangles), solid emulsion with smaller droplets (SE+, right-triangles) and solid emulsion without pre-heating of the emulsion before gelation (SEc, stars). Error bars are given as the standard errors.

3.2.2 Effect on lipolysis

The lipolysis contribution to titration was determined by subtracting the emulsion titration volumes by the fat-free matrices ones. The resulting curves are given in Figure 5.3. The corresponding lipolysis were calculated and are reported in Table 5.2. As expected, no significant difference is observed between SE and SEc either in terms of kinetics and final DH (46.95 ± 4.18 and 48.13 ± 1.89 %, respectively). On the contrary, LE shows a marked difference with an enhanced lipolysis compared to SE and SEc. Its initial reaction rate is the more rapid seen in this study, which can be related to the liquid state of the matrix (Mat *et al.*, 2016). A rather high final lipids DH of 62.50 ± 1.70 % was obtained for LE due to the reduced size of the oil droplets and thus to the large interfacial surface area (about $50 \text{ m}^2/100 \text{ mL}$ for LE *vs.* 3.2 m^2 for SEc). The larger the total interfacial surface, the higher the number of anchorage points in the substrate for lipase action and the higher the overall lipids DH (Giang *et al.*, 2015).

In the case of the SE+, the initial digestion rate is closer to the one observed for LE than for other solid emulsions despite SE+ physical state that should slow down the reaction

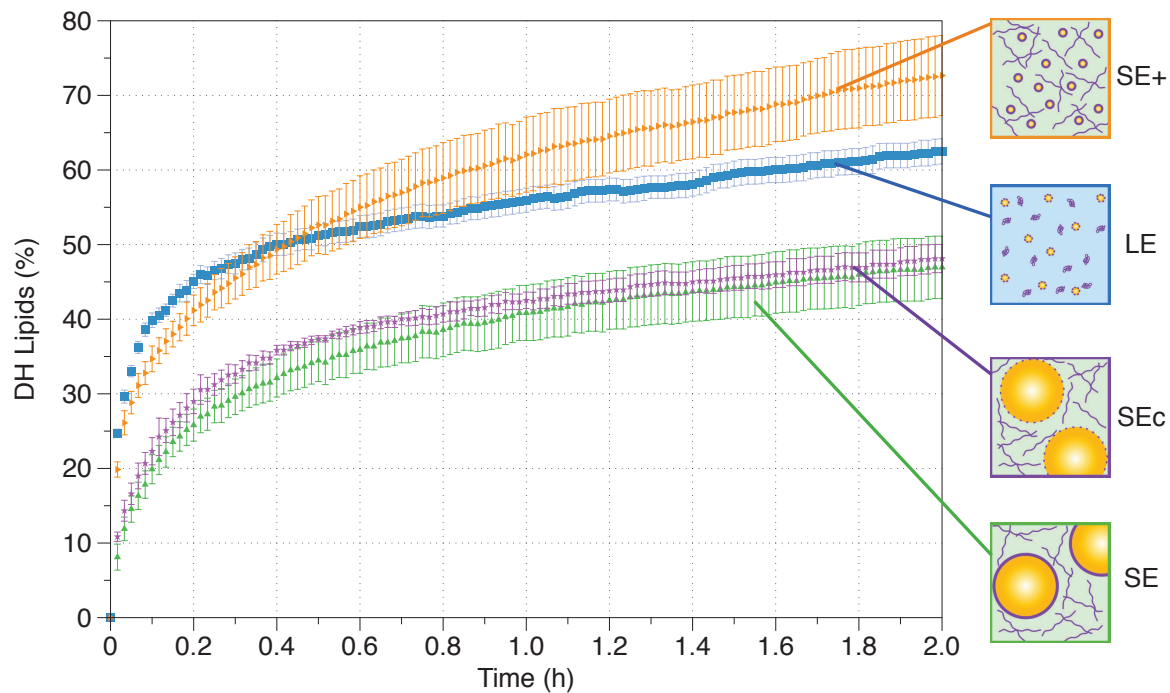


Figure 5.3 – Evolution of the degree of hydrolysis (DH) of lipids of the emulsions in the course of pH-stat basic titration ($pH = 7$) in *in vitro* intestinal conditions. Liquid emulsion (LE, squares), solid emulsion (SE, up-triangles), solid emulsion with smaller droplets (SE+, right-triangles) and solid emulsion without pre-heating of the emulsion before gelation (SEc, stars). Error bars are given as the standard errors.

because of the oil droplets entrapment in the gel. Oil droplets mean diameter is almost 10 times smaller for SE+ and LE in comparison to SE and SEc. It seems that the interfacial surface is a much more important factor for the initial lipid hydrolysis rate than the physical state of the protein matrix around the droplets. The SE+ final lipids DH is the highest seen in this study ($72.7 \pm 5.4 \%$). The reduced size of the oil droplets certainly plays a role. However, the oil droplet sizes are similar in LE and SE+. Thus, the physical state of the continuous phase plays also a role for SE+. The entrapment of the droplet in the gelled protein continuous phase help keeping all the oil droplet in the medium during all the reaction while for LE the few bigger droplets could cream and disappear from the reaction point of view. Finally, the lipids DH after 2 h are much smaller for SE and SEc. In addition to the droplet size effect already mentioned, there is probably an enhanced effect linked to the grinding. Indeed, the emulsion gels grinding leads to some droplets fragmentation. As SE and SEc droplets are larger, each droplet cut releases more oil, which creams rapidly to the surface of the reaction medium, forming oil slicks for which the anchoring number per grams of lipids for the lipase are even smaller than for big oil droplets. It was effectively visually seen while no oil layer was formed at all with SE+.

3.3 Inhibition of lipolysis during the intestinal digestion

Figure 5.4 presents the titration kinetics obtained during the intestinal phase when the Orlistat inhibitor was added into the medium with LE and SE (Fig. 5.4A and B, respectively). Orlistat (tetrahydrolipstatin) is an inhibitor of digestive lipases derived from lipstatin, obtained from a bacterial source. Its action have been previously studied *in vitro* and *in vivo* with particularly good results on the human pancreatic lipase (Carrière *et al.*, 2001; Tiss *et al.*, 2009; Wilcox *et al.*, 2014). It has the capacity to covalently block the active site of the lipase, stopping it to proceed to the hydrolysis of triglycerides into monoglycerides and to free fatty acids. Orlistat has also the advantage to be selective of lipases and therefore leaving proteases action intact. In both cases, the curves are very close to the ones observed for L-FFM and S-FFM. Orlistat could effectively block the lipase activity in the experimental conditions of the present study, which is a very interesting result. Indeed, it can be used as an inhibitor allowing the study of other food proteolysis using a pH-stat even in presence of fat. This can be very useful for the study of real food for which preparation of fat-free matrices is not possible without introducing major bias.

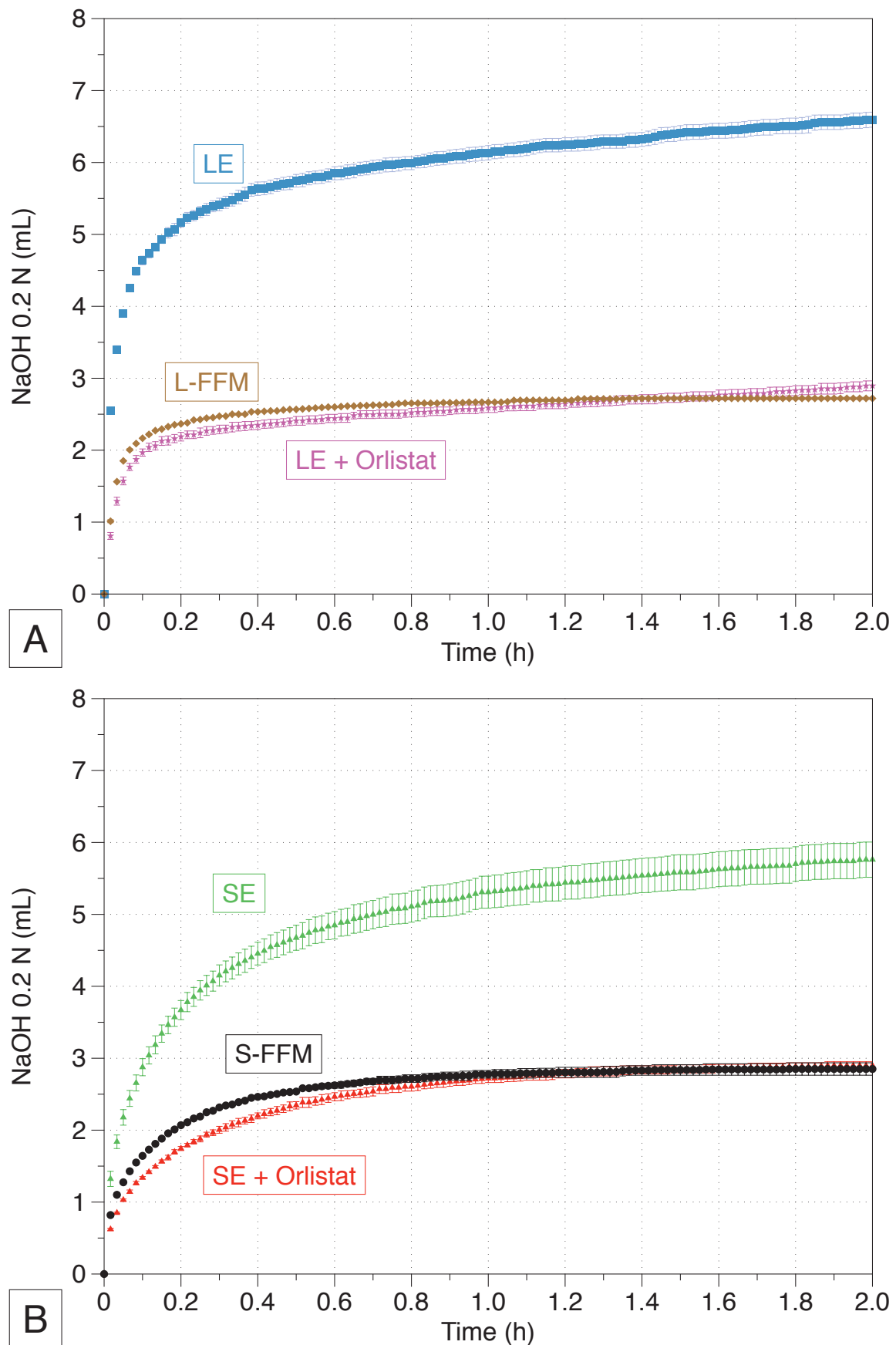


Figure 5.4 – Evolution of the volume of titrant in the course of pH-stat basic titration ($pH = 7$) in *in vitro* intestinal conditions. Kinetics are compared between emulsions, fat-free matrices and emulsions with lipase inhibitor for: (A) liquid matrices: LE (squares), L-FFM (diamonds) and LE + Orlistat (stars) respectively, (B) solid ones: SE (up-triangles), S-FFM (dots) and SE + Orlistat (up-triangles), respectively. Error bars are given as the standard errors.

4 Conclusions

In this study an integrated method of *in vitro* static digestion was presented, respecting the Infogest recommendations. It includes a gastric step followed by an intestinal step, during both of which the occurring hydrolysis were monitored by pH-stat. The method proved efficient at recording gastric proteolysis and intestinal lipolysis and proteolysis of liquid and solid emulsion providing degrees of hydrolysis. A set of emulsions containing proteins and lipids in concentrations in agreement with real food systems. They have strictly the same protein and lipid composition but were designed with different structures at different spatial scales from macro to micro and even nano levels. The protein physical state (particularly in the bulk) and the oil droplets size were identified as major structural parameters to modulate the hydrolysis. Synergies between proteolysis and lipolysis were identified. On one hand, droplets in a liquid non-denatured protein continuous phase gives a fast liberation of both nutrients. On the other hand, proteolysis is finally more pronounced if proteins are beforehand heat-denatured. Moreover, lipolysis is also more pronounced if tiny droplets are entrapped in a solid continuous phase. Finally, pH-stat was proved to be a simple and very efficient *in vitro* method to follow proteolysis and lipolysis of food like products being able to distinguish the degree of hydrolysis of the protein and lipid. The use of Orlistat as an efficient inhibitor of lipolysis makes it possible to study quickly the proteolysis of food matrices where lipids are present.

Acknowledgments

This work received support from the French National Research Agency under the "Investissements d'Avenir" program (reference No. ANR-11-IDEX-0003-02).

À retenir

Cette campagne de digestion *in vitro* était importante à mener pour valider les choix fait rapidement en début de projet sur la base de la littérature. En effet il fallait produire très vite (en moins de 6 mois) des émulsions de même composition chimique mais de structure différente susceptible de se comporter différemment au cours de la digestion par le rat. Les émulsions ainsi produites et validées en termes de cinétique de digestion, différaient en termes de structure à plusieurs niveaux d'échelles. L'enjeu était donc de découpler et hiérarchiser les facteurs d'échelle en s'appuyant sur un protocole de titration par pH-stat intégral, comprenant une phase gastrique suivie d'une phase intestinale. Certains effets liés à la structuration de la phase continue abordés dans les chapitres précédents ont été confirmés. Les protéines dénaturées sont plus facilement hydrolysées par la pepsine mais pas par les protéases pancréatiques en comparaison avec les protéines natives. Ce résultat est très cohérent avec ceux de la littérature. Les vitesses initiales de protéolyse et lipolyse sont plus importantes dans l'émulsion liquide. La comparaison du comportement d'émulsions formulées de manière à n'avoir qu'un paramètre de structure qui change à chaque fois a permis de distinguer les effets et leur niveau. La dénaturation par la chaleur des protéines déjà positionnées à l'interface ne semble pas impacter la cinétique de lipolyse dans les émulsions solides. Une protéolyse ralentie par l'état solide et une réduction de la taille des gouttelettes d'huile permet, par synergie, d'atteindre des niveaux de lipolyse plus haut encore que ceux atteint pour une émulsion liquide contenant des gouttelettes lipidiques de même taille. Ces résultats démontrent l'intérêt de notre approche à la fois globale et spécifique des protéines et des lipides pour le criblage d'effets de structure. L'implémentation du protocole de digestion *in vitro* permettant l'utilisation d'un inhibiteur de la lipolyse pour pouvoir découpler l'hydrolyse des protéines et celle des lipides sans avoir à formuler des matrices modèles sans matière grasse est un résultat particulièrement intéressant. Il permet d'envisager d'étudier l'effet structure sur les cinétiques d'hydrolyse des protéines et des lipides de produits réels sans biais liés à la production de produits sans lipides dont la structure serait nécessairement modifiée de façon plus ou moins drastique.

Discussion générale

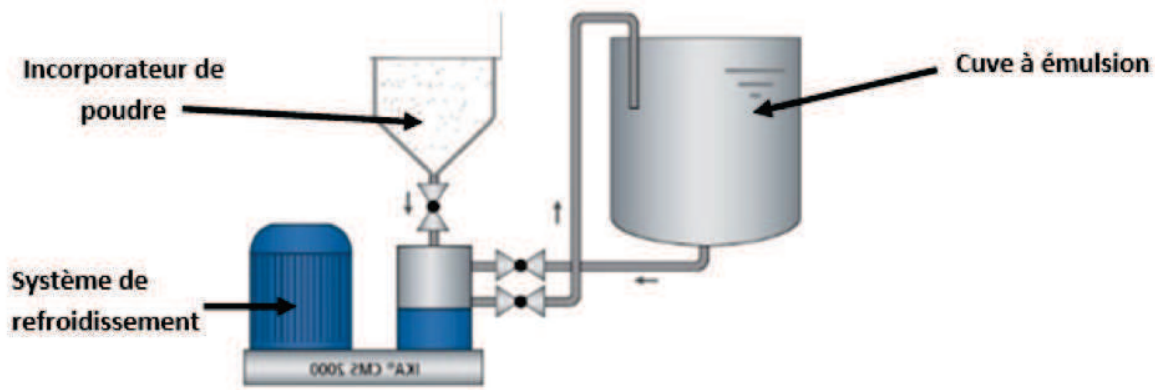
Avant de présenter une synthèse de l'ensemble des résultats des digestions *in vitro*, les principaux résultats obtenus lors de l'étude *in vivo* sont présentés. Ils sont précédés d'un volet important du travail concernant la conception d'émulsions de structures différentes et contrôlées. L'étude *in vivo*, associé au choix du type d'émulsions, a été réalisée en collaboration avec deux autres équipes partenaires du projet ALIAS. Il s'agit ici de répondre aux questions suivantes : Les effets « structure » observés en condition *in vitro* de digestion ont-ils des impacts dans des conditions *in vivo* de digestion ? De quelles natures sont ces impacts ?

1 La conception des émulsions et la préparation des régimes des rats pour l'étude *in vivo*

1.1 Conception des émulsions : de l'échelle laboratoire vers l'échelle pilote

La conception des émulsions de structures différentes susceptibles de générer des comportements différenciés au moment de la digestion a été réalisée en concertation avec l'ensemble des partenaires du projet. Ainsi, les contraintes liées à la conduite d'une étude *in vivo* ont été intégrée dès les premières étapes du projet : composition des émulsions compatible nutritionnellement en qualité et en quantité d'énergie avec celles habituellement consommées par un rat, facilité à fabriquer les émulsions pour une production en quantité suffisante pour une étude animale sur plusieurs semaines, facilité à les intégrer dans la ration de l'animal. Ces contraintes ont permis de fixer dès le début du projet la composition des émulsions sur lesquelles se baseraient les études *in vivo*, mais aussi *in vitro*. Cette composition est restée constante durant toute la thèse : 15n% de protéines de lactosérum et 10 % d'huile de colza.

Dans les 6 premiers mois, le travail de thèse s'est donc organisé autour de la conception



(a) Disperseur à poudre



(b) Homogénéisateur haute pression à deux étages (voir 1.7(c) pour le schéma de principe d'un étage

FIGURE 6.1 – Instruments mis à profit pour la fabrication des émulsions à l'échelle pilote

bien maîtrisée de 2 émulsions aux caractéristiques de structure les plus opposées possible vis-à-vis des cinétiques de digestion et la vérification que celles-ci permettait une modulation de la libération des nutriments *in vitro* (Liquid Emulsion - LE et Solid Emulsion - SE dans Chap.2). Cette mise au point a été réalisée avec des équipements de fabrication des émulsions du laboratoire (moulin colloïdal, sonde à ultrasons, bains thermo-régulés), et la répétabilité du procédé était vérifiée par caractérisation des émulsions (granulométrie des gouttelettes et propriétés rhéologiques des émulsions). Si la première étude *in vivo* réalisée dans le cadre du projet ALIAS s'est basée sur les protocoles définis à l'échelle du laboratoire, il a été nécessaire d'envisager un changement d'échelle pour la suite du travail de conduire une réflexion sur la transposition de ce protocole à des échelles pilote, afin d'augmenter les capacités de production des émulsions. Pour cela, un mélangeur à hélice, un disperseur de poudre et un homogénéisateur à deux étages ont été utilisés (Fig. 6.1 et décrits dans Chap. 4). Les conditions opératoires de ces équipements ont été explorées et étudiées, afin de définir les conditions expérimentales à l'échelle pilote permettant de retrouver les caractéristiques des émulsions réalisées à l'échelle laboratoire. Seule l'étape de chauffage pour dénaturer les protéines et la gélification des émulsions solides n'a pas pu être implémentée à cette échelle.

Au-delà de la recherche d'équivalence entre les deux procédés « laboratoire » et « pilote », pour chaque émulsion, la relation entre les paramètres opératoires et la granulométrie de l'émulsion liquide ont été explorée plus avant. Il s'agissait d'abord d'identifier les effets les plus influents :

- Pour le protocole à l'échelle du laboratoire ; le temps de sonication et la vitesse du moulin colloïdal à l'échelle,
- Pour le protocole à l'échelle pilote : la pression du premier étage et du second étage de l'homogénéisateur.

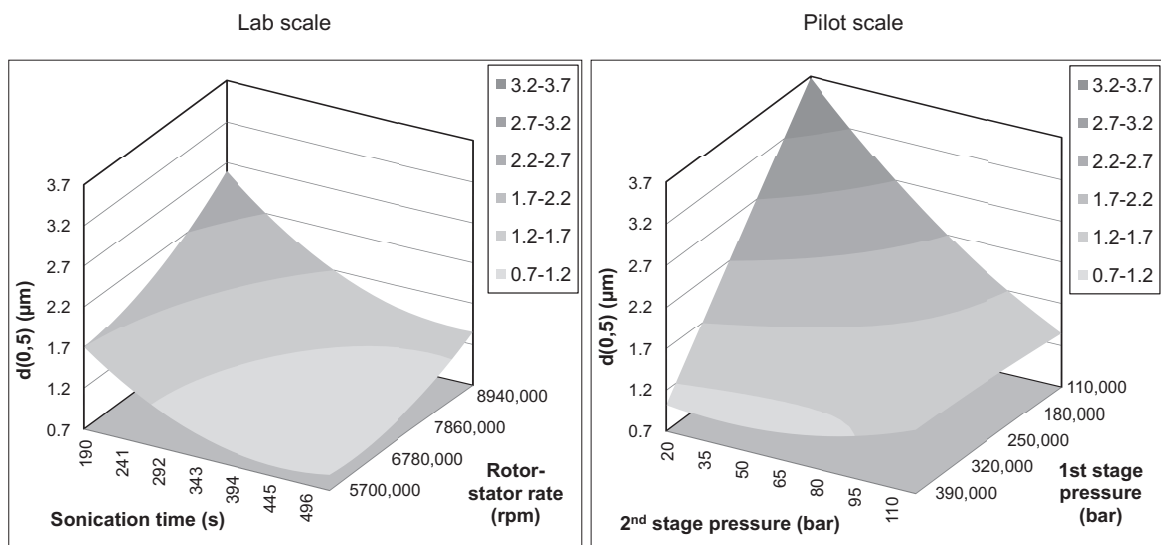


FIGURE 6.2 – Comparaison de l'effet des conditions opératoires des équipements du laboratoire (à gauche, temps de traitement aux ultrasons et vitesse du moulin colloïdal) et du pilote (à droite, pression du premier et second étage de l'homogénéisateur) sur le diamètre médian des gouttelettes des émulsions liquides (surfaces de réponses construites à partir des résultats de plans d'expériences centraux composites).

L'étude d'une gamme étendue de ces conditions, associée à un plan d'expériences central composite, ont permis de construire des modèles statistiques permettant de relier les paramètres opératoires aux caractéristiques des émulsions, et plus spécifiquement aux diamètres des gouttelettes d'huile (Fig. 6.2). Les résultats montrent que, bien que l'échelle pilote permette une production en masse (débit pouvant aller jusqu'à 30 L/h), l'échelle laboratoire permet de balayer une gamme plus étendue de tailles de gouttelettes. L'échelle laboratoire est donc pertinente pour la conception d'émulsions à la granulométrie variée pour des études exploratoires, tout en nécessitant moins de matériel et donc moins de coûts de matières premières. Ce travail d'ingénierie a offert l'occasion de mieux connaître les possibilités des

équipements, et sera complété (travail en cours) avec l'étude des mêmes paramètres, sur des émulsions contenant des lécithines de soja comme émulsifiant. Ce travail complémentaire permettra de balayer aux deux échelles de production, laboratoire et pilote, la gamme de structure d'émulsion qu'il est possible d'obtenir. Il donnera lieu à la soumission d'un cinquième article dans une revue à comité de lecture.

Une fois les émulsions préparées, ces dernières ont dû être intégrées dans le régime des rats pour l'étude *in vivo*.

1.2 Préparation des régimes

Si pour les digestions *in vitro* les émulsions ont été digérées telle quelles, il a été nécessaire pour l'étude *in vivo* de considérer la ration complète et équilibrée du rat. Le régime du rat doit contenir une certaine quantité de nutriments compatible avec ses besoins. Nous avons fait le choix de concevoir les émulsions pour que les lipides et les protéines soient apportés exclusivement par ces dernières. Les micronutriments et les glucides sont apportés par des poudres qui sont rajoutées à la ration (Tableau 6.1).

Tableau 6.1 – Composition des 2 régimes. Les symboles « * » indique les ingrédients apportés par les émulsions de structures différenciées conçues et produites dans le travail de cette thèse (LE et SE). Adapté de Beaumont *et al.* (2017).

Ingredients	<i>g/kg (dry matter)</i>
Whey protein isolate*	214.9
Rapeseed oil*	110.2
Corn starch	489.7
Sucrose	79.7
Cellulose	50
Choline	2.3
Vitamin mixture, AIN 93-V	10
Mineral mixture, AIN 93-M	35
Energy	
Energy density (<i>kJ/g</i>)	16.7
Carbohydrate (<i>% energy</i>)	53
Protein (<i>% energy</i>)	20
Fat (<i>% energy</i>)	26

La durée de l'étude animale n'était pas compatible avec la conservation, même à 4 °C, des émulsions. Nous les avons donc fait lyophiliser. Les émulsions ont été produites dans les mêmes conditions que pour l'étude *in vitro*, mises en barquettes directement pour l'émulsion liquide (LE) ou après broyage pour l'émulsion solide (SE), puis congelées - 80 °C. Les barquettes ont été envoyées à un prestataire (Lyofal) qui a assuré la lyophilisation des produits. La lyophilisation a permis, au-delà de la conservation, de concentrer les quantités de lipides et

protéines apportées par les émulsions et ainsi de limiter les différences d'ajouts d'eau entre les deux régimes lors de la préparation des repas des rats. La digestion *in vitro* des émulsions lyophilisées réhydratées, réalisées en préliminaire de l'étude *in vivo*, a permis de contrôler que nos résultats étaient répétables malgré cette transformation supplémentaire. Très peu de différences sur les cinétiques d'hydrolyse entre les émulsions fraîches et celles lyophilisées puis réhydratées a été observée (Fig. 6.3). La seule différence obtenue était observée en début de cinétique pour l'émulsion solide et pourrait être attribué à une légère différence d'hydratation des morceaux d'émulsion lyophilisé et réhydraté en comparaison de des morceaux d'émulsion solide avant lyophilisation. Cette différence disparaît au cours du temps et les niveaux finaux sont les mêmes. Lors de l'expérimentation animale, la ration était préparée quotidiennement avant de nourrir les rats. Pour cela, l'émulsion lyophilisée était mélangée au reste des poudres nutritives et de l'eau était ajoutée pour atteindre des niveaux finaux de texture similaires et assurer l'appétence pour l'animal. La ration finale s'apparentait à une pâte assez épaisse dans le cas des émulsions liquides, à une pâte de même consistance mais avec des fragments dispersés dans le cas des émulsions solides.

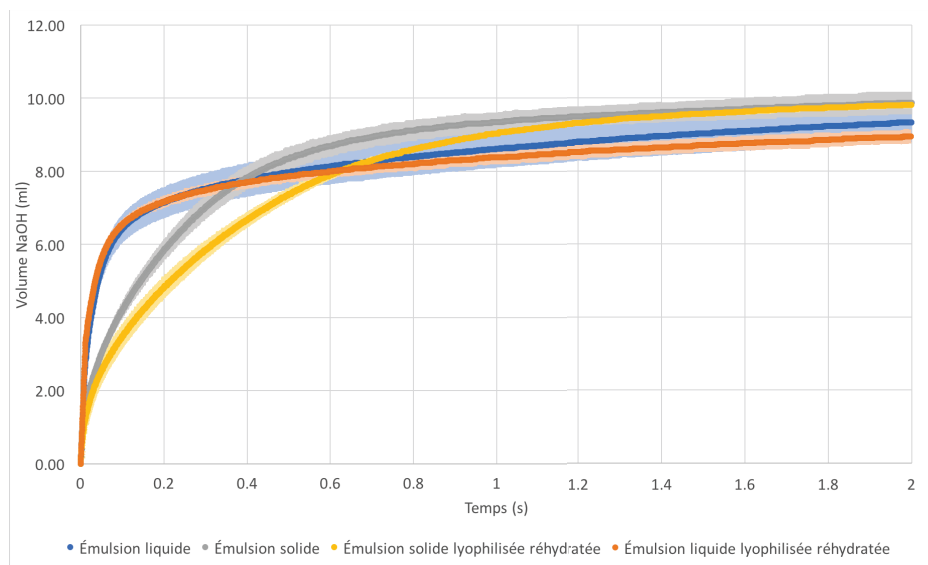


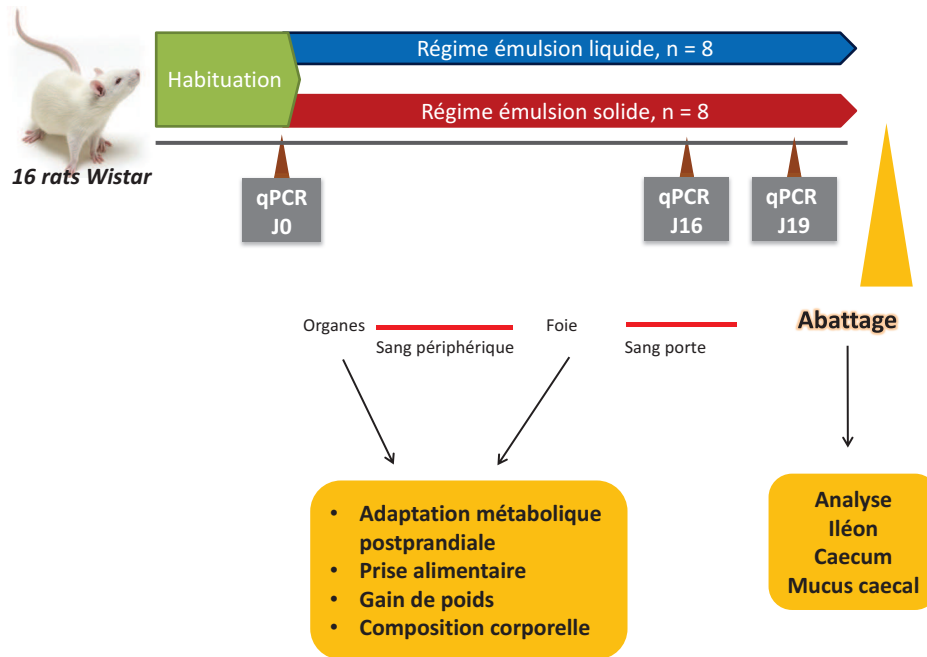
FIGURE 6.3 – Cinétiques de titration pH-stat durant la digestion intestinale *in vitro* pour les émulsions liquides et solides fraîchement produites (LE et SE), ou après lyophilisation puis réhydratation (la quantité d'eau nécessaire était rajoutée et l'émulsion était mise sous agitation douce durant 30 min).

2 De la digestion *in vitro* vers l'étude des effets physiologiques de la digestion des émulsions de différentes structures en condition *in vivo*

L'objectif du projet ALIAS était d'étudier et comprendre l'impact de la modification de la structure des aliments via le procédé sur la physiologie et le microbiote. Les unités de recherche PNCA (Physiologie de la Nutrition et Comportement Alimentaire) et MICALIS (Microbiologie de l'Alimentation au Service de la Santé) avaient plus spécifiquement en charge respectivement les volets physiologie digestive et impact sur le microbiote.

Des rats mâles, de race Wistar, ont été divisés en 2 groupes de 8, l'un recevant un régime contenant l'émulsion liquide (LE), l'autre l'émulsion solide (SE). Le rat était nourri ad libitum. Ils ont été nourris pendant 3 semaines. Leur poids et leur prise alimentaire ont été mesurés. Leurs fèces étaient régulièrement récupérées et congelées. Au bout d'une semaine, ils étaient suivis durant 24 h dans une cage métabolique qui permet de mesurer les gaz inspirés/expirés et de déterminer la part respective du métabolisme des glucides et des lipides. Au bout des 3 semaines, les rats étaient sacrifiés. Le sang de la veine porte était immédiatement prélevé pour analyse du plasma, et un certain nombre d'organes étaient récupérés et pesés, notamment pour avoir des éléments sur la répartition de la prise de masse. Parmi les prélèvements biologiques récupérés, l'hypothalamus permet de mesurer l'expression des neuropeptides anorexigènes et oréxigènes, tandis que l'intestin grêle, le cæcum (sac anatomique à la sortie de l'iléon qui débouche sur l'appendice, particulièrement développé chez les rongeurs) et le côlon permettent, par rinçage, sectionnement et grattage, d'avoir des échantillons pour analyse de la muqueuse et du microbiote luminal et adhérent. Le déroulement de l'expérimentation et les différents types de prélèvements réalisés sont résumés sur la Figure 6.4.

Seul un résumé des principaux résultats obtenus lors de cette expérimentation animale sont présentés ici. Si la prise alimentaire et la prise de poids étaient identiques avec les deux régimes, les résultats ont effectivement montré, et à notre connaissance pour la première fois, des différences au niveau physiologique et microbiologique. Pour le régime LE, plus de matière est trouvée dans le cæcum (matière sèche et eau), de même que plus d'isovalérate, un acide gras à chaîne courte issu de la fermentation des acides aminés branchés (leucine), dont les protéines de lactosérum sont particulièrement riches (Fig. 6.5). Ceci peut être interprété comme un effet de séjour plus long des protéines dans le tube digestif au niveau du cæcum, peut-être à cause d'une protéolyse moins avancée dans les étages supérieurs lié à l'état natif

FIGURE 6.4 – Schéma temporel de l'étude *in vivo* et des analyses associées

des protéines et/ou à un transit gastro-intestinal plus rapide de l'émulsion liquide. Un temps de contact plus long entre le microbiote caecal et les résidus protéiques, qu'il s'agisse des protéines alimentaires et/ou endogènes pourrait aussi être à l'origine de ce résultat (Davila *et al.*, 2013). L'expression postprandiale des peptides proglucagon est aussi plus haute au niveau du caecum, ce qui pourrait être en relation avec une action hyperglycémiante de l'émulsion liquide (le glucagon est un antagoniste de l'insuline). Plus de GLP-1 (glucagon-like peptide-1) est également trouvé dans le plasma porte pour l'émulsion liquide. Ce neuropeptide est sécrété au niveau de l'iléon par clivage du proglucagon. Son action est notamment hypoglycémiante et satiétogène. Plus de transporteurs des acides aminés sont exprimés au niveau de l'intestin. L'expression des transporteurs des lipides au niveau intestinal n'a pas montré de différence mais moins d'acides gras non estérifiés (AGNE) sont trouvés dans le plasma avec l'émulsion liquide. Compte tenu des interactions métaboliques entre l'insulinémie, la glycémie et la concentration plasmatique en AGNE, il conviendrait donc de vérifier si cette observation serait associée à l'établissement de marqueurs de résistance à l'insuline chez les animaux ayant été nourris avec l'émulsion solide.

Le microbiote a significativement été modifié entre les deux régimes en termes d'abondance des populations microbiennes (Fig 6.6). Les tendances trouvées dans le caecum sont aussi observées au niveau de l'iléon. Il apparaît donc que ces changements concernent en premier

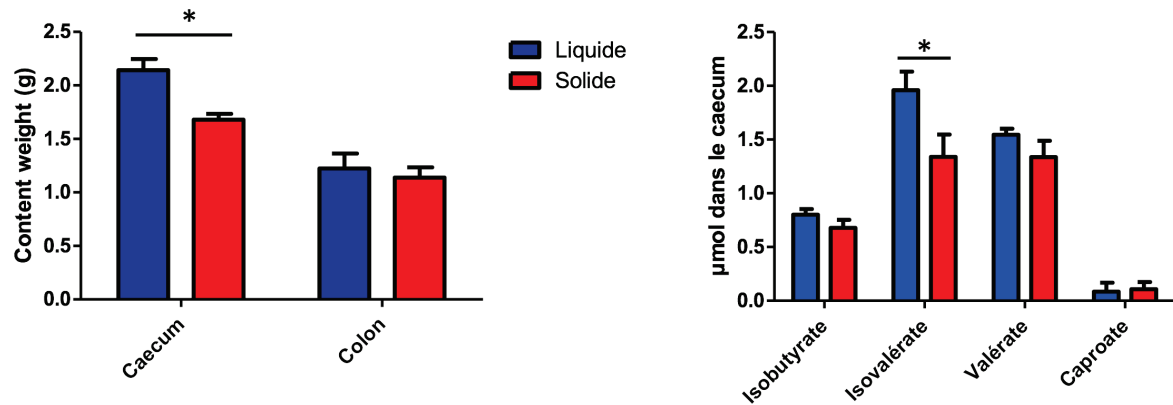


FIGURE 6.5 – Poids des contenus du cæcum et du côlon, et quantité d'acides gras à chaîne courte dans le cæcum des rats, après abattage, nourris avec l'émulsion liquide ou solide (adapté de présentations de Martin Beaumont sur l'avancement du projet ALIAS).

lieu les parties distales de l'intestin. Il est notamment observé que les espèces impliquées dans la fermentation des protéines sont favorisées dans le cas de l'émulsion liquide, tandis que celles favorisées dans le cas de l'émulsion solide se rapprochent de microbiotes de rats en régimes hyperlipidique.

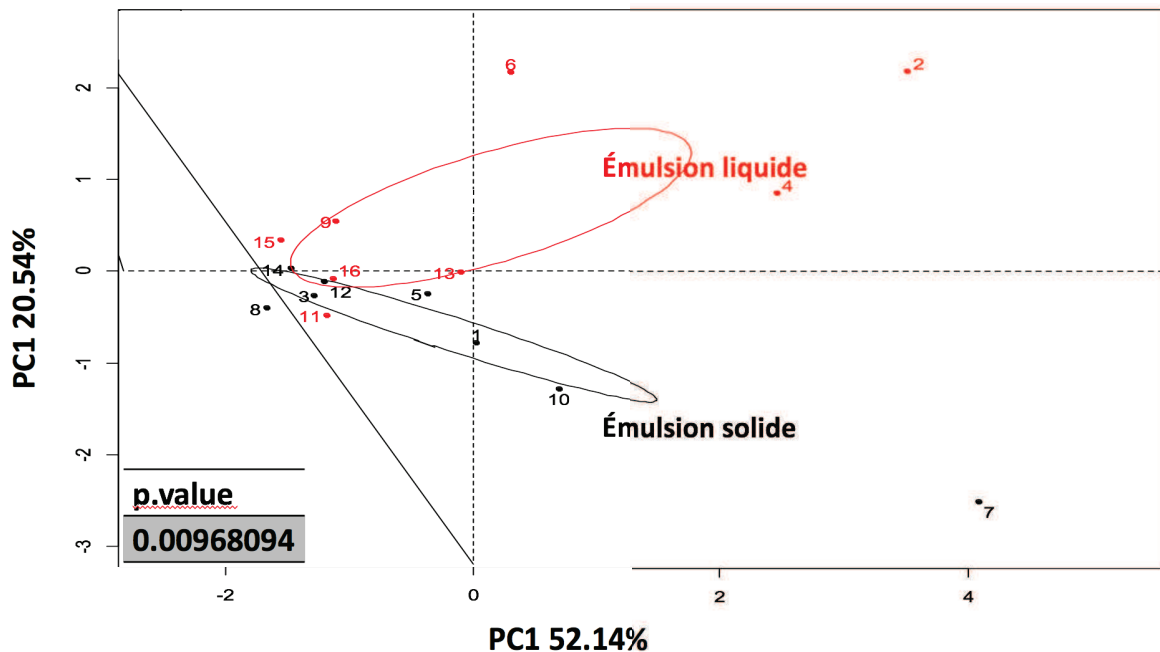


FIGURE 6.6 – Analyse par composante principale des différences entre les régimes des rats sur la composition du microbiote récupéré dans les fèces (adapté de présentations de Daphné Jaoui sur l'avancement du projet ALIAS).

Ces résultats sont présentés dans un article écrit en commun avec tous les collaborateurs, et qui sera soumis début 2017. Le passage de l'*in vitro* à l'*in vivo* est difficile et les interprétations évoquées ici sont provisoires et à prendre avec prudence. Ces résultats sont en effet en

cours de validation grâce à une seconde étude *in vivo* réalisée courant 2016. Cette deuxième étude visait à suivre les cinétiques de digestion des protéines en utilisant des protéines marquées isotopiquement (^{15}N). Les résultats sont en cours d'analyse.

Il faut noter que l'interprétation des effets mesurés en conditions *in vivo* peut se faire sur la base d'effet sur le temps de transit ou sur l'efficacité des processus de digestion des macronutriments par les activités enzymatiques exocrine du pancréas (digestibilité). Alors qu'*in vitro* le transit n'est pas simulé, la comparaison avec la situation *in vivo* peut s'avérer délicate. On peut notamment se demander si le temps de vidange gastrique a été modifié entre les régimes et se poser la question des conséquences en termes métaboliques et physiologiques. Un des buts de la seconde étude *in vivo* est justement de faire des analyses en cinétique, avec des rats non plus nourris ad libitum mais avec des petits repas contenant une des deux émulsions avec un sacrifice à des temps distincts. Ce design expérimental permet de s'assurer de la consommation rapide et totale des repas, et donc de disposer d'expériences avec une cinétique postprandiale précise.

Les premiers résultats décrits ici montrent néanmoins le grand intérêt d'une collaboration entre scientifiques de différentes disciplines. Nous avons pu montrer les effets de la structure des émulsions sur le microbiote. Il s'agit d'une première observation et il sera nécessaire d'aller plus loin pour mieux comprendre les mécanismes expliquant ce résultat.

Le résultat majeur de cette première étude *in vivo* du projet ALIAS a donc été d'observer des effets « structure » de l'aliment en conditions *in vivo* pour deux émulsions de structures très différentes. Sur la base de l'étude *in vitro*, nous proposons maintenant une analyse des effets « structure » sur l'ensemble des résultats obtenus dans ce travail de thèse.

3 Structure des aliments et suivi couplé de la digestion des protéines et des lipides

Le travail de cette thèse s'est essentiellement concentré sur certains leviers de la structure de la matrice alimentaire et l'étude couplée de la digestion des protéines et des lipides. En effet, l'état de l'art établi sur les effets de structure sur la digestion de matrices de type émulsion (Chap. 1), a permis d'identifier, en dehors de la nature des lipides, trois principaux paramètres impactant la lipolyse (Fig. 6.7) :

- La phase continue qui selon sa structure, au niveau macro et/ou méso, peut moduler l'accessibilité de la lipase vers les interfaces des gouttelettes lipidiques.
- La nature de l'interface des gouttelettes d'huile dispersées et leurs interconnexions

avec la phase continue.

- La taille des gouttelettes (échelles micro).

Concernant la protéolyse, de la même façon, différents paramètres peuvent moduler la réaction enzymatique :

- La nature des protéines et leur niveau de dénaturation (échelle moléculaire).
- Le réseau protéique auquel elles participent (échelle macro et méso).

La Figure 6.7 reprend les paramètres de structure impactant les cinétiques de digestion et étudiés dans le cadre de ce travail.

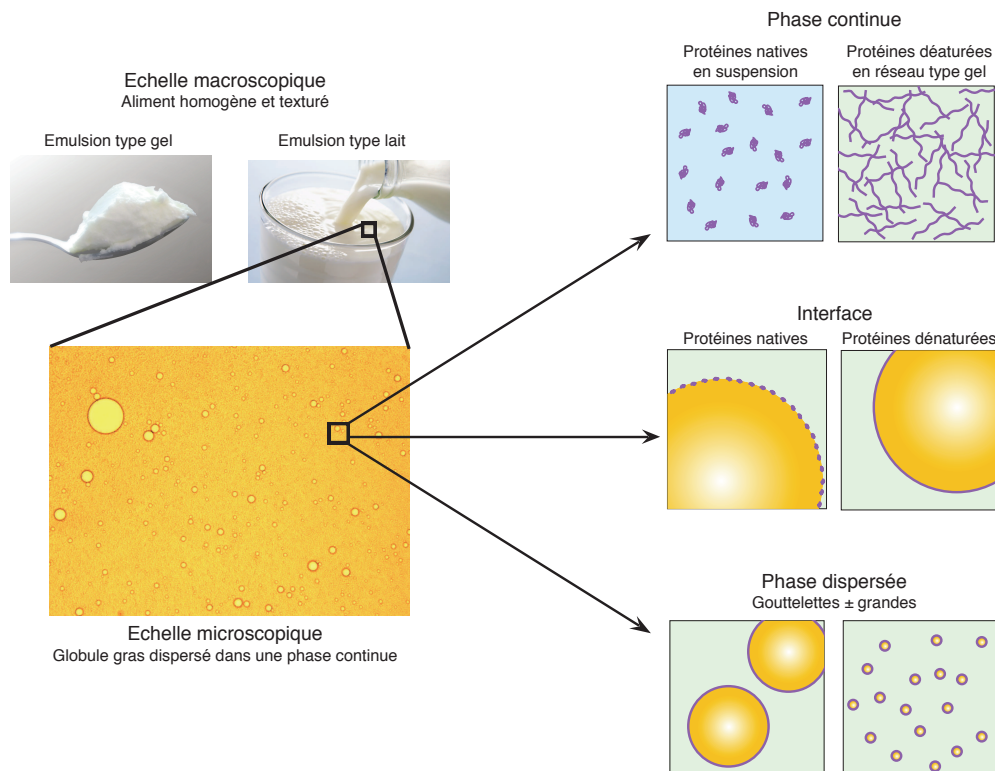


FIGURE 6.7 – Représentation schématique des paramètres de structures d'une émulsion influençant la libération des lipides et des protéines lors de la digestion.

Un grand nombre de conditions ont pu être étudiées lors de l'étude *in vitro*. Le Tableau 6.2 reprend l'ensemble des degrés d'hydrolyse obtenus pour les lipides et protéines, en fin de phase gastrique et/ou de phase intestinale.

3.1 Influence de la taille des gouttelettes

La lipolyse intestinale, qui a été ici la seule étudiée, est une réaction interfaciale. La vitesse et le niveau d'hydrolyse sont donc corrélés à la surface d'échange entre la phase aqueuse et les gouttelettes de lipides. Ainsi, une taille réduite de gouttelettes d'huile dispersées mène à

Tableau 6.2 – Ensemble de degrés d'hydrolyse obtenus pour les lipide et protéines, en phase gastrique et/ou intestinale.

Phase continue liquide				Phase continue Solide			
Matrices (Chapitre correspondant)	DH Gastrique		DH final	Matrices (Chapitre correspondant)	DH Gastrique		DH final
	Protéines	Lipides	Protéines		Protéines	Lipides	Protéines
LE (5)	3,4	62,5	51,7	SE (5) haché	5,8	47,0	57,4
LE (2)	-	50,6 ^a	51,9 ^a	SE (2) haché grossièrement	-	80,6 ^{*a}	79,8 ^{*a}
LCP (5) ^c	3,8	-	51,7	SCP(5) ^c haché	5,7	-	57,4
LCP (2)	-	-	51,9	SCP (2) haché grossièrement	-	-	79,8 ^{*a}
LE (4)	3,5	-	-				
				SEc (5) haché	6,0	48,1	57,4
				SE+ (5) haché	5,7	72,7	57,4
				SE ^b haché (3)	-	70,6	47,0
				SE ^b cubes 0,5 cm (3)	-	50,0	42,5
				SE ^b cubes 1 cm (3)	-	69,5	48,3

^a Niveau final sans connaissance des niveaux atteints durant la phase gastrique

^b Matrices au pH ajusté à 7 et sans phase gastrique préliminaire

^c LCP et SCP renommées L-FFM et S-FFM dans le chapitre 5

* Sur-titration liée à la taille des particules probable

augmentation de la quantité d'interface développée dans l'émulsion (50 m² d'interface pour une émulsion contenant 10 % d'huile dispersée en gouttelettes de 1,2 µm de diamètre, contre 3,2 m² d'interface pour les émulsions avec des gouttelettes de 19 µm de diamètre), offrant ainsi aux lipases plus de sites d'action et un niveau final d'hydrolyse plus haut. Cet effet est effectivement reporté dans la littérature comme un effet majeur. Ainsi, la conception des deux émulsions SE et LE s'est appuyée sur cette connaissance (Chap. 2). Deux tailles très différentes, aux alentours de 1 µm dans le cas de l'émulsion liquide (LE), et de 20 µm dans celui de l'émulsion solide (SE) ont été obtenues pour les deux émulsions.

Le niveau de lipolyse final était bien plus haut avec LE qu'avec SE, s'il l'on néglige le résultat obtenu pour SE dans le Chapitre 2 pour lequel on soupçonne un biais lié à une sur-titration induite par un hachage plus grossier (Tableau 6.2). Ces différences de quelques pourcents demeurent faibles néanmoins, ce qui peut s'expliquer par une coalescence rapide des gouttelettes dans l'émulsion liquide comme démontré dans [Giang *et al.* \(2015\)](#) pour des émulsions comparables, gommant ainsi une grande partie des effets initialement espérés. Le seul point de comparaison portant sur des gouttelettes de tailles différentes dispersées dans une même phase continue concerne l'étude de la digestion *in vitro* d'émulsions solides (Chap. 5). En fin de phase intestinale un taux de lipolyse 55 % plus élevé est obtenu dans l'émulsion solide contenant de petites gouttelettes (SE+) comparé à l'émulsion solide contenant de grosses gouttelettes (SE) (Tableau 6.2), ce qui confirme bien l'importance de la taille des gouttelettes sur la lipolyse.

3.2 Influence de l'état de la phase continue

Une des hypothèses de départ qui a guidé la conception des émulsions était qu'un état physique liquide de la phase continue puisse faciliter l'accès des enzymes, par rapport à une phase solide, où ces dernières doivent diffuser avant d'atteindre leurs substrats.

Cette hypothèse fut effectivement observée lors de la première série de digestions *in vitro* (Chap. 2) et confirmée également dans le dernier chapitre de résultats (Chap. 5). Les vitesses initiales d'hydrolyses (ou d'ajout de titrant en début de phase gastrique comme intestinale) sont systématiquement plus importantes dans le cas des matrices liquides (émulsions ou juste protéines seules). Toutefois, les taux d'hydrolyse protéique en fin de phase intestinale restent du même ordre de grandeur (Tableau 6.2). Si une différence a été trouvée lors de la première série de digestion (Chap. 2, 79,8 et 51,9 % pour la solution gélifiée et la solution native respectivement), elle n'a pas été confirmée par la suite en phase intestinale seule (Chap. 3 et Chap. 5) (Tableau 6.2). Comme précédemment expliqué, cet écart observé entre LE et

SE pour la protéolyse en fin de phase intestinale pourrait être expliqué par une meilleure maîtrise du protocole de digestion des émulsions solides et notamment par l'importance de réajustement de pH entre les phases gastriques et intestinales, très sensible à la taille des morceaux.

De façon plus complexe, l'hydrolyse des lipides est aussi impactée par l'état physique solide ou liquide de la phase continue protéique. Une émulsion solide à petite gouttelettes (SE+) permet en effet d'atteindre un niveau final de lipolyse supérieur à celui atteint pour l'émulsion liquide contenant des gouttelettes tout aussi petites (LE) (Tableau 6.2). L'état solide, qui ralentit la protéolyse, permet de ralentir également la coalescence des gouttelettes et donc de maintenir une accessibilité interfaciale à la lipase. Ce résultat illustre un premier niveau d'interaction entre protéolyse et lipolyse, expliqué par la nature physique de la phase continue de l'émulsion. Le suivi des hydrolyses dans le cas de morceaux de différentes tailles, ont conduit également à préciser ce type d'interaction entre protéolyse et lipolyse. L'effet de la taille des particules sur la cinétique de lipolyse semble être le résultat d'une compétition cinétique entre la libération des gouttelettes d'huile, gouvernée par la cinétique de la protéolyse, la déstabilisation des gouttelettes d'huile libérées (probablement coalescence) et l'activité de la lipolyse pancréatique.

L'état physique des émulsions solides est le résultat du traitement thermique, appliqué aux protéines en solution. C'est le processus de dénaturation puis de gélification par réticulation des chaînes entre elles, qui entraînent le changement de structure. Ainsi, les différences entre les émulsions SE et LE, ne se déclinent pas uniquement au niveau macroscopique de l'état physique de la phase continue. Elles sont aussi le résultat de différences au niveau moléculaire et participent également aux différences observées lors de la digestion *in vitro*. Durant la phase gastrique un lien clair entre le niveau de dénaturation des protéines et le degré de protéolyse a été établi (Tableau 6.2, taux d'hydrolyse en moyenne de 3,5 % et de 5,8 % pour LE et SE respectivement). Les protéines natives sont moins susceptibles à l'hydrolyse par la pepsine que les protéines dénaturées (Chap. 5). La sensibilité à l'hydrolyse de β -lactoglobuline dénaturée est expliquée par l'exposition de plus de sites de sa séquence d'acides aminés à l'action de l'enzyme suite à son changement de conformation lors du traitement thermique. Si le degré d'hydrolyse est environ 1,6 fois supérieur en phase gastrique pour les protéines dénaturées, des niveaux finaux du même ordre de grandeur d'hydrolyse sont obtenus à l'issue de la phase intestinale (52 % et 57 % pour LE et SE respectivement), expliqués par une action très efficace

des protéases intestinales.

L'influence de la phase gastrique sur la digestion ne doit cependant pas être négligée, puisque l'effet d'une légère avance pourrait avoir une importance plus grande *in vivo* si l'on considère des questions de temps de séjour dans l'estomac puis dans les intestins. Non simulé par la méthode de digestion statique, il est probable que l'émulsion liquide (LE) ai un temps de séjour plus court dans l'estomac que l'émulsion solide (SE), accentuant les écarts de protéolyses par la pepsine entre les deux émulsions.

3.3 Influence de l'interface

La composition de l'interface des gouttelettes lipidiques, sa résistance à la rupture, à la déstabilisation et sa capacité à faciliter l'action des lipases dans le tractus digestif sont des points abordés dans la littérature, notamment par des titrations pH-stat. En tant que paramètre identifié comme influent sur la digestion, dès la phase de conception des émulsions, une attention particulière a été apportée à l'état des protéines à l'interface huile/eau. Pour les émulsions gélifiées en particulier, un traitement thermique en deux étapes a été mis en place afin de stabiliser l'interface des gouttelettes et de les protéger d'un phénomène de coalescence non maîtrisé pendant le deuxième traitement thermique. Il a d'ailleurs été observé, lors du passage à l'échelle pilote, que cette étape de dénaturation des protéines à l'interface permettait de protéger les gouttelettes vis-à-vis de la coalescence et ainsi d'allonger à au moins une semaine la stabilité de l'émulsion si elle ne subissait pas immédiatement le chauffage permettant de dénaturer la phase continue et de la solidifier. Les hypothèses sous-jacentes étaient qu'une gélification localisée à l'interface encapsulerait la phase dispersée, la rendant plus difficile d'accès aux lipases, ou alors qu'une sensibilité accrue de l'interface à la protéolyse la rendrait plus instable et limiterait alors la lipolyse. Cette interface n'a toutefois pas été caractérisée plus avant mais son éventuel impact sur la digestion a été évalué en comparant les hydrolyses observées lors de la digestion d'une émulsion gélifiée en une seule étape de chauffage (SEc) et celle d'une émulsion gélifiée en deux étapes (SE) (Chap. 5). Aucune influence de l'état des protéines à l'interface n'a été observée en phase gastrique comme en phase intestinale. Il aurait pu être intéressant de vérifier cet effet colonisation et gélification de l'interface sur l'émulsion liquide (LE) sur la digestion. Cependant, les travaux de [Sandra et al. \(2008\)](#) semblent montrer que même un traitement plus important à la chaleur (85 °C, 20 min) n'impacte pas la lipolyse d'une émulsion liquide stabilisée par de la β -lactoglobuline. Toutefois, dans ce cas, les auteurs ont choisi de travailler avec un fluide digestif ne contenant pas de protéases, ne permettant pas de répondre à la question d'un effet interface si

un couplage entre protéolyse et lipolyse était observé. Au vu de la forte concentration en protéines de tous les aliments testés durant le travail expérimental de cette thèse, il est aussi possible qu'un effet interface passe inaperçu, même s'il existe, puisque la grande majorité des protéines sont dans la phase continue.

Au-delà de l'interface, nous avons pu mettre en évidence l'importance du niveau de fragmentation de l'émulsion solide et donc de la surface de contact générée avant la digestion, sur les cinétiques de protéolyses mais aussi de lipolyses. Les constantes de vitesse d'hydrolyse des protéines sont directement corrélées à la surface d'échange obtenue par la taille de découpe des fragments de gel, et les cinétiques de lipolyses sont d'autant plus ralenties que cette taille augmente (Chap. 3).

4 Des avancées méthodologiques

Au-delà des connaissances acquises sur les effets structures d'une émulsion sur les cinétiques de digestion des protéines et des lipides, ce travail a permis des avancées méthodologiques que nous souhaitons mettre ici en avant.

4.1 Le pH-stat : méthode adaptée pour la digestion intestinale de matrices complexes

Sur le volet méthodologie, le travail réalisé présente l'originalité d'utiliser le pH-stat pour suivre l'hydrolyse intestinale des lipides et des protéines. Nous avons montré qu'il était possible de déterminer les degrés d'hydrolyse de chacun de ces nutriments, là où la grande majorité des études se concentrent sur un seul nutriment. La conception systèmes modèles à la structure maîtrisée nous a permis dans un premier temps de formuler des matrices sans lipides, pour distinguer la protéolyse seule, et de déduire ensuite la lipolyse par comparaison au suivi de l'hydrolyse totale, lipolyse et protéolyse. Dans un deuxième temps, nous avons démontré l'intérêt de l'inhibition de la lipase intestinale par de l'Orlistat pour l'étude de la protéolyse découplée de la lipolyse. Cette molécule a été mise au point pour des applications pharmacologiques à visée de réduction de la prise des lipides chez des personnes obèses. Si son efficacité a été démontrée *in vivo* et *in vitro*, elle n'est pas utilisée couramment dans des protocoles de digestions *in vitro*. Par ailleurs, l'Orlistat n'est pas un inhibiteur irréversible et son action n'est pas instantanée. Dans le cadre de ce travail, l'objectif était cependant d'inhiber immédiatement la lipolyse pour ne suivre que la protéolyse au niveau du pH-stat. L'Orlistat a été ajouté au mélange intestinal contenant la matrice alimentaire, avant ajout

des enzymes intestinales. Les résultats observés préliminairement et ceux présentés dans le dernier article (Chap. 5) montrent que ce mode opératoire assure une inhibition satisfaisante pour évaluer la contribution issue de la protéolyse. Les profils de titration d'émulsions avec Orlistat sont très semblables à ceux obtenus pour des matrices ne contenant que des protéines. Ceci montre que l'utilisation d'Orlistat, dans les limites testées du protocole, permet potentiellement de pouvoir étudier des aliments complexes dans lesquels la matière grasse ne peut pas être supprimée sans modifier profondément la structure. La méthode d'introduction de l'Orlistat pourrait être améliorée. Par exemple, il aurait peut-être été préférable de l'ajouter au mélange d'enzymes qui est hydraté et mis à température 10 minutes avant son ajout au reste du milieu pour démarrer la phase intestinale. Cela aurait donné un temps préliminaire à la molécule pour s'associer à la lipase, avant la mise en présence avec les lipides de la matrice.

Au-delà de la digestion des protéines et des lipides, nous avons souhaité évaluer le potentiel de la méthode pH-stat pour des matrices encore plus complexes. Pour cela, l'ajout d'amidon de riz à différentes concentrations (10 et 20 % en poids) a été testé. Comme supposé, l'hydrolyse intestinale par les amylases n'a pas donné lieu à un changement de pH (pas d'ionisation des oses libérés) et n'a donc pas gêné le suivi de l'hydrolyse des autres nutriments. Le pH-stat pourrait ainsi permettre d'étudier des effets structure obtenue par les glucides, sur la libération des autres nutriments.

Le travail réalisé dans cette thèse s'est également intéressé à la détermination des taux d'hydrolyse à partir de la connaissance des volumes d'acide ou de soude ajoutés. Des mesures complémentaires sont nécessaires afin de déterminer des facteurs correctifs pour passer des volumes de titrant ajoutés durant la digestion à des degrés d'hydrolyses. Il s'agit notamment d'estimer un degré moyen de dissociation des espèces produites titrées. Des corrections sont rarement trouvées dans la littérature. La méthode proposée est donc de réitérer en préliminaire la détermination de ces corrections, ce qui permet de facilement s'adapter à d'autres conditions d'expériences comme le type de lipides et de protéines.

4.2 La titration par pH-stat pour le suivi de la digestion d'émulsions « solides »

Les émulsions solides présentent une difficulté à la conduite de protocoles *in vitro* statiques car une étape supplémentaire de fragmentation est nécessaire avant toute digestion. Par ailleurs, cette fragmentation doit être capable de simuler correctement le processus mécanique oral puis de l'estomac. Cette difficulté explique probablement l'omniprésence d'ali-

ments liquides ou semi-liquides dans la littérature portant sur l'étude de digestion *in vitro*. Les études sur des aliments « solides » sont beaucoup moins nombreuses. Nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'influence de la taille des fragments au cours de digestion statique *in vitro* (Chap. 3). Si celle-ci a des effets sur la libération des nutriments, elle en a aussi sur la conduite du protocole de titration pH-stat. Un hachage de l'émulsion est nécessaire afin d'avoir une dégradation complète de l'aliment tel que recommandé par le protocole Infogest (Minekus *et al.*, 2014) et de permettre une détermination facilitée des degrés d'hydrolyse. Ce protocole a cependant des limites pour les plus gros fragments. Il faut alors bien contrôler l'effet de la phase gastrique durant laquelle le fragment se charge de protons, car ceux-ci sont ensuite libérés durant la phase intestinale et peuvent conduire à une sur-titration et donc à une surestimation des degrés d'hydrolyse. Par ailleurs, diminuer trop fortement la taille des morceaux risque de masquer voir faire disparaître les effets structures du produit testé. Il faut donc trouver un compromis de taille pour limiter l'effet de chargement en proton au cours de la phase gastrique tout en conservant des morceaux dont la structure peut influencer la cinétique de digestion.

4.3 La titration par pH-stat pour le suivi de la digestion en phase gastrique

Un défaut d'usage du pH-stat en phase gastrique avait été identifié dans la littérature. Dans le Chapitre 4, essentiellement méthodologique, un titrant acide (HCl) est ainsi utilisé à la place du NaOH habituel pour les phases intestinales, afin de maintenir le pH constant à 3, et de suivre ainsi la protéolyse gastrique par la pepsine. Le mode opératoire reste très proche de celui de la titration pH-stat intestinale habituelle, mais les conversions en degré d'hydrolyse semblent beaucoup plus précises dans la mesure où presque tous les peptides sont titrés dès lors que le pH est suffisamment acide (*i.e.* ≤ 3). De plus, si une première démonstration de ce suivi en phase gastrique par pH-stat a été réalisé sur l'émulsion liquide (LE), ce dernier a ensuite été appliqué avec succès aux émulsions solides étudiés dans le dernier chapitre de résultats (Chap. 5).

Une autre originalité du travail sur la phase gastrique est la proposition d'utiliser la titration pour réaliser une descente de pH jusqu'à pH 2 comme dans les protocoles dynamiques de digestion. Les résultats obtenus sont compatibles avec la littérature et permettent d'aller vers une complexification du protocole Infogest, simulant les conditions de pH changeantes de l'estomac et non moyennée à pH 3. Si la première étape du protocole peut sembler lourde à mettre en œuvre – 3 descentes différentes de pH, sans pepsine, avec pepsine, après digestion avec pepsine, puis traitement des données important – elle reste adaptable à un grand nombre

de protéines et ouvre des perspectives nombreuses. Dans tous les cas, elle était nécessaire pour bien caractériser les différents processus en jeu. Par ailleurs, nos résultats montrent que la correction des volumes de titrant au cours d'une acidification par l'état d'ionisation des peptides était finalement négligeable, du moins pour les protéines sériques. Il est donc probable que seules les descentes en pH avec et sans pepsine soit réellement utile dans la grande majorité des cas.

Conclusions et Perspectives

Conclusions

Dans un contexte général de recherche en nutrition, le projet ALIAS dans lequel s'inscrit ce travail, avait pour un de ses objectifs, de mieux comprendre les liens entre l'aliment dans toute sa complexité (*i.e.* avec ses caractéristiques de structures et deux de ses composants omniprésents, les protéines et les lipides) d'une part, et sa digestion d'autre part. Il s'agissait plus particulièrement, au travers d'une démarche très pluridisciplinaire rassemblant des scientifiques des sciences des aliments, de la physiologie digestive et de la microbiologie, d'éclairer les effets structures de l'aliment sur la physiologie digestive et le microbiote.

Le travail s'est appuyé sur une approche *in vitro* de la digestion et sur l'étude de l'hydrolyse simultanée de deux macronutriments, les lipides et les protéines, dans des matrices complexes. L'objectif principal était de comprendre comment et dans quelle mesure, il est possible de moduler l'hydrolyse de ces deux nutriments lors de la digestion de produits en contenant.

Pour y répondre la démarche expérimentale a cherché dans une première étape, à concevoir deux émulsions aux caractéristiques de structures les plus opposées possible en termes de cinétiques de digestion des lipides et des protéines. Une méthodologie de suivi cinétique des hydrolyses à la fois des lipides et des protéines en phase intestinale a ensuite été mise au point, basée sur la technique de la titration pH-stat et adaptée au protocole Infogest. Cette première phase a permis d'observer des effets de structure *in vitro* et de lancer une première expérimentation *in vivo* sur modèle rat, sur la base de ces deux émulsions. Les premiers résultats de l'étude *in vivo* ont mis en évidence des effets sur le microbiote et sur des marqueurs physiologiques. Ces résultats ont conduit au design d'une deuxième étude *in vivo* dont les résultats sont en cours d'exploitation.

Suite à ces premiers résultats un travail méthodologique sur la digestion *in vitro* a été réalisé. Ce dernier a permis l'intégration du suivi cinétique de la protéolyse gastrique précédant la phase intestinale, afin de proposer un protocole de digestion statique le plus complet possible. Les paramètres de structure des aliments influant sur la digestion aux différents étages de la digestion ont été mieux identifiés et hiérarchisés. Ainsi l'état de la phase continue, liquide ou solide, a été identifié comme un paramètre clé contrôlant la vitesse d'accès des enzymes aux substrats. La taille des fragments des émulsions solides a donc été également considérée avec attention lors des études *in vitro* statiques : les plus gros ralentissent d'autant plus les réactions, mais peuvent aussi fausser la mesure par titration. La taille des gouttelettes dans les émulsions solides comme liquides est un autre facteur majeur : plus elles sont petites, plus la réaction de lipolyse peut aller loin et vite, grâce à une surface développée plus importante pour l'accès des enzymes. De plus, des effets combinés entre protéolyse et lipolyse ont été mis en évidence. Par exemple, nous avons montré que les niveaux finaux de lipolyse dans le cas d'une émulsion solide avec des petites gouttelettes étaient plus élevés que pour une émulsion liquide possédant la même taille de gouttelettes. Ce résultat peut s'expliquer par l'effet de la phase continue qui tout en ralentissant la protéolyse, stabilise et limite les phénomènes de coalescence permettant de maintenir une surface d'échange élevée au niveau des interfaces huile/eau. Enfin, ce travail n'a pas permis de mettre en évidence un effet de la structure de l'interface stabilisant les gouttelettes lipidiques, démontrant pour notre étude, que pour des émulsions à haute teneur en protéines, ce paramètre de structure serait moins important. Ce travail de thèse, associé aux résultats des études *in vivo*, aura permis de mettre en évidence des effets de structure à plusieurs niveaux sur les cinétiques d'hydrolyses, la physiologie et le microbiote. Il conforte l'idée qu'au-delà de la composition, la structure d'un aliment doit être prise en compte dans les études nutritionnelles. Il met également en avant l'intérêt de créer à façon des aliments, par une connaissance des procédés, dans une optique de conception d'une offre alimentaire plus personnalisée prenant en compte des critères de santé et bien-être.

Perspectives

Ce travail ouvre sur des perspectives nombreuses. D'un point de vue technologique, il serait possible par exemple par des circuits microfluidiques ou encore des jets ultrasoniques de concevoir des émulsions avec des tailles de gouttelettes comprises entre 10 et 100 nm et donc beaucoup plus fines que celles étudiées ici (Boom *et al.*, 2015; McClements and Rao, 2011). Au-delà d'une maximisation des effets structures sur la lipolyse, l'intérêt de telles émulsions

pour étudier la bioaccessibilité de micronutriments lipophiles est un réel atout. Concernant la phase continue des émulsions, nous avons choisi de moduler les effets structures par l'application d'un traitement thermique qui présente l'avantage d'être un procédé simple mais qui impacte la structure à plusieurs niveaux : au niveau moléculaire et microscopique avec la dénaturation des protéines et la formation d'agrégats, et au niveau macroscopique avec un changement d'état d'une solution liquide à un gel solide. Cependant le traitement thermique des protéines n'est pas le seul qui aurait pu être appliqué pour modifier la structure de la phase continue des émulsions. La température de dénaturation, la durée du traitement, le pH et l'éventuel traitement mécaniques lors de la gélification permet une importante variation dans les microstructure de protéines agrégées et impacte les cinétiques de protéolyse (Macierzanka *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2014b). Des fibrilles peuvent aussi être obtenue (Brodkorb *et al.*, 2016). L'incorporation de matière grasse émulsionnée dans ces différentes structures pourrait donner lieu à des effets inédits sur la digestion des protéines comme des lipides et restent à explorer.

Si aucun effet n'a été observé sur l'impact de la structure et la nature de l'interface, elle n'en est pas moins une piste de recherche d'intérêt. De nombreuses variations sont possibles avec les différents émulsifiants alimentaires disponibles, ainsi que les technologies d'émulsification : particules colloïdales adsorbées (émulsions de Pickering), tensioactifs, complexes, émulsions multiples. Par ailleurs, les protéines émulsifiantes de sources végétales peuvent présenter des fonctionnalités inédites pour une émulsion (McClements and Gumus, 2016). Ainsi d'autres formulations visant une forte protection de l'huile dans les conditions du tractus digestif pourraient être proposées pour limiter la coalescence, limiter la lipolyse, ou ne déclencher celle-ci qu'après un certain moment, et pourraient se révéler une manière efficace d'apporter une valeur santé à une émulsion formulée à façon.

Enfin, le travail de cette thèse a permis d'avancer aussi sur le plan méthodologique en proposant une méthode robuste et efficace combinant les recommandations Infogest et le pH-stat, et capable de mettre en évidence des effets de structure sur les cinétiques d'hydrolyse des lipides et protéines. Des améliorations sont toujours possibles. Notamment, même si la lipolyse est limitée en phase gastrique, il reste important de pouvoir la prendre en compte. Cette dernière peut être critique pour la stabilité des émulsions et provoque aussi une hydrolyse partielle ainsi qu'un changement de l'interface (accumulation de produits de l'hydrolyse). Une évolution du protocole pourrait être d'utiliser une lipase gastrique, ce qui serait un

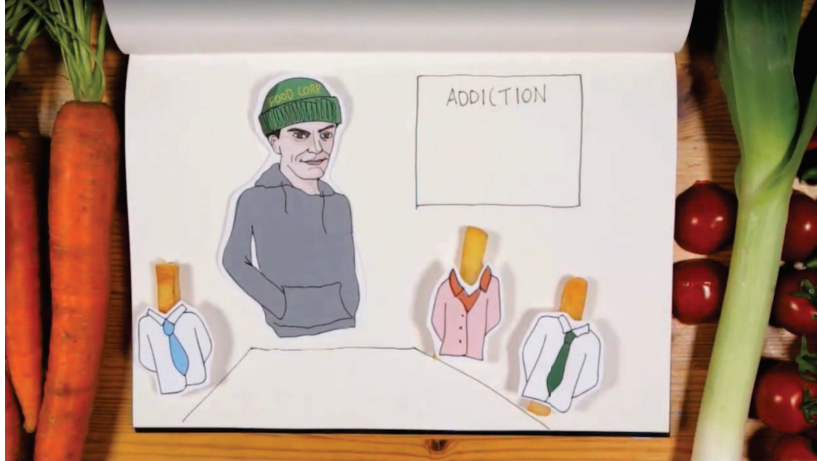
réel atout pour l'étude de la digestion *in vitro*. Enfin, l'apport du pH-stat à la digestion *in vitro* devrait permettre de cribler un certain nombre d'aliments, qu'il s'agisse d'aliments déjà commercialisés, d'aliments modèles, ou encore de nouveaux aliments innovants. Les premiers résultats obtenus dans le cadre d'un autre projet (Flexiprocess, financement Carnot Qualiment) en utilisant le protocole séquentiel décrit dans le Chap. 5 pour l'étude de la digestion de cakes enrichis en farine de pois montrent déjà la facilité et l'efficacité de ce protocole pour le suivi de la protéolyse comme de la lipolyse de produits pour lesquels il n'est pas possible de fabriquer un modèle « sans matière grasse » sans profondément changer la structure par rapport au produit d'origine « avec matière grasse ».

Le mot de la fin

Beaucoup de choses m'ont été données et apprises durant les 3 ans de ce doctorat, et ce manuscrit n'est malheureusement qu'une petite restitution de ma gratitude. Si la thèse était une histoire, il lui faudrait un épilogue ou une morale. Structure de l'aliment, complexité de l'interaction matrice-digestion, lien aliment-physiologie-microbiote.... Ces termes cachent des champs très actifs de la recherche. A mon sens, ce fourmillement d'idées et ces échanges entre domaines de connaissances sont aussi le reflet d'une prise de conscience de notre dilemme de l'omnivore (Pollan, 2006) : puisque l'on peut tout manger, que manger ?



La nourriture est aussi sociale et environnementale. Les paradoxes et abus en ce monde pourraient être lus au travers de la manière dont on mange, de fabriquer ce qui se mange, et de partager ce que l'on mange.



Le chemin est encore long pour arriver à un accès à la nourriture, et à la santé par la nourriture, qui soit juste envers les personnes et la nature. La science est un outil formidable pour éclairer cette situation, et j'espère que cette thèse n'est que le début de ma participation à cet effort.

Les pistes sont nombreuses, et le besoin de réponses et de moyens d'action est pressant dans nos sociétés. Au delà de la science il y a une morale que je retiendrais : à nos placards et à nos jardins, cuisinons et partageons !



FIGURE 6.8 – 2016 était l'année des légumineuses, l'occasion de s'intéresser à leurs propriétés nutritionnelles mais aussi de renouveler les repas et d'avoir moins d'impact sur l'environnement.

Références bibliographiques

- Adler-Nissen, J.** *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Science Limited (1986). ISBN 0853343861. URL http://books.google.fr/books?id=rP5qAAAAAAAJ&q=intitle:Enzymic+hydrolysis+of+food+proteins+isbn:0853343861&dq=intitle:Enzymic+hydrolysis+of+food+proteins+isbn:0853343861&hl=&cd=1&source=gsbs_api.
- Adler-Nissen, J., Eriksen, S., and Olsen, H.S.** Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*, volume 32(3-4) :411–423 (1983). doi :10.1007/BF01091198. URL <http://link.springer.com/10.1007/BF01091198>.
- Adouard, N.** *Les micro-organismes du microbiote fromager survivent-ils à la digestion et peuvent-ils avoir un effet immunomodulateur sur l'hôte ?* Ph.D. thesis (2015).
- Aguilera, J.M.** Seligman lecture 2005 food product engineering : building the right structures. volume 86(8) :1147–1155 (2006). doi :10.1002/jsfa.2468. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2468>.
- Aguilera, J.M.** *Edible Structures*. The Basic Science of What We Eat. CRC Press (2012). ISBN 1439898901. URL <https://www.crcpress.com/Edible-Structures-The-Basic-Science-of-What-We-Eat/Aguilera/p/book/9781439898901>.
- Aguilera, J.M. and Stanley, D.W.** *Microstructural Principles of Food Processing and Engineering*. Springer Science & Business Media (1999). ISBN 9780834212565. URL <http://www.springer.com/in/book/9780834212565>.
- Aguilera, J.M., Stanley, D.W., and Baker, K.W.** New dimensions in microstructure of food products. *Trends in Food Science & Technology*, volume 11(1) :3–9 (2000). doi :10.1016/S0924-2244(00)00034-0. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224400000340>.
- Armand, M.** Stratégies de contrôle de la biodisponibilité des lipides . In *Structure des aliments et effets nutritionnels*, pages 373–413. Quae Edition (2013). ISBN 978-2-7592-2013-7. URL <http://www.quae.com/fr/r3047-structure-des-aliments-et-effets-nutritionnels.html>.
- Armand, M., Pasquier, B., Andre, M., and Borel, P.** Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *The American journal ...* (1999). URL <http://ajcn.nutrition.org/content/70/6/1096.short>.
- Asselin, J., Hébert, J., and Amiot, J.** Effects of In Vitro Proteolysis on the Allergenicity of Major Whey Proteins. *Journal of Food Science*, volume 54(4) :1037–1039 (1989). doi :10.1111/j.1365-2621.1989.tb07938.x. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1989.tb07938.x>.
- Astwood, J.D., Leach, J.N., and Fuchs, R.L.** Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnology*, volume 14(10) :1269–1273 (1996). doi :10.1038/nbt1096-1269. URL <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nbt1096-1269>.

- Bakala-N'Goma, J.C., Williams, H.D., Sassene, P.J., Kleberg, K., Calderone, M., Jannin, V., Igonin, A., Partheil, A., Marchaud, D., Jule, E., Vertommen, J., Maio, M., Blundell, R., Benameur, H., Müllertz, A., Pouton, C.W., Porter, C.J.H., and Carrière, F. Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations. 5. Lipolysis of representative formulations by gastric lipase. *Pharmaceutical research*, volume 32(4) :1279–1287 (2015). doi : 10.1007/s11095-014-1532-y. URL <http://link.springer.com/10.1007/s11095-014-1532-y>.
- Barbé, F., Ménard, O., Gouar, Y.L., Buffière, C., Famelart, M.H., Laroche, B., Le Feunteun, S., Rémond, D., and Dupont, D. Acid and rennet gels exhibit strong differences in the kinetics of milk protein digestion and amino acid bioavailability. *Food Chemistry*, volume 143 :1–8 (2014). doi :10.1016/j.foodchem.2013.07.100. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613010297>.
- Barbé, F., Ménard, O., Le Gouar, Y., Buffière, C., Famelart, M.H., Laroche, B., Le Feunteun, S., Dupont, D., and Rémond, D. The heat treatment and the gelation are strong determinants of the kinetics of milk proteins digestion and of the peripheral availability of amino acids. *Food Chemistry*, volume 136(3-4) :1203–1212 (2013). ISSN 0308-8146. doi : 10.1016/j.foodchem.2012.09.022. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23194515>.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., and Woessner, J.F. *Handbook of Proteolytic Enzymes* (2004). ISBN 9780120796106. URL <https://www.elsevier.com/books/handbook-of-proteolytic-enzymes/barrett/978-0-12-079611-3>.
- Beaumont, M., Jaoui, D., Hovaghimian, A., Mondot, S., Mayeur, C., Leclerc, M., Goustard, B., Koeth, F., Douard, V., Mat, D.J.L., Le Feunteun, S., Souchon, I., Michon, C., Davila, A.M., Chaumontet, C., Blachier, F., Fromentin, G., and Tomé, D. Food structure impacts intestinal microbiota, caecal luminal content composition and distal intestine characteristics in rats. (A soumettre) (2017).
- Berdanier, C.D., Dwyer, J.T., and Heber, D. *Handbook of Nutrition and Food, Third Edition*. CRC Press (2013). ISBN 1466505710, 9781466505711. URL <https://www.crcpress.com/Handbook-of-Nutrition-and-Food-Third-Edition/Berdanier-Dwyer-Heber/p/book/9781466505711>.
- Blanquet-Diot, S., Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Denis, S., Peyron, M.A., and Alric, M. Les modèles *in vitro*. In *Structure des aliments et effets nutritionnels*, pages 321–335. Quae Edition (2013). ISBN 978-2-7592-2013-7. URL <http://www.quae.com/fr/r3047-structure-des-aliments-et-effets-nutritionnels.html>.
- Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M.P., Maubois, J.L., and Beaufrere, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, volume 94(26) :14930–14935 (1997). URL <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=9405716&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Bonnaire, L., Sandra, S., Helgason, T., Decker, E.A., Weiss, J., and McClements, D.J. Influence of Lipid Physical State on the in Vitro Digestibility of Emulsified Lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, volume 56(10) :3791–3797 (2008). doi :10.1021/jf800159e. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf800159e>.
- Boom, R.M., Schroën, K., Maan, A.A., Khan, M.K.I., and Nazir, A. Microfluidic emulsification in food processing. *Journal of Food Engineering*, volume 147 :1–7 (2015). ISSN 02608774. doi :10.1016/j.jfoodeng.2014.09.021. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877414003896>.
- Bornhorst, G.M., Hivert, H., and Singh, R.P. Rice bolus texture changes due to alpha-amylase. *LWT-Food Science and Technology*, volume 55(1) :27–33 (2014). doi :10.1016/j.lwt.2013.09.014. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643813003277>.
- Bornhorst, G.M. and Singh, R.P. Gastric digestion in vivo and in vitro : how the structural aspects of food influence the digestion process. *Annual Review of Food Science and Technology*, volume 5(1) :111–132 (2014). doi :10.1146/annurev-food-030713-092346. URL <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-food-030713-092346>.

- Brodkorb, A., Croguennec, T., Bouhallab, S., and Kehoe, J.J.** Heat-Induced Denaturation, Aggregation and Gelation of Whey Proteins. In *Advanced Dairy Chemistry*, pages 155–178. Springer New York, New York, NY (2016). ISBN 978-1-4939-2799-9. doi :10.1007/978-1-4939-2800-2_6. URL http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2800-2_6.
- Butterworth, P.J., Warren, F.J., and Ellis, P.R.** Human α -amylase and starch digestion : An interesting marriage. *Starch - Stärke*, volume 63(7) :395–405 (2011). doi :10.1002/star.201000150. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/star.201000150/full>.
- Çakır-Fuller, E.** Enhanced heat stability of high protein emulsion systems provided by microparticulated whey proteins. *Food Hydrocolloids*, volume 47 :41–50 (2015). doi :10.1016/j.foodhyd.2015.01.003. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X15000053>.
- Camacho, F., González-Tello, P., Páez-Dueñas, M.P., Guadix, E.M., and Guadix, A.** Correlation of base consumption with the degree of hydrolysis in enzymic protein hydrolysis. *Journal of Dairy Research*, volume 68(2) :251–265 (2001). doi :10.1017/S0022029901004824. URL http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0022029901004824.
- Cani, P.D.** Modulation nutritionnelle du microbiote intestinal : impact sur la perméabilité intestinale et les désordres métaboliques : Nutritional modulation of the gut microbiota : *Médecine des maladies Métaboliques*, volume 3(3) :280–284 (2009). doi :10.1016/s1957-2557(09)74746-7. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1957255709747467>.
- Carey, M.C., Small, D.M., and Bliss, C.M.** Lipid digestion and absorption. *Annual Review of Physiology*, volume 45(1) :651–677 (1983). doi :10.1146/annurev.ph.45.030183.003251. URL <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ph.45.030183.003251>.
- Carrière, F.** La lipolyse gastro-intestinale chez l'homme. *Lipid' Nutri+* (2013). URL http://www.terresunivia.fr/sites/default/files/Lipid%20Nutri+/ln_17.pdf.
- Carrière, F., BARROWMAN, J.A., Verger, R., and Laugier, R.** Secretion and Contribution to Lipolysis of Gastric and Pancreatic Lipases During a Test Meal in Humans. *Gastroenterology*, volume 105(3) :876–888 (1993). URL <http://gateway.webofknowledge.com/gateway/Gateway.cgi?GWVersion=2&SrcAuth=mekentosj&SrcApp=Papers&DestLinkType=FullRecord&DestApp=WOS&KeyUT=A1993LV38200030>.
- Carrière, F., Moreau, H., Raphel, V., Laugier, R., Benicourt, C., Junien, J.L., and Verger, R.** Purification and biochemical characterization of dog gastric lipase. *European Journal of Biochemistry*, volume 202(1) :75–83 (1991). doi :10.1111/j.1432-1033.1991.tb16346.x. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16346.x>.
- Carrière, F., Renou, C., Lopez, V., de Caro, J., Ferrato, F., Lengsfeld, H., De Caro, A., Laugier, R., and Verger, R.** The specific activities of human digestive lipases measured from the in vivo and in vitro lipolysis of test meals. *Gastroenterology*, volume 119(4) :949–960 (2000). doi :10.1053/gast.2000.18140. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508500984427>.
- Carrière, F., Renou, C., Ransac, S., Lopez, V., de Caro, J., Ferrato, F., De Caro, A., Fleury, A., Sanwald-Ducray, P., Lengsfeld, H., Beglinger, C., Hadvary, P., Verger, R., and Laugier, R.** Inhibition of gastrointestinal lipolysis by Orlistat during digestion of test meals in healthy volunteers. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, volume 281(1) :G16–28 (2001). URL <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11408251&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Carrière, F., Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F., Laugier, R., and Verger, R.** In vivo and in vitro studies on the stereoselective hydrolysis of tri- and diglycerides by gastric and pancreatic lipases. *Bioorganic & medicinal . . .*, volume 5(2) :429–435 (1997). doi :10.1016/S0968-0896(96)00251-9. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089696002519>.
- Cayot, P. and Lorient, D.** *Structures et technofonctions des protéines du lait*. Arilaît recherches. Tec & Doc Lavoisier (1998). ISBN 9782743002299. URL <https://books.google.fr/books?id=I5ScAAAACAAJ>.

- Cecil, J.E., Francis, J., and Read, N.W.** Relative contributions of intestinal, gastric, oro-sensory influences and information to changes in appetite induced by the same liquid meal. *Appetite*, volume 31(3) :377–390 (1998). doi :10.1006/appe.1998.0177. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195666398901775>.
- Charrondière, U.R., Rittenschober, D., Nowak, V., Wijesinha-Bettoni, R., Stadlmayr, B., Haytowitz, D., and Persijn, D.** Directives FAO/INFOODS relatives   la conversion d’unités, de d nominateurs et d’expressions, version 1.0. FAO, Rome, 2015. (2015). URL http://www.fao.org/fileadmin/templates/food_composition/documents/1nutrition/Conversion_Guidelines-V1.0.pdf.
- Chen, J. and Dickinson, E.** Interfacial ageing effect on the rheology of a heat-set protein emulsion gel. *Food Hydrocolloids*, volume 13(5) :363–369 (1999). doi :10.1016/S0268-005X(99)00021-1. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X99000211>.
- Christie, W.W. and Han, X.** Lipids : their structures and occurrence. In *Lipid Analysis-Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*, pages 3–19. Elsevier (2012). ISBN 9780955251245. doi :10.1533/9780857097866.3. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780955251245500016>.
- Church, F.C., Porter, D.H., Catignani, G.L., and Swaisgood, H.E.** An o-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Analytical Biochemistry*, volume 146(2) :343–348 (1985). doi :10.1016/0003-2697(85)90549-4. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269785905494>.
- Cou delo, L., Amara, S., Lecomte, M., Meugnier, E., Monteil, J., Fonseca, L., Pineau, G., Cansell, M., Carrière, F., Michalski, M.C., and Vaysse, C.** Impact of various emulsifiers on ALA bioavailability and chylomicron synthesis through changes in gastrointestinal lipolysis. *Food & Function*, volume 6(5) :1726–1735 (2015). doi :10.1039/C5FO00070J. URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5F000070J>.
- Damodaran, S.** *Food Proteins and Lipids*, volume 415 of *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer US, Boston, MA (1997). ISBN 978-1-4757-0721-2. doi :10.1007/978-1-4899-1792-8. URL <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-1792-8>.
- Damodaran, S., Parkin, K.L., and Fennema, O.R.** *Fennema’s Food Chemistry, Fourth Edition*. CRC Press (2007). ISBN 9780849392726. URL http://books.google.fr/books?id=TFgaSQAACAAJ&dq=isbn:9780849392726&hl=&cd=1&source=gbs_api.
- Davila, A.M., Blachier, F., Gotteland, M., Andriamihaja, M., Benetti, P.H., Sanz, Y., and Tom e, D.** Intestinal luminal nitrogen metabolism : Role of the gut microbiota and consequences for the host. *Pharmacological ...*, volume 68(1) :95–107 (2013). doi :10.1016/j.phrs.2012.11.005. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661812002265>.
- Day, L., Golding, M., Xu, M., Keogh, J., Clifton, P.M., and Wooster, T.J.** Tailoring the digestion of structured emulsions using mixed monoglyceride–caseinate interfaces. *Food Hydrocolloids*, volume 36 :151–161 (2014). doi :10.1016/j.foodhyd.2013.09.019. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X1300310X>.
- Delime, P., Lemmens-Smink, N., and Wolf, B.** Competitive Adsorption of Lecithin and Saliva at the O/W Interface in Relation to the Oral Processing of Lipid Continuous Foods. *Food Biophysics*, volume 9(3) :285–291 (2014). doi :10.1007/s11483-014-9352-5. URL <http://link.springer.com/10.1007/s11483-014-9352-5>.
- Dickinson, E.** *Les collo ides alimentaires*. Elsevier Masson (1996). ISBN 9782225852435. URL http://books.google.fr/books?id=nYVLAACAAJ&dq=isbn:9782225852435&hl=&cd=1&source=gbs_api.
- Dickinson, E.** Properties of Emulsions Stabilized with Milk Proteins : Overview of Some Recent Developments. *Journal of Dairy Science*, volume 80(10) :2607–2619 (1997). doi : 10.3168/jds.S0022-0302(97)76218-0. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030297762180>.

- Dickinson, E.** Food Colloids : Interactions, microstructure and processing. Royal Society of Chemistry (2005). ISBN 978-0-85404-638-6. URL <http://pubs.rsc.org/en/Content/eBook/978-0-85404-638-6#!divbookcontent>.
- Dickinson, E. and Leser, M.E.** *Food Colloids*. Self-assembly and Material Science. Royal Society of Chemistry, Cambridge (2007). ISBN 0854042717. doi :10.1039/9781847557698. URL <http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781847557698>.
- Dickinson, E. and Miller, R.** Food colloids : fundamentals of formulation. Royal Society of Chemistry, Cambridge (2001). ISBN 978-0-85404-850-2. doi :10.1039/9781847550842. URL <http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781847550842>.
- Dickinson, E. and van Vliet, T.** *Food Colloids, Biopolymers and Materials*. Special Publications. Royal Society of Chemistry, Cambridge (2003). ISBN 978-0-85404-871-7. doi : 10.1039/9781847550835. URL <http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781847550835>.
- Donald, A.** Food for thought. *Nature materials*, volume 3(9) :579–581 (2004). doi :10.1038/nmat1207. URL <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=15343283&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Drechsler, K.C. and Ferrua, M.J.** Modelling the breakdown mechanics of solid foods during gastric digestion. *Food Research International*, volume 88 :181–190 (2016). doi :10.1016/j.foodres.2016.02.019. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996916300643>.
- Dressman, J.B.** Comparison of canine and human gastrointestinal physiology. *Pharmaceutical Research*, volume 3(3) :123–131 (1986). doi :10.1023/A:1016353705970. URL <http://link.springer.com/10.1023/A:1016353705970>.
- Dumas, C.** Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations (2007). URL <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT-Ra-Proteines.pdf>.
- Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., Barberá, R., Brodkorb, A., Cattenoz, T., Clemente, A., Comi, I., Dupont, D., Garcia-Llatas, G., Lagarda, M.J., Le Feunteun, S., JanssenDuijghuijsen, L., Karakaya, S., Lesmes, U., Mackie, A.R., Martins, C., Meynier, A., Miralles, B., Murray, B.S., Pihlanto, A., Picariello, G., Santos, C.N., Simsek, S., Recio, I., Rigby, N., Rioux, L.E., Stoffers, H., Tavares, A., Tavares, L., Turgeon, S., Ulleberg, E.K., Vegarud, G.E., Vergères, G., and Portmann, R.** The harmonized INFOGEST in vitro digestion method : From knowledge to action. *Food Research International*, volume 88 :217–225 (2015). doi :10.1016/j.foodres.2015.12.006. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996915302751>.
- Eldemrawy, H.Y., Wright, A., and Corredig, M.** A Better Understanding of the Factors Affecting In vitro Lipolysis Using Static Mono-compartmental Models. *Food Digestion* (2015). doi :10.1007/s13228-015-0038-3. URL <http://link.springer.com/10.1007/s13228-015-0038-3>.
- Fang, X., Rioux, L.E., Labrie, S., and Turgeon, S.L.** Disintegration and nutrients release from cheese with different textural properties during in vitro digestion. *Food Research International*, volume 88 :276–283 (2016). doi :10.1016/j.foodres.2016.04.008. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996916301387>.
- Fardet, A. and Boirie, Y.** Associations between diet-related diseases and impaired physiological mechanisms : a holistic approach based on meta-analyses to identify targets for preventive nutrition. volume 71(10) :643–656 (2013). doi :10.1111/nure.12052. URL <http://nutritionreviews.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/nure.12052>.
- Fardet, A., Souchon, I., and Dupont, D.** Structure des aliments et effets nutritionnels. Quae Edition (2013). ISBN 978-2-7592-2013-7. URL <http://www.quae.com/fr/r3047-structure-des-aliments-et-effets-nutritionnels.html>.
- Favé, G., Peyrot, J., Hamosh, M., and Armand, M.** Digestion des lipides Alimentaires : intérêt de la lipase gastrique humaine? *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, volume 42(4) :183–190 (2007). doi :10.1016/S0007-9960(07)91874-X. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000799600791874X>.

- Fernandez, A.** and **Kelly, P.** pH-stat vs. free-fall pH techniques in the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Food Chemistry*, volume 199 :409–415 (2016). doi :10.1016/j.foodchem.2015.12.043. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615303216>.
- Fernandez, S., Rodier, J.D., Ritter, N., Mahler, B., Demarne, F., Carrière, F., and Jannin, V.** Lipolysis of the semi-solid self-emulsifying excipient Gelucire® 44/14 by digestive lipases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, volume 1781(8) :367–375 (2008). doi :10.1016/j.bbali.2008.05.006. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198108001030>.
- Ferrua, M.J.** and **Singh, R.P.** Modeling the Fluid Dynamics in a Human Stomach to Gain Insight of Food Digestion. *Journal of Food Science*, volume 75(7) :R151–R162 (2010). doi :10.1111/j.1750-3841.2010.01748.x. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01748.x>.
- Fouillet, H., Juillet, B., Gaudichon, C., Mariotti, F., Tomé, D., and Bos, C.** Absorption kinetics are a key factor regulating postprandial protein metabolism in response to qualitative and quantitative variations in protein intake. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, volume 297(6) :R1691–705 (2009). doi :10.1152/ajpregu.00281.2009. URL <http://ajpregu.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpregu.00281.2009>.
- Fu, T.J., Abbott, U.R., and Hatzos, C.** Digestibility of Food Allergens and Nonallergenic Proteins in Simulated Gastric Fluid and Simulated Intestinal Fluids — A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, volume 50(24) :7154–7160 (2002). doi :10.1021/jf020599h. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf020599h>.
- Gabert, L., Vors, C., Louche-Pélissier, C., Sauvinet, V., Lambert-Porcheron, S., Jocelyne, D., Laville, M., Désage, M., and Michalski, M.C.** ¹³C tracer recovery in human stools after digestion of a fat-rich meal labelled with [1,1,1-¹³C₃]tripalmitin and [1,1,1-¹³C₃]triolein. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, volume 25(19) :2697–2703 (2011). doi :10.1002/rcm.5067. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.5067>.
- Gallier, S., Acton, D., Garg, M., and Singh, H.** Natural and processed milk and oil body emulsions : Bioavailability, bioaccessibility and functionality. *Food Structure* (2016). doi :10.1016/j.foostr.2016.07.005. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221332911630017X>.
- Garaiova, I., Guschina, I.A., Plummer, S.F., Tang, J., Wang, D., and Plummer, N.T.** A randomised cross-over trial in healthy adults indicating improved absorption of omega-3 fatty acids by pre-emulsification. *Nutrition Journal*, volume 6(1) (2007). doi :10.1186/1475-2891-6-4. URL <http://nutritionj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2891-6-4>.
- Gargouri, Y., Moreau, H., and Verger, R.** Gastric lipases : biochemical and physiological studies. ... *et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and ...*, volume 1006(3) :255–271 (1989). doi :10.1016/0005-2760(89)90012-X. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000527608990012X>.
- Gaudichon, C.** Les modèles humains. In *Structure des aliments et effets nutritionnels*, pages 299–306. Quae Edition (2013). ISBN 978-2-7592-2013-7. URL <http://www.quae.com/fr/r3047-structure-des-aliments-et-effets-nutritionnels.html>.
- Giang, T.M., Le Feunteun, S., Gaucel, S., Brestaz, P., Anton, M., Meynier, a., and Trelea, I.C.** Dynamic modeling highlights the major impact of droplet coalescence on the in vitro digestion kinetics of a whey protein stabilized submicron emulsion. *Food Hydrocolloids*, volume 43 :66–72 (2015). doi :10.1016/j.foodhyd.2014.04.037. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X14001799>.
- Golding, M.** and **Wooster, T.J.** The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, volume 15 :90–101 (2010). doi :10.1016/j.cocis.2009.11.006. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135902940900106X>.
- Golding, M., Wooster, T.J., Day, L., Xu, M., Lundin, L., Keogh, J., and Clifton, P.** Impact of gastric structuring on the lipolysis of emulsified lipids. *Soft matter*, volume 7(7) :3513–3523 (2011). doi :10.1039/c0sm01227k. URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0sm01227k>.

- Grandgury, S.** and **Ministère du travail, de l'emploi et de la santé.** Programme National Nutrition Santé 2011-2015. Technical report (2011). URL http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/PNNS_2011-2015.pdf.
- Griffiths, M.** Crash Course : Gastrointestinal System. MOSBY Elsevier (2012). URL <https://www.elsevier.com/books/crash-course-gastrointestinal-system-e-book/horton-szar/978-0-7234-3767-3>.
- Grundy, M.M., Grassby, T., Mandalari, G., Waldron, K.W., Butterworth, P.J., Berry, S.E., and Ellis, P.R.** Effect of mastication on lipid bioaccessibility of almonds in a randomized human study and its implications for digestion kinetics, metabolizable energy, and postprandial lipemia. *The American journal of clinical nutrition*, volume 101(1) :25–33 (2014). doi :10.3945/ajcn.114.088328. URL <http://ajcn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/ajcn.114.088328>.
- Grundy, M.M.L., Edwards, C.H., Mackie, A.R., Gidley, M.J., Butterworth, P.J., and Ellis, P.R.** Re-evaluation of the mechanisms of dietary fibre and implications for macronutrient bioaccessibility, digestion and postprandial metabolism. *The British journal of nutrition*, pages 1–18 (2016). doi :10.1017/S0007114516002610. URL http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114516002610.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., and Alric, M.** Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in biotechnology*, volume 30(11) :591–600 (2012). doi :10.1016/j.tibtech.2012.08.001. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016777991200128X>.
- Guo, M.R., Fox, P.F., Flynn, A., and Kindstedt, P.S.** Susceptibility of β -Lactoglobulin and Sodium Caseinate to Proteolysis by Pepsin and Trypsin. *Journal of Dairy Science*, volume 78(11) :2336–2344 (1995). doi :10.3168/jds.S0022-0302(95)76860-6. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030295768606>.
- Guo, Q., Ye, A., Lad, M., Dalgleish, D., and Singh, H.** Behaviour of whey protein emulsion gel during oral and gastric digestion : effect of droplet size. *Soft matter*, volume 10(23) :4173–4183 (2014a). doi :10.1039/c4sm00598h. URL http://adsabs.harvard.edu/cgi-bin/nph-data_query?bibcode=2014SMat...10.4173G&link_type=EJOURNAL.
- Guo, Q., Ye, A., Lad, M., Dalgleish, D., and Singh, H.** Effect of gel structure on the gastric digestion of whey protein emulsion gels. *Soft matter*, volume 10(8) :1214–1223 (2014b). doi :10.1039/c3sm52758a. URL http://adsabs.harvard.edu/cgi-bin/nph-data_query?bibcode=2014SMat...10.1214G&link_type=EJOURNAL.
- Guo, Q., Ye, A., Lad, M., Ferrua, M., Dalgleish, D., and Singh, H.** Disintegration kinetics of food gels during gastric digestion and its role on gastric emptying : an in vitro analysis. *Food & Function*, volume 6(3) :756–764 (2015). doi :10.1039/c4fo00700j. URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4F000700J>.
- Guyomarc'h, F., Famelart, M.H., Henry, G., Gulzar, M., Léonil, J., Hamon, P., Bouhalab, S., and Croguennec, T.** Current ways to modify the structure of whey proteins for specific functionalities—a review. *Dairy Science & Technology*, volume 95(6) :795–814 (2014). doi :10.1007/s13594-014-0190-5. URL <http://link.springer.com/article/10.1007/s13594-014-0190-5/fulltext.html>.
- Hellström, P.M., Grybäck, P., and Jacobsson, H.** The physiology of gastric emptying. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, volume 20(3) :397–407 (2006). doi :10.1016/j.bpa.2006.02.002. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S152168960600019X>.
- Huc, D., Mariette, F., Challos, S., Barreau, J., Moulin, G., and Michon, C.** Multi-scale investigation of eyes in semi-hard cheese. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, volume 24 :106–112 (2014). doi :10.1016/j.ifset.2013.10.002. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856413001550>.

- Hunt, J.N., Smith, J.L., and Jiang, C.L.** Effect of meal volume and energy density on the gastric emptying of carbohydrates. *Gastroenterology*, volume 89(6) :1326–1330 (1985). doi :10.1016/0016-5085(85)90650-X. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650858590650X>.
- Hur, S.J., Lim, B.O., Decker, E.A., and McClements, D.J.** In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, volume 125(1) :1–12 (2011). doi :10.1016/j.foodchem.2010.08.036. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610010241>.
- Jalabert-Malbos, M.L., Mishellany-Dutour, A., Woda, A., and Peyron, M.A.** Particle size distribution in the food bolus after mastication of natural foods. *Food Quality and Preference*, volume 18(5) :803–812 (2007). doi :10.1016/j.foodqual.2007.01.010. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950329307000201>.
- Jourdren, S., Panouille, M., Saint-Eve, A., Deleris, I., Forest, D., Lejeune, P., and Souchon, I.** Breakdown pathways during oral processing of different breads : impact of crumb and crust structures. *Food & Function*, volume 7(3) :1446–1457 (2016). doi :10.1039/c5fo01286d. URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5F001286D>.
- Kanicky, J.R. and Shah, D.O.** Effect of Degree, Type, and Position of Unsaturation on the pKa of Long-Chain Fatty Acids. *Journal of Colloid and Interface Science*, volume 256(1) :201–207 (2002). doi :10.1006/jcis.2001.8009. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979701980099>.
- Keogh, J.B., Wooster, T.J., Golding, M., Day, L., Otto, B., and Clifton, P.M.** Slowly and rapidly digested fat emulsions are equally satiating but their triglycerides are differentially absorbed and metabolized in humans. *The Journal of nutrition*, volume 141(5) :809–815 (2011). doi :10.3945/jn.110.131110. URL <http://jn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/jn.110.131110>.
- Kim, S.B., Ki, K.S., Khan, M.A., Lee, W.S., Lee, H.J., Ahn, B.S., and Kim, H.S.** Peptic and Tryptic Hydrolysis of Native and Heated Whey Protein to Reduce Its Antigenicity. *Journal of Dairy Science*, volume 90(9) :4043–4050 (2007). doi :10.3168/jds.2007-0169. URL <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0169>.
- Kitabatake, N. and Kinekawa, Y.I.** Digestibility of bovine milk whey protein and β -lactoglobulin in vitro and in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, volume 46(12) :4917–4923 (1998). doi :10.1021/jf9710903. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9710903>.
- Kong, F. and Singh, R.P.** Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of Food Science*, volume 73(5) :R67–80 (2008). doi :10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x>.
- Kopf-bolanz, K.A., Schwander, F., Gijs, M., Vergères, G., Portmann, R., and Egger, L.** Validation of an in vitro digestive system for studying macronutrient decomposition in humans. *The Journal of nutrition*, volume 142(2) :245–250 (2012). doi :10.3945/jn.111.148635. URL <http://jn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/jn.111.148635>.
- Korhonen, H.** Milk-derived bioactive peptides : From science to applications. volume 1(2) :177–187 (2009). doi :10.1016/j.jff.2009.01.007. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464609000085>.
- Lairon, D.** Digestion and absorption of lipids. In E. Decker and D. Julian McClements, editors, *Designing Functional Foods*, pages 68–93. CRC Press (2009). ISBN 978-1-4200-9485-5. doi :10.1533/9781845696603.1.66. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845694326500034>.
- Larsen, D.S., Tang, J., Ferguson, L., Morgenstern, M.P., and James, B.J.** Oral Breakdown of Texturally Complex Gel-Based Model Food. *Journal of Texture Studies*, volume 47(3) :169–180 (2016). doi :10.1111/jtxs.12146. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jtxs.12146/full>.

- Le Bleis, F., Chaunier, L., Montigaud, P., and Della Valle, G.** Destructuration mechanisms of bread enriched with fibers during mastication. *Food Research International*, volume 80 :1–11 (2016). doi :10.1016/j.foodres.2015.12.008. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996915302799>.
- Li, J.L.** *In Vitro Gastrointestinal Digestion of Oil-in-water Emulsions*. Ph.D. thesis (2012). URL <http://mro.massey.ac.nz/handle/10179/3751>.
- Li, J.L., Ye, A., Lee, S.J., and Singh, H.** Physicochemical behaviour of WPI-stabilized emulsions in in vitro gastric and intestinal conditions. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, volume 111 :80–87 (2013). doi :10.1016/j.colsurfb.2013.05.034. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776513003603>.
- Li, Y., Hu, M., and McClements, D.J.** Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model : Proposal for a standardised pH-stat method. *Food Chemistry*, volume 126(2) :498–505 (2011). doi :10.1016/j.foodchem.2010.11.027. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610014342>.
- Li, Y. and McClements, D.J.** New mathematical model for interpreting pH-stat digestion profiles : impact of lipid droplet characteristics on in vitro digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, volume 58(13) :8085–8092 (2010). doi :10.1021/jf101325m. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf101325m>.
- Li, Y. and McClements, D.J.** Modulating lipid droplet intestinal lipolysis by electrostatic complexation with anionic polysaccharides : Influence of cosurfactants. *Food Hydrocolloids*, volume 35 :367–374 (2014). doi :10.1016/j.foodhyd.2013.06.011. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X13001896>.
- Lo, C.M. and Tso, P.** Physicochemical basis of the digestion and absorption of triacylglycerol. In E. Decker and D. Julian McClements, editors, *Designing Functional Foods*, pages 94–125. CRC Press (2009). ISBN 978-1-4200-9485-5. doi :10.1533/9781845696603.1.94. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845694326500046>.
- Luhovyy, B.L., Akhavan, T., and Anderson, G.H.** Whey Proteins in the Regulation of Food Intake and Satiety. *Journal of the American College of Nutrition*, volume 26(6) :704S–712S (2007). doi :10.1080/07315724.2007.10719651. URL <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07315724.2007.10719651>.
- Lundin, L., Golding, M., and Wooster, T.J.** Understanding food structure and function in developing food for appetite control. *Nutrition & Dietetics*, volume 65(s3) :S79–S85 (2008). doi :10.1111/j.1747-0080.2008.00266.x. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1747-0080.2008.00266.x/full>.
- Luo, Q., Boom, R.M., and Janssen, A.** Digestion of protein and protein gels in simulated gastric environment. *LWT-Food Science and Technology*, volume 63(1) :161–168 (2015). doi :10.1021/jf60208a021. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815002406>.
- Macierzanka, A., Böttger, F., Lansonneur, L., Groizard, R., Jean, A.S., Rigby, N.M., Cross, K., Wellner, N., and Mackie, A.R.** The effect of gel structure on the kinetics of simulated gastrointestinal digestion of bovine β -lactoglobulin. *Food Chemistry*, volume 134(4) :2156–2163 (2012). doi :10.1016/j.foodchem.2012.04.018. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612006553>.
- Macierzanka, A., Sancho, A.I., Mills, E.N.C., Rigby, N.M., and Mackie, A.R.** Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of β -casein and β -lactoglobulin. *Soft matter*, volume 5(3) :538–550 (2009). doi :10.1039/B811233A. URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=B811233A>.
- Mackie, A. and Macierzanka, A.** Colloidal aspects of protein digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, volume 15(1-2) :102–108 (2010). doi :10.1016/j.cocis.2009.11.005. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029409001058>.

- Malagelada, J.R. and Azpiroz, F. Determinants of gastric emptying and transit in the small intestine. *Comprehensive Physiology* (2011). doi :10.1002/cphy.cp060123. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.cp060123>.
- Malagelada, J.R., Go, V.L.W., and Summerskill, W.H.J. Different gastric, pancreatic, and biliary responses to solid-liquid or homogenized meals. *Digestive Diseases and Sciences*, volume 24(2) :101–110 (1979). doi :10.1007/BF01324736. URL <http://link.springer.com/article/10.1007/BF01324736>.
- Malagelada, J.R., Longstreth, G.F., Summerskill, W.H., and Go, V.L. Measurement of gastric functions during digestion of ordinary solid meals in man. *Gastroenterology*, volume 70(2) :203–210 (1976). URL <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=2510&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Mantovani, R.A., Cavallieri, Â.L.F., Netto, F.M., and Cunha, R.L. Stability and in vitro digestibility of emulsions containing lecithin and whey proteins. *Food & Function*, volume 4(9) :1322–1331 (2013). doi :10.1039/c3fo60156k. URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3fo60156k>.
- Marciani, L., Faulks, R., Wickham, M.S.J., Bush, D., Pick, B., Wright, J., Cox, E.F., Fillery-Travis, A., Gowland, P.A., and Spiller, R.C. Effect of intragastric acid stability of fat emulsions on gastric emptying, plasma lipid profile and postprandial satiety. *The British journal of nutrition*, volume 101(06) :919 (2008). doi :10.1017/S0007114508039986. URL http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114508039986.
- Marciani, L., Gowland, P.A., Fillery-Travis, A., Manoj, P., Wright, J., Smith, A., Young, P., Moore, R., and Spiller, R.C. Assessment of antral grinding of a model solid meal with echo-planar imaging. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, volume 280(5) :G844–G849 (2001). URL <http://gateway.webofknowledge.com/gateway/Gateway.cgi?GWVersion=2&SrcAuth=mekentosj&SrcApp=Papers&DestLinkType=FullRecord&DestApp=WOS&KeyUT=000168214400008>.
- Marciniszyn, J., Hartsuck, J.A., and Tang, J. Pepstatin Inhibition Mechanism. In *Food Proteins and Lipids*, pages 199–210. Springer US, Boston, MA (1977). ISBN 978-1-4757-0721-2. doi :10.1007/978-1-4757-0719-9_12. URL http://link.springer.com/10.1007/978-1-4757-0719-9_12.
- Marze, S., Algaba, H., and Marquis, M. A microfluidic device to study the digestion of trapped lipid droplets. *Food & Function*, volume 5(7) :1481–8 (2014). doi :10.1039/c4fo00010b. URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=c4fo00010b>.
- Mat, D.J.L., Cattenoz, T., Souchon, I., Michon, C., and Le Feunteun, S. Monitoring the kinetics of pepsin hydrolysis using pH-stat titration : *In vitro* gastric digestions in static and dynamic pH conditions. *Food Hydrocolloids*, (A soumettre) (2017a).
- Mat, D.J.L., Le Feunteun, S., Michon, C., and Souchon, I. *In vitro* digestion of foods using pH-stat and the INFOGEST protocol : Impact of matrix structure on digestion kinetics of macronutrients, proteins and lipids. *Food Research International*, volume 88 :226–233 (2016). doi :10.1016/j.foodres.2015.12.002. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996915302738>.
- Mat, D.J.L., Souchon, I., Michon, C., and Le Feunteun, S. Digestion of solid food emulsions : influence of the size of bolus particles on *in vitro* lipolysis and proteolysis kinetics. *Food Chemistry*, (A soumettre) (2017b).
- McClements, D.J. *Food Emulsions*. Principles, Practices, and Techniques, Third Edition. CRC Press (2015). ISBN 1498726690. URL http://books.google.fr/books?id=YOGYCgAAQBAJ&pg=PA543&dq=Controlling+Lipid+Bioavailability+through+Physicochemical+and+Structural+Approaches+inauthor:mcclements&hl=&cd=1&source=gbs_api.
- McClements, D.J. and Decker, E.A. *Designing Functional Foods*. Measuring and Controlling Food Structure Breakdown and Nutrient Absorption. CRC Press (2009). ISBN 978-1-4200-9485-5. doi : 10.1201/9781439828496. URL <http://www.crcnetbase.com/doi/book/10.1201/9781439828496>.

- McClements, D.J., Decker, E.A., and Park, Y.** Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Critical reviews in food science and nutrition*, volume 49(1) :48–67 (2009). doi :10.1080/10408390701764245. URL <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390701764245>.
- McClements, D.J., Decker, E.A., Park, Y., and Weiss, J.** Designing Food Structure to Control Stability, Digestion, Release and Absorption of Lipophilic Food Components. *Food Biophysics*, volume 3(2) :219–228 (2008). doi :10.1007/s11483-008-9070-y. URL <http://link.springer.com/10.1007/s11483-008-9070-y>.
- McClements, D.J. and Gumus, C.E.** Natural emulsifiers - biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles : Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, volume 234 :3–26 (2016). doi :10.1016/j.cis.2016.03.002. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868616300380>.
- McClements, D.J. and Li, Y.** Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function*, volume 1(1) :32–59 (2010a). doi :10.1039/C0FO00111B. URL <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/fo/c0fo00111b>.
- McClements, D.J. and Li, Y.** Structured emulsion-based delivery systems : controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*, volume 159(2) :213–228 (2010b). doi :10.1016/j.cis.2010.06.010. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868610001235>.
- McClements, D.J. and Rao, J.** Food-Grade Nanoemulsions : Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Critical reviews in food science and nutrition*, volume 51(4) :285–330 (2011). doi :10.1080/10408398.2011.559558. URL <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.559558>.
- Ménard, O., Cattenoz, T., Guillemin, H., Souchon, I., Deglaire, A., Dupont, D., and Picque, D.** Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chemistry*, volume 145 :1039–1045 (2014). doi :10.1016/j.foodchem.2013.09.036. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613012880>.
- Mennah-Govela, Y.A. and Bornhorst, G.M.** Acid and moisture uptake in steamed and boiled sweet potatoes and associated structural changes during in vitro gastric digestion. *Food Research International*, volume 88 :247–255 (2016). doi :10.1016/j.foodres.2015.12.012. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996915302829>.
- Mennah-Govela, Y.A., Bornhorst, G.M., and Singh, R.P.** Acid Diffusion into Rice Boluses is Influenced by Rice Type, Variety, and Presence of α -Amylase. *Journal of Food Science*, volume 80(2) :E316–E325 (2015). doi :10.1111/1750-3841.12750. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/1750-3841.12750>.
- Michalski, M.C., Briard, V., Desage, M., and Geloën, A.** The dispersion state of milk fat influences triglyceride metabolism in the rat. *European Journal of Nutrition*, volume 44(7) :436–444 (2005). doi :10.1007/s00394-005-0551-1. URL <http://link.springer.com/10.1007/s00394-005-0551-1>.
- Michalski, M.C., Genot, C., Gayet, C., Lopez, C., Fine, F., Joffre, F., Vendevre, J.L., Bouvier, J., Chardigny, J.M., Raynal-Ljutovac, K., and Steering Committee of RMT LISTRAL.** Multiscale structures of lipids in foods as parameters affecting fatty acid bioavailability and lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*, volume 52(4) :354–373 (2013). doi :10.1016/j.plipres.2013.04.004. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782713000258>.
- Michalski, M.C., Soares, A.F., Lopez, C., Leconte, N., Briard, V., and Geloën, A.** The supramolecular structure of milk fat influences plasma triacylglycerols and fatty acid profile in the rat. *European Journal of Nutrition*, volume 45(4) :215–224 (2006). doi :10.1007/s00394-006-0588-9. URL <http://link.springer.com/10.1007/s00394-006-0588-9>.

- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, n.C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., and Brodkorb, A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, volume 5(6) :1113–1124 (2014). doi :10.1039/c3fo60702j. URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3fo60702j>.
- Mosoni, L. and Dardevet, D. Alimentation des personnes âgées. In *Structure des aliments et effets nutritionnels*, pages 441–450. Quae Edition (2013). ISBN 978-2-7592-2013-7. URL <http://www.quae.com/fr/r3047-structure-des-aliments-et-effets-nutritionnels.html>.
- Moughan, P.J. Digestion and absorption of proteins and peptides. In E. Decker and D. Julian McClements, editors, *Designing Functional Foods*, pages 148–170. CRC Press (2009). ISBN 978-1-4200-9485-5. doi :10.1533/9781845696603.1.148. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978184569432650006X>.
- Mun, S., Decker, E.A., and McClements, D.J. Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Research International*, volume 40(6) :770–781 (2007). ISSN 09639969. doi :10.1016/j.foodres.2007.01.007. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996907000233>.
- Mun, S., Decker, E.A., Park, Y., Weiss, J., and McClements, D.J. Influence of Interfacial Composition on in Vitro Digestibility of Emulsified Lipids : Potential Mechanism for Chitosan’s Ability to Inhibit Fat Digestion. *Food Biophysics*, volume 1(1) :21–29 (2006). doi :10.1007/s11483-005-9001-0. URL <http://link.springer.com/article/10.1007/s11483-005-9001-0>.
- Navarrete del Toro, M.A. and García Carreño, F.L. *Evaluation of the Progress of Protein Hydrolysis*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA (2001). ISBN 9780471142911. doi :10.1002/0471142913.fac0202s10. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142913.fac0202s10/full>.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition*. W. H. Freeman, 6 edition (2012). ISBN 9781429234146. URL http://books.google.fr/books?id=79hJMAEACAAJ&dq=intitle:Lehninger+Principles+of+Biochemistry+isbn:9781429234146&hl=&cd=1&source=gbs_api.
- Neyraud, E., Tremblay-Franco, M., Gregoire, S., Berdeaux, O., and Canlet, C. Relationships between the metabolome and the fatty acid composition of human saliva ; effects of stimulation. *Metabolomics*, volume 9(1) :213–222 (2012). doi :10.1007/s11306-012-0440-6. URL <http://link.springer.com/article/10.1007/s11306-012-0440-6>.
- Nielsen, P.M. Functionality of Protein Hydrolysates. In *Food Proteins and Their Applications*, pages 443–472. Taylor & Francis (1997). ISBN 9780824798208. URL <https://www.crcpress.com/Food-Proteins-and-Their-Applications/Damodaran/p/book/9780824798208>.
- Nik, A.M., Wright, A.J., and Corredig, M. Surface adsorption alters the susceptibility of whey proteins to pepsin-digestion. *Journal of Colloid and Interface Science*, volume 344(2) :372–381 (2010). doi :10.1016/j.jcis.2010.01.006. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979710000378>.
- Nik, A.M., Wright, A.J., and Corredig, M. Impact of interfacial composition on emulsion digestion and rate of lipid hydrolysis using different in vitro digestion models. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, volume 83(2) :321–330 (2011). doi :10.1016/j.colsurfb.2010.12.001. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776510006715>.
- Norton, J.E., Gonzalez Espinosa, Y., Watson, R.L., Spyropoulos, F., and Norton, I.T. Functional food microstructures for macronutrient release and delivery. *Food & Function*, volume 6(3) :663–678 (2015). doi :10.1039/c4fo00965g. URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4F000965G>.

- Norton, J.E., Wallis, G.A., Spyropoulos, F., Lillford, P.J., and Norton, I.T. Designing food structures for nutrition and health benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, volume 5(1) :177–195 (2014). doi :10.1146/annurev-food-030713-092315. URL <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-food-030713-092315>.
- Pafumi, Y. Mechanisms of Inhibition of Triacylglycerol Hydrolysis by Human Gastric Lipase. *Journal of Biological Chemistry*, volume 277(31) :28070–28079 (2002). doi :10.1074/jbc.M202839200. URL <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M202839200>.
- Panouillé, M., Saint-Eve, A., and Souchon, I. Instrumental methods for bolus characterization during oral processing to understand food perceptions. *Current Opinion in Food Science*, volume 9 :42–49 (2016). doi :10.1016/j.cofs.2016.05.002. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214799316300728>.
- Payne, A.N., Zihler, A., Chassard, C., and Lacroix, C. Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. *Trends in biotechnology*, volume 30(1) :17–25 (2012). doi :10.1016/j.tibtech.2011.06.011. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779911001156>.
- Peyron, M.A., Mishellany, A., and Woda, A. Particle size distribution of food boluses after mastication of six natural foods. *Journal of dental research*, volume 83(7) :578–582 (2004). doi :10.1177/154405910408300713. URL <http://jdr.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/154405910408300713>.
- Picariello, G., Miralles, B., Mamone, G., Sánchez-Rivera, L., Recio, I., Addeo, F., and Ferranti, P. Role of intestinal brush border peptidases in the simulated digestion of milk proteins. *Molecular Nutrition & Food Research*, volume 59(5) :948–956 (2015). doi :10.1002/mnfr.201400856. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201400856>.
- Piper, D.W. and Fenton, B.H. pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. *Gut*, volume 6(5) :506–508 (1965). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1552331/>.
- Plaisancié, P. Le mucus. In *Structure des aliments et effets nutritionnels*, pages 85–99. Quae Edition (2013). ISBN 978-2-7592-2013-7. URL <http://www.quae.com/fr/r3047-structure-des-aliments-et-effets-nutritionnels.html>.
- Pollan, M. *The Omnivore's Dilemma : A Natural History of Four Meals*. Penguin Press (2006). ISBN 1-59420-082-3. URL <http://www.penguinrandomhouse.com/books/292953/the-omnivores-dilemma-by-michael-pollan/9780143038580>.
- Ranawana, V., Monro, J.A., Mishra, S., and Henry, C.J.K. Degree of particle size breakdown during mastication may be a possible cause of interindividual glycemic variability. *Nutrition Research*, volume 30(4) :246–254 (2010). doi :10.1016/j.nutres.2010.02.004. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0271531710000448>.
- Reddy, I.M., Kella, N.K.D., and Kinsella, J.E. Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, volume 36(4) :737–741 (1988). doi :10.1021/jf00082a015. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00082a015>.
- Rémond, D., Machebeuf, M., Yven, C., Buffière, C., Mioche, L., Mosoni, L., and Mirand, P.P. Postprandial whole-body protein metabolism after a meat meal is influenced by chewing efficiency in elderly subjects. *The American journal of clinical nutrition*, volume 85(5) :1286–1292 (2007). URL <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=17490964&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Salaün, F., Mietton, B., and Gaucheron, F. Buffering capacity of dairy products. *International Dairy Journal*, volume 15(2) :95–109 (2005). doi :10.1016/j.idairyj.2004.06.007.
- Salonen, A. and de Vos, W.M. Impact of diet on human intestinal microbiota and health. *Annual Review of Food Science and Technology*, volume 5(1) :239–262 (2014). doi :10.1146/annurev-food-030212-182554. URL <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-food-030212-182554>.

- Sandra, S., Decker, E.A., and McClements, D.J.** Effect of interfacial protein cross-linking on the in vitro digestibility of emulsified corn oil by pancreatic lipase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, volume 56(16) :7488–7494 (2008). doi :10.1021/jf800741w. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf800741w>.
- Sarkar, A., Goh, K.K.T., Singh, R.P., and Singh, H.** Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by beta-lactoglobulin in an in vitro gastric model. *Food Hydrocolloids*, volume 23(6) :1563–1569 (2009). doi :10.1016/j.foodhyd.2008.10.014. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X08002592>.
- Sarkar, A., Juan, J.M., Kolodziejczyk, E., Acquistapace, S., Donato-Capel, L., and Wooster, T.J.** Impact of Protein Gel Porosity on the Digestion of Lipid Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, volume 63(40) :8829–8837 (2015). doi :10.1021/acs.jafc.5b03700. URL <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.5b03700>.
- Sarkar, A., Ye, A., and Singh, H.** On the role of bile salts in the digestion of emulsified lipids. *Food Hydrocolloids*, volume 60 :77–84 (2016). doi :10.1016/j.foodhyd.2016.03.018. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X16300996>.
- Savitzky, A. and Golay, M.J.E.** Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical chemistry*, volume 36(8) :1627–1639 (1964). doi :10.1021/ac60214a047. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60214a047>.
- Schmitt, C., Bovay, C., Vuillomenet, A.M., and Rouvet, M.** Multiscale characterization of individualized β -lactoglobulin microgels formed upon heat treatment under narrow pH range conditions. *Langmuir*, volume 25(14) :7899–7909 (2009). doi :10.1021/la900501n. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la900501n>.
- Schmitt, C., Moitzi, C., Bovay, C., Rouvet, M., Bovetto, L., Donato, L., Leser, M.E., Schurtenberger, P., and Stradner, A.** Internal structure and colloidal behaviour of covalent whey protein microgels obtained by heat treatment. *Soft matter*, volume 6(19) :4876 (2010). doi : 10.1039/c0sm00220h.
- Seeley, R.R., Tate, P., and Stephens, T.D.** *Anatomy & Physiology*. McGraw-Hill College (2008). ISBN 9780072965575. URL http://books.google.fr/books?id=74XNQgAACAAJ&dq=intitle:Anatomy+and+Physiology+isbn:9780072965575&hl=&cd=1&source=gbs_api.
- Selway, N. and Stokes, J.R.** Soft materials deformation, flow, and lubrication between compliant substrates : impact on flow behavior, mouthfeel, stability, and flavor. *Annual Review of Food Science and Technology*, volume 5(1) :373–393 (2014). doi :10.1146/annurev-food-030212-182657. URL <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-food-030212-182657>.
- Singh, H.** Milk protein functionality in food colloids. In *Food Colloids : Interactions, microstructure and processing*, pages 177–193. Royal Society of Chemistry, Cambridge (2005). ISBN 978-0-85404-638-6. doi :10.1039/9781847552389-00177. URL <http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781847552389-00177>.
- Singh, H., Boland, M., and Thompson, A.** Milk proteins : from expression to food (2014a). URL <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/2063572>.
- Singh, H., Ye, A., and Horne, D.** Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Progress in Lipid Research*, volume 48(2) :92–100 (2009). doi :10.1016/j.plipres.2008.12.001. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782708000635>.
- Singh, T.K., Øiseth, S.K., Lundin, L., and Day, L.** Influence of heat and shear induced protein aggregation on the in vitro digestion rate of whey proteins. *Food & Function*, volume 5(11) :2686–2698 (2014b). doi :10.1039/c4fo00454j. URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4F000454J>.
- Spellman, D., McEvoy, E., O’Cuinn, G., and FitzGerald, R.J.** Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein : Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, volume 13(6) :447–453 (2003). doi :10.1016/S0958-6946(03)00053-0. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694603000530>.

- Stănciuc, N., van der Plancken, I., Rotaru, G., and Hendrickx, M. Denaturation Impact in Susceptibility of Beta-Lactoglobulin to Enzymatic Hydrolysis : a Kinetic Study. *Revue roumaine de chimie*, volume 53(10) :921–929 (2008).
- Stanfield, C.L. *Principles of Human Physiology*. Pearson College Division (2012). ISBN 9780321884619. URL <http://catalogue.pearsoned.co.uk/educator/product/Principles-of-Human-Physiology-International-Edition-5E/9780321884619.page#>.
- Stokes, J.R., Boehm, M.W., and Baier, S.K. Oral processing, texture and mouthfeel : From rheology to tribology and beyond. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, volume 18(4) :349–359 (2013). doi :10.1016/j.cocis.2013.04.010. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029413000587>.
- Tiss, A., Lengsfeld, H., Carrière, F., and Verger, R. Inhibition of human pancreatic lipase by tetrahydropipstatin : Further kinetic studies showing its reversibility. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic*, volume 58(1-4) :41–47 (2009). doi :10.1016/j.molcatb.2008.11.003.
- Turgeon, S.L., Bard, C., and Gauthier, S.F. Comparaison de trois méthodes pour la mesure du degré d'hydrolyse de protéines laitières modifiées enzymatiquement. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, volume 24(1-2) :14–18 (1991). doi :10.1016/S0315-5463(91)70013-8. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0315546391700138>.
- Turgeon, S.L. and Rioux, L.E. Food matrix impact on macronutrients nutritional properties. *Food Hydrocolloids*, volume 25(8) :1915–1924 (2011). doi :10.1016/j.foodhyd.2011.02.026. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X11000725>.
- Umezawa, H. Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin. *Methods in enzymology*, volume 45 :678–695 (1976). doi :10.1016/S0076-6879(76)45058-9. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687976450589>.
- Venema, K., Havenaar, R., and Minekus, M. Improving in vitro simulation of the stomach and intestines. In E. Decker and D. Julian McClements, editors, *Designing Functional Foods*, pages 314–339. CRC Press (2009). ISBN 978-1-4200-9485-5. doi :10.1533/9781845696603.2.314. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845694326500125>.
- Verhoeckx, Kitty, Cotter, Paul, López-Expósito, Iván, Kleiveland, C, Lea, Tor, Mackie, Alan R, Requena, Teresa, Swiatecka, Dominika, and Wichers, Harry. *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer International Publishing, Cham (2015). ISBN 978-3-319-15791-7. doi :10.1007/978-3-319-16104-4. URL <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-16104-4>.
- Ville, E., Carrière, F., Renou, C., and Laugier, R. Physiological Study of pH Stability and Sensitivity to Pepsin of Human Gastric Lipase. *Digestion*, volume 65(2) :73–81 (2002). doi :10.1159/000057708. URL <http://www.karger.com/Article/FullText/57708>.
- Vors, C., Capolino, P., Guérin, C., Meugnier, E., Pesenti, S., Chauvin, M.A., Monteil, J., Peretti, N., Cansell, M., Carrière, F., and Michalski, M.C. Coupling in vitro gastrointestinal lipolysis and Caco-2 cell cultures for testing the absorption of different food emulsions. *Food & Function*, volume 3(5) :537 (2012). doi :10.1039/c2fo10248j. URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2fo10248j>.
- Vors, C., Pineau, G., Gabert, L., Drai, J., Louche-Pelissier, C., Defoort, C., Lairon, D., Desage, M., Danthine, S., Lambert-Porcheron, S., Vidal, H., Laville, M., and Michalski, M.C. Modulating absorption and postprandial handling of dietary fatty acids by structuring fat in the meal : a randomized crossover clinical trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, volume 97(1) :23–36 (2013). doi :10.3945/ajcn.112.043976. URL <http://ajcn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/ajcn.112.043976>.
- Whitcomb, D.C., Whitcomb, n.D.C., Lowe, n.M.E., and Lowe, M.E. Human Pancreatic Digestive Enzymes. *Digestive Diseases and Sciences*, volume 52(1) :1–17 (2007). doi :10.1007/s10620-006-9589-z. URL <http://link.springer.com/10.1007/s10620-006-9589-z>.

- Whittier, E.O.** Buffer Intensities Of Milk And Milk Constituents I. The Buffer Action Of Casein In Milk. volume 83 :79–88 (1929). URL <http://www.jbc.org/content/83/1/79.short>.
- Wickham, M., Faulks, R., and Mills, C.** In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular Nutrition & Food Research*, volume 53(8) :952–958 (2009). doi :10.1002/mnfr.200800193. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.200800193>.
- Wilcox, M.D., Brownlee, I.A., Richardson, J.C., Dettmar, P.W., and Pearson, J.P.** The modulation of pancreatic lipase activity by alginates. *Food Chemistry*, volume 146 :479–484 (2014). doi :10.1016/j.foodchem.2013.09.075. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461301340X>.
- Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P., and Morris, V.** Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, volume 108-109 :63–71 (2004). doi :10.1016/j.cis.2003.10.011. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868603001386>.
- Williams, H.D., Sassene, P., Kleberg, K., Bakala-N’Goma, J.C., Calderone, M., Jannin, V., Igonin, A., Partheil, A., Marchaud, D., Jule, E., Vertommen, J., Maio, M., Blundell, R., Benameur, H., Carrière, F., Müllertz, A., Porter, C.J.H., and Pouton, C.W.** Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, part 1 : method parameterization and comparison of in vitro digestion profiles across a range of representative formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, volume 101(9) :3360–3380 (2012). doi :10.1002/jps.23205. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/jps.23205>.
- Wooster, T.J., Day, L., Xu, M., Golding, M., Oiseth, S., Keogh, J., and Clifton, P.M.** Impact of different biopolymer networks on the digestion of gastric structured emulsions. *Food Hydrocolloids*, volume 36 :102–114 (2014). doi :10.1016/j.foodhyd.2013.09.009. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X1300297X>.
- Ye, A., Cui, J., Dalglish, D., and Singh, H.** Formation of a structured clot during the gastric digestion of milk : Impact on the rate of protein hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, volume 52 :478–486 (2016). doi :10.1016/j.foodhyd.2015.07.023. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X15300333>.
- Ye, A., Cui, J., Zhu, X., and Singh, H.** Effect of calcium on the kinetics of free fatty acid release during in vitro lipid digestion in model emulsions. *Food Chemistry*, volume 139(1-4) :681–688 (2013). doi :10.1016/j.foodchem.2013.02.014. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613001738>.
- Ye, A. and Taylor, S.** Characterization of cold-set gels produced from heated emulsions stabilized by whey protein. *International Dairy Journal*, volume 19(12) :721–727 (2009). doi :10.1016/j.idairyj.2009.06.003. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694609001101>.
- Zangenberg, N.H., Zangenberg, N.H., Müllertz, A., Müllertz, A., Kristensen, H.G., Kristensen, H.G., Hovgaard, L., and Hovgaard, L.** A dynamic in vitro lipolysis model. I. Controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, volume 14(2) :115–122 (2001). doi :10.1016/S0928-0987(01)00169-5. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098701001695>.
- Zeng, F., Chen, F., Kong, F., Gao, Q., Aadil, R.M., and Yu, S.** Structure and digestibility of debranched and repeatedly crystallized waxy rice starch. *Food Chemistry*, volume 187(C) :348–353 (2015). doi :10.1016/j.foodchem.2015.04.033. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.033>.

Annexes

A Liste des communications

Publications dans des revues à comité de lecture

Mat D. J. L., Le Feunteun S., Michon C., Souchon I. « *In vitro* digestion of foods using pH-stat and the INFOGEST protocol : Impact of matrix structure on digestion kinetics of macronutrients, proteins and lipids » *Food Research International*. Octobre 2016. Vol. 88, p. 226–233. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.002>

Communications lors de congrès

Mat D. J. L., Le Feunteun S., Souchon I., Beaumont M., Blachier F., Jaoui D., Leclerc M., Michon C. « La structure d'aliments modèles, contrôlée par le procédé, permet de moduler les cinétiques de digestion en condition *in vitro* » **12es Journées Francophone de Nutrition**, Bruxelles, Belgique, 10-12 Décembre 2014. (Poster en français)

Mat D. J. L., Le Feunteun S., Michon C., Souchon I. « Effects of the structure of model matrices on *in vitro* proteolysis and lipolysis kinetics observed using the INFOGEST recommendations and a pH-Stat method » **4th International Conference on Food Digestion**, Naples, Italie, 17-19 Mars 2015. (Oral en anglais)

Mat D. J. L., Le Feunteun S., Souchon I., Michon C. « Impact of structure of food matrices on *in vitro* proteolysis AND lipolysis kinetics observed using a pH-Stat method » **6th International Symposium on Delivery of Functionality in Complex Food Systems**, Paris, France, 15-17 Juillet 2015. (Oral en anglais)

Mat D. J. L., Le Feunteun S., Souchon I., Michon C. « Designing emulsion-type food structures to modulate lipid and protein digestion » **3rd International Conference on Food Structures, Digestion and Health**, Wellington, New-Zealand, 28-30 Octobre 2015. (Poster en anglais)

Mat D. J. L., Le Feunteun S., Michon C., Souchon I. « A pH-stat protocol based on the INFOGEST guidelines to monitor the *in vitro* intestinal proteolysis and lipolysis kinetics of complex emulsions » **3rd International Conference on Food Structures, Digestion and Health**, Wellington, New-Zealand, 28-30 Octobre 2015. (Poster en anglais)

B Liste des figures

1	Synergie entre les 3 thèses démarrant le projet ALIAS	3
1.1	Pyramide dépliée de la composition de produits alimentaires en lipides, glucides et protéines	7
1.2	Schéma de la structure de l'aliment à différentes échelles	8
1.3	Microscopie électronique d'une crème fouettée/la crème liquide	9
1.4	Le procédé de fabrication de l'aliment permet d'obtenir une structure aux propriétés d'intérêt	10
1.5	Formule chimique d'un triacylglycérol	12
1.6	Réaction de formation d'une liaison peptidique entre 2 acides aminés	13
1.7	Différents procédés d'émulsification	17
1.8	La séparation gravitationnelle	19
1.9	Suite de déstabilisations qu'une émulsion peut subir	19
1.10	Émulsifiants pouvant être utilisés pour la stabilisation d'émulsions alimentaires	20
1.11	Module d'élasticité en fonction de la durée et la température de chauffage lors de la gélification d'une solution de protéines de lactosérum	23
1.12	Anatomie du système digestif humain	25
1.13	Les mouvements dans la bouche de la mâchoire et de la langue réduisent les aliments	27
1.14	Évolution du pH dans l'estomac après ingestion d'un repas	28
1.15	Courbes de vidange gastrique pour un aliment solide et liquide	29
1.16	La fraction lipidique d'un aliment peut former une couche ou une crème en haut de l'estomac	33
1.17	Représentation spatiale d'un acide biliaire	34
1.18	Schéma de principe du TIM-1	40
1.19	Photographie du DIDGI	40
1.20	Photographie du DIDGI	42
1.21	Principe de la titration pH-stat durant la digestion d'une émulsion	45
1.22	Schéma de principe de la réaction l'hydrolyse des lipides par la lipase pancréatique	45
1.23	Schéma de principe de la réaction l'hydrolyse des lipides par la lipase pancréatique	48
1.24	Influence de la taille des gouttelettes sur la lipolyse suivie par pH-stat	51
1.25	Influence <i>in vivo</i> de la taille des gouttelettes sur la libération des triglycérides dans les contenus gastriques et duodénaux	51
1.26	Suivi du taux de triglycérides dans le plasma sanguin après ingestion d'huile non structurée et sous forme émulsifiée	51
1.27	Schéma résumant les déstabilisations que peuvent subir une émulsion à l'intérieur du tractus digestif	52
1.28	Déstabilisations possibles d'une émulsion dans l'estomac	54
1.29	Images par microscopie confocale de l'évolution de deux émulsions depuis leur état initial jusqu'à 2 h de phase gastrique simulée où seule la composition de l'interface a changé	54
1.30	Titration pH-stat d'émulsions de compositions interfaciales différentes durant 3 h de digestion intestinale simulée, suivant 2 h de digestion gastrique simulée	55
1.31	Évolution du pourcentage de lipolyse dans des émulsions digérées par une phase intestinale simulée. Les émulsions varient sur l'état, solide ou liquide, de l'huile dispersée	56
1.32	Apparition de leucine dans le plasma sanguin et évolution de son taux en fonction du temps chez des mini-porcs ayant ingéré des matrices laitières . . .	57

1.33	Lipolyse intestinale, suivie par pH-stat d'une émulsion de 10 % d'huile de tournesol et 0,7 % de protéines de lactosérum, gélifiée par des concentrations croissantes de gélatine	58
1.34	Suivi granulométrique d'une émulsion de 20 % huile de soja et 1 % protéines de lactosérum au cours de 2 h de digestion gastrique <i>in vitro</i>	59
1.35	Visualisation par microscopie confocale de l'évolution de la taille des gouttelettes d'une émulsion stabilisée par des protéines sériques durant la phase intestinale après 2 h de phase gastrique	60
2.1	pH evolution of the electrolyte solution used for intestinal phase	76
2.2	Characterization of the microstructures of emulsions containing 15 wt% rapeseed oil and 10 wt% whey proteins	80
2.3	pH-stat profiles measured during the intestinal phases of digestion for the liquid emulsion and the solid emulsion	81
2.4	pH-stat profiles measured during the intestinal phases of digestion for the proteinic continuous phase	82
2.5	pH-stat profiles of the lipolysis during the intestinal phases of digestion	83
3.1	Pictures of the differently sized food fragments for the <i>SE</i> matrix	94
3.2	Influence of solid emulsion fragment sizes on the pH-stat titration volumes during the intestinal phase of digestion	98
3.3	(A) pH evolution during the gastric phase with no enzymes added. (B) Evolution of titrant volumes measured by pH-stat titration during a subsequent intestinal phase with no enzymes added.	100
3.4	Influence of solid emulsion fragment sizes (at pH 7.0) on the hydrolysis kinetics monitored by pH-stat during their intestinal digestion (with no preceding gastric phase)	102
3.5	Confocal microscopy observations for the 0.5 cm and 1 cm <i>SE_{pH7}</i> cubes after incubation in a simulated intestinal fluid	106
4.1	Schematic representation of protein hydrolysis by a protease, and of the principles of pH-stat titration	115
4.2	pH-stat acid titration profile of the model food during the <i>in vitro</i> gastric digestions in static conditions ($pH = 3$)	122
4.3	Evolution of the volume of titrant and of the pH during the <i>in vitro</i> gastric digestions in dynamic pH conditions	124
4.4	Buffering capacities of the model food before and after <i>in vitro</i> gastric digestion, and their difference. Cumulated buffering capacities induced by the neo-formed peptides and corresponding degree of dissociation of the peptides' Cterm carboxylic groups	127
4.5	Evolution of the degree of hydrolysis during the <i>in vitro</i> gastric digestion with dynamic pH conditions of the model food	128
5.1	Evolution of the degree of hydrolysis (DH) of proteins of the tested matrices in the course of pH-stat acid titration ($pH = 3$) in <i>in vitro</i> gastric conditions	146
5.2	Kinetics of digestion in the course of pH-stat basic titration ($pH = 7$) in <i>in vitro</i> intestinal conditions	151
5.3	Evolution of the degree of hydrolysis (DH) of lipids of the emulsions in the course of pH-stat basic titration ($pH = 7$) in <i>in vitro</i> intestinal conditions	152
5.4	Evolution of the volume of titrant in the course of pH-stat basic titration ($pH = 7$) in <i>in vitro</i> intestinal conditions. Kinetics are compared between emulsions, fat-free matrices and emulsions with lipase inhibitor	154

6.1	Instruments mis à profit pour la fabrication des émulsions à l'échelle pilote .	158
6.2	Comparaison de l'effet des conditions opératoires des équipements du laboratoire et du pilote sur le diamètre médian des gouttelettes	159
6.3	Cinétiques de titration pH-stat durant la digestion intestinale <i>in vitro</i> pour les émulsions liquides et solides fraîchement produites (LE et SE), ou après lyophilisation puis réhydratation	161
6.4	Schéma temporel de l'étude <i>in vivo</i> et des analyses associées	163
6.5	Poids des contenus du cæcum et du côlon, et quantité d'acides gras à chaîne courte dans le cæcum des rats, après abattage, nourris avec l'émulsion liquide ou solid	164
6.6	Analyse par composante principale des différences entre les régimes des rats sur la composition du microbiote récupéré dans les fèces	164
6.7	Représentation schématique des paramètres de structures d'une émulsion influençant la libération des lipides et des protéines lors de la digestion	166
6.8	2016 était l'année des légumineuses, l'occasion de s'intéresser à leurs propriétés nutritionnelles mais aussi de renouveler les repas et d'avoir moins d'impact sur l'environnement.	180

C Liste des tableaux

1.1	Quelques données sur les principales protéines du lactosérum bovin	22
1.2	Principaux phénomènes physiologiques, biochimiques et biologiques survenant dans les différents étages de l'appareil digestif humain	26
1.3	Revue des études utilisant la méthode pH-stat appliquée à la protéolyse	43
1.4	Revue des études utilisant la méthode pH-stat appliquée à la lipolyse	44
2.1	Degree of hydrolysis at the end of 2 h of intestinal digestion and mean degrees of dissociation.	84
3.1	Main characteristics of the studied matrices.	95
3.2	Degrees of hydrolysis at different times of intestinal digestions estimated from pH-stat measurements on the matrices prepared at pH 7.0 (mean values \pm SD over 3 repetitions). K (h^{-1}) are the rate constant of the proteolysis kinetics as estimated with the SCP_{pH7} matrices. The total surface area developed by 5 g of the studied matrices is indicated.	103
4.1	Degree of hydrolysis (%) measured by OPA method, and from pH-stat measurements, at the end of the different sets of <i>in vitro</i> gastric digestions	123
5.1	Overview of the designed matrices	141
5.2	Degrees of hydrolysis (DH) by the end of the gastric phase, and of the intestinal phase.	147
6.1	Composition des 2 régimes pour l'étude <i>in vivo</i>	160
6.2	Ensemble de degrés d'hydrolyses obtenus pour les lipide et protéines, en phase gastrique et/ou intestinale	167

D Article publié dans *Food Research International*



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

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

In vitro digestion of foods using pH-stat and the INFOGEST protocol: Impact of matrix structure on digestion kinetics of macronutrients, proteins and lipids

Damien J.L. Mat^{a,b}, Steven Le Feunteun^{a,*}, Camille Michon^b, Isabelle Souchon^a^a UMR GMPA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78850, Thiverval-Grignon, France^b UMR GENIAL, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 91300, Massy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2015

Received in revised form 1 December 2015

Accepted 2 December 2015

Available online 3 December 2015

Keywords:

Food structure

Gastro-intestinal digestion

Pancreatin

Lipolysis

Proteolysis

Emulsion gel

ABSTRACT

It is currently admitted that food structure can facilitate or delay the release of nutrients during digestion and their absorption by the human body. The aim of this study is to propose an *in vitro* method able to assess the behavior of lipo-proteinic matrices with different structures during digestion. Two model matrices of exactly the same compositions (10% oil, 15% whey proteins, w/w) were designed: i) A liquid emulsion (LE) made of small fat droplets (1 μm) dispersed in a liquid continuous phase containing native whey proteins, ii) a solid emulsion (SE) made of a continuous whey protein gel entrapping large oil droplets (20 μm). The two matrices were digested through an *in vitro* gastro-intestinal protocol based on the INFOGEST guidelines using pH-stat to monitor the enzymatic hydrolyses of both proteins and lipids. By further digesting lipid-free matrices in the same conditions, the contributions of the proteolytic and lipolytic reactions were evaluated. Significant differences were observed between matrices at both short and long digestion times. The initial rates of both proteolysis and lipolysis were slower for SE than LE because of the gel state of the continuous phase. At the end of the experiments, SE led to a smaller extent of lipolysis ($DH_{lip,SE} = 51\% < DH_{lip,LE} = 81\%$) but a greater extent of proteolysis ($DH_{prot,SE} = 80\% > DH_{prot,LE} = 52\%$) because of the higher sensitivity to digestion of denatured whey proteins. These results highlight the impact of matrix structure on enzyme accessibility, and show that the proposed method is suitable to monitor the digestion of complex food matrices.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

It is now well-established that food structure can facilitate or limit the release and subsequent metabolization of nutrients. Understanding how food structure can modulate digestion kinetics and/or macronutrient digestibility has therefore become a main issue, which may lead to more-effective ways of maintaining a healthy diet. Knowledge on the food structure-physiology interactions may indeed be useful when considering the effects of particular diets and consumption habits, but also to design foods targeted for specific health functionalities (Norton, Wallis, Spyropoulos, Lillford, & Norton, 2014).

Food in the human digestive tract is subject to chemical-physics transformations while passing through the different compartments. In

the stomach, gastric secretions contain hydrochloric acid decreasing the pH to the 1–5 range (Guerra et al., 2012), as well as gastric lipase and pepsin which initiate the lipolytic and proteolytic reactions, respectively. In the case of solid food, the fragments are progressively grinded until their size is reduced enough to pass into the proximal part of the small intestine, the duodenum. In the small intestine, pH progressively rises to about 7, while the enzymes secreted in the pancreatic juice continue the hydrolysis of macronutrients. Pancreatic lipase, in association with its co-lipase, bile acids and other lipases perform lipolysis (Singh, Ye, & Home, 2009), while proteases, such as trypsin and chymotrypsin, perform proteolysis (Mackie & Macierzanka, 2010; Turgeon & Rioux, 2011). The hydrolysis of lipids and of proteins is considered almost complete at the end of the small intestine.

In vitro gastrointestinal digestion experiments have proved to be a powerful means to gain knowledge on the nutritional value of foods as they allow condition controlling and easy sampling (Guerra et al., 2012). Although the capacity of *in vitro* approaches to mimic the physiological reality is never perfect, they avoid difficulties inherent to *in vivo* studies such as costs, ethical considerations, technical complexity and variability. *In vitro* systems are various, leading to a diversity of protocols and physiological relevance levels. Dynamic models consist of different compartments through which the studied food passes while

Abbreviations: WPI, whey protein isolate; WP, whey proteins; FFA, free fatty acids; SSF, simulated salivary fluid; eSSF, electrolyte mix in the SSF; SGF, simulated gastric fluid; eSGF, electrolyte mix in the SGF; SIF, simulated intestinal fluid; eSIF, electrolyte mix in the SIF; LE, liquid proteinic emulsion-type matrix; LCP, liquid proteinic continuous phase matrix; SE, solid proteinic emulsion-type matrix; SCP, solid proteinic continuous phase matrix; DH, degree of hydrolysis.

* UMR GMPA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78850, Thiverval-Grignon, France.

E-mail address: steven.le-feunteun@grignon.inra.fr (S. Le Feunteun).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.002>
0963-9969/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

the digestive juices are dynamically added. In some cases, mechanical devices are also incorporated in order to mimic the breakdown of foods. Even though these dynamic models are based on *in vivo* digestion, their use is complex, mostly suitable for liquid foods, and involves complicated engineering and high costs. On the other hand, cost effectiveness and good adaptability to the needs of the studied foods are the main advantages of static *in vitro* systems. Their *in vivo* digestion equivalence is nevertheless a drawback. Moreover, as they can be easily set up in most laboratories, a great number of protocols have been proposed. This has raised the need for harmonization of the key parameters (transit times, pH, enzymes used and their activities), a work that has been undertaken during the INFOGEST cost action and which has recently led to the publication of an international consensus (Minekus et al., 2014).

In association with static systems, the pH-stat titration method is a classical approach to monitor the intestinal phase of *in vitro* digestions. It consists in maintaining constant the pH of a food in contact with a digestive fluid mixture, whereas the enzyme-substrate reaction would normally modify it. Therefore, the quantity of titrant added during the experiment versus time is directly related to the production of hydrolyzed species. The method is easy to set up and directly provides the dynamics of the reaction. pH-stat is most often used to measure the progress of the lipolytic reaction (Day et al., 2014; Li & McClements, 2014), but can also be used to monitor the digestion of protein solutions or gels. To our knowledge, the simultaneous study of lipolysis and proteolysis with pH-stat has not been proposed yet.

Indeed, lipids and proteins are generally associated in real foods. Lipids are most often consumed in the form of oil in water emulsions (milk, sauces...). In such systems, proteins can be found in the aqueous continuous phase but also at the interface. The structural elements of an emulsion-type food matrix can affect its digestion behavior. For instance, the size of the oil droplets is a major parameter governing the kinetics of lipolysis (Armand et al., 1999; Giang et al., 2015). Lipolysis is an interfacial reaction. Therefore, the rate of the reaction increases with the droplet surface area, i.e. smaller droplet sizes. Formulation and process conditions govern the droplet sizes in the emulsion, but transformations during digestion can also promote destabilization leading to a decrease in oil/water interface area (Clifton et al., 2011; Day et al., 2014). By controlling the emulsion stability against flocculation and coalescence, the nature of the interfacial layer is therefore also of importance for lipid digestion. Whey proteins can be used to achieve good stability of emulsions in gastric conditions (Clifton et al., 2011; Mantovani, Cavallieri, Netto, & Cunha, 2013). These proteins are reported to facilitate lipolysis compared to small surfactants, since they are subject to conformational changes through adsorption which can promote co-lipase anchorage and displacement action of bile salts (Mun, Decker, & McClements, 2007; Nik, Wright, & Corredig, 2010). Secondly, the physical state at a macroscopic scale of the continuous phase is an important parameter as liquid foods are prone to transiting through the stomach and intestine more rapidly than solid ones (Norton et al., 2014). Moreover, at a microscopic scale, whey proteins allow variations in the microstructure of the continuous phase. Their globular structure is sensible to heat and pH leading to various aggregated gel structures depending on gelation parameters. The sensitivity of whey proteins to hydrolysis is modulated by process conditions and is modified compared to native proteins (Macierzanka et al., 2012; Singh, Øiseth, Lundin, & Day, 2014).

The aim of this study was to develop a simple and robust method to assess the effects of the structures of complex food matrices on digestion. The association of a static *in vitro* digestion based on the INFOGEST protocol (Minekus et al., 2014) and a pH-stat method is proposed. The approach was used to investigate the digestion behaviors of two emulsion-type food matrices of identical compositions (10 wt% oil, 15 wt% whey proteins) but with different structures at the macroscopic and microscopic scales. Results are discussed in relation with the structural effects of the matrices on the kinetics and final extents (degrees of hydrolysis) of both lipolysis and proteolysis.

2. Materials and method

2.1. Materials

Rapeseed oil (Fleur de Colza, Lessieur, France) was purchased from a local supermarket. Whey protein isolate (WPI) (ProLacta 80) was purchased from Lactalis, France. The protein content was 72.9 wt% on dry powder measured by the Kjeldahl method (Nx6.25) in triplicate. Pepsin (P6887), pancreatin (P1750), pancreatic lipase (L3126) and bile extract (B8631) were all of porcine origin and obtained from Sigma-Aldrich, France. The enzyme activities and bile salt concentrations in the bile extracts were measured according to the assays detailed in Minekus et al. (2014). All other materials were standard analytical grade. Water was Milli-Q water.

2.2. Preparation of food matrices

Liquid-emulsions (LE) were prepared as follows. 15 g of whey proteins (WP) were dispersed in 50 g of water and allowed to rehydrate under continuous stirring at room temperature for at least an hour. 10 g of rapeseed oil were then added with water to achieve a final weight of 100 g. A coarse emulsification was made using a rotor-stator homogenizer (Polytron PT3100D) for 5 min at 10,000 rpm. This coarse emulsion was then treated with ultra-sounds for 10 min (10 s on/off cycles) in order to further reduce the size of the oil droplets (Bioblock Ultrasonic Processor 20 kHz, 130 W). During the two emulsification processes, the temperature within the sample was maintained below 30 °C using an ice bath. The final emulsion contained 15 wt% of whey proteins and 10 wt% of rapeseed oil.

Solid-emulsions (SE) were prepared as follows. 0.24 g of WP were dispersed in 60 g of water and allowed to rehydrate under continuous stirring at room temperature for at least an hour. 24 g of rapeseed oil were then added with water to achieve a final weight of 80 g and a coarse emulsion was made using the rotor-stator homogenizer for 5 min at 10,000 rpm. The emulsion was thereafter heated at 70 °C for 5 min to allow a certain degree of denaturation of proteins adsorbed at the interface of oil droplets. It was then mixed with a more-concentrated WP solution (22.33 wt%) in order to achieve final concentrations of 15 wt% of whey protein and 10 wt% of rapeseed oil. The emulsion was finally poured into 40 mL plastic cylindrical containers subsequently closed, immersed in a water bath, and heated for 30 min at 80 °C to produce a hard gel.

In order to estimate the respective contributions of proteolysis and lipolysis from the pH-stat signal, matrices only made of the continuous phases of the emulsions were also prepared and digested. The liquid proteinic continuous phase matrix (LCP) therefore consisted in a 15 wt% native whey protein solution while the solid proteinic continuous phase matrix (SCP) was made by heating LCP at 80 °C for 30 min.

2.3. Characterization of matrices

Granulometry: the oil droplet size distribution of the liquid emulsion was measured using laser light scattering (Mastersizer 2000, Malvern, France) with 1.47 as the refractive index of the oil and 1.33 as the refractive index of the dispersant (water). An absorption value of 0.001 was chosen for the optical properties of the emulsion. The volume-weighted mean diameter was calculated using $d_{4,3}(d_{4,3} = \sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3)$.

Confocal microscopy: solid (SE) and liquid (LE) matrices were observed with the use of confocal laser scanning microscopy (TCS SP2 AOBs by Leica, Solm, Germany) equipped with two He-Ne lasers with excitation wavelengths of 543 nm and 633 nm. A labeling protocol (Huc et al., 2014) was performed on lipids with the Bodipy 665/676 nm marker (Invitrogen, Carlsbad, NM, USA) and on proteins with the DyLight 488 nm marker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,

USA). Images shown in this paper correspond to superimpositions of images of the same area observed separately with the two markers.

Gel rheology: thermal gelation was also characterized using a rheometer (MCR 301, Anton Paar) fitted with a Couette geometry ($R_{cup}/R_{cylinder} = 1.085$). The following sequences defined by the process used for solid-emulsion were performed: a linear temperature ramp from 30 to 80 °C at 3 °C/min, a stabilization at 80 °C for 30 min, a cooling back down to 30 °C at 1 °C/min, then a final stabilization of the temperature at 30 °C for 20 min. The shear storage modulus at 0.1% deformation with 1 Hz frequency was measured all along.

2.4. *In vitro* digestion protocol

In vitro digestion experiments were carried out in a 50 mL bottle bathing in a jacketed beaker filled with water that was maintained at 37 °C by heat water circulation in the double wall. The whole set was mounted on a magnetic stirrer (375 rpm).

Electrolytes adjustment: the digestion protocol used follows the recommendations given by Minekus et al. (2014) but an adaptation in the composition of the electrolyte solutions was needed. Indeed, experiments were first conducted by strictly following the protocol recommendations, but when trying to perform pH-stat analyses during the intestinal phase the measured pH actually increased instead of decreasing. As shown in Fig. 1 (squares), the same phenomenon was observed when the simulated intestinal fluid electrolyte solution alone (eSIF) was placed in an open beaker at the concentration used during an intestinal digestion. The pH was continuously increasing above 7, while gas bubbles appeared on the glass surfaces of the pH probe and the vessel. On the contrary, when replacing NaHCO_3 by NaCl (circles in Fig. 1), pH remained stable at 7. Following INFOGEST guidelines, NaHCO_3 is present at 85 mM, which corresponds to 7.14 g/L, and is the major contributor to hydrogenocarbonates in the final solution. This concentration is much higher than the solubility limit of CO_2 (1.6 g/L at 20 °C). Being in contact with the ambient atmosphere with the pH-stat setting, the CO_2 concentration is therefore out of equilibrium and is rejected in its gaseous form, leading to a basification of the milieu. In all prepared solutions (oral,

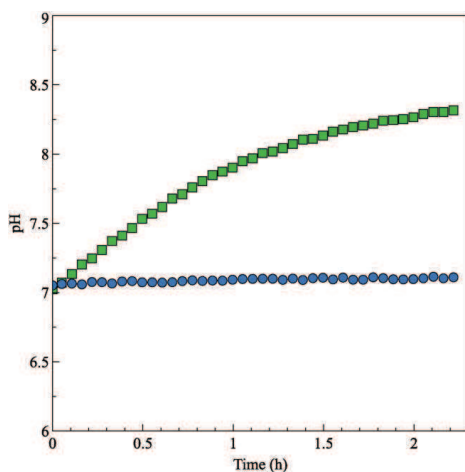


Fig. 1. pH evolution of the electrolyte solution used for intestinal phase (eSIF) when placed in an open beaker: (squares) eSIF prepared with respect to the *in vitro* digestion recommendations proposed by Minekus et al. (2014), and (circles) eSIF in which NaHCO_3 was replaced by NaCl.

gastric and intestinal) of the present study, NaHCO_3 was therefore replaced by NaCl at the same molar ratio in order to maintain the same ionic strength.

Gastro-intestinal digestion: apart from this salt replacement (NaCl instead of NaHCO_3) the protocol used was the same as in Minekus et al. (2014). Briefly, 5 g of food matrix were mixed with 5 mL of simulated salivary fluid (SSF) with no salivary α -amylase (no starch in the matrices). For solid matrices, they were artificially grinded with a domestic kitchen food chopper (Braun Turbo 600 W type 4191) during 3 s to produce pieces of solid gel ranging from 3 to 5 mm beforehand. For liquid matrices, the oral phase was only carried out for proper electrolyte concentrations and matrix dilution purposes. A few minutes were taken to reach temperature equilibrium at 37 °C before proceeding to the gastric phase. To launch the gastric phase, 10 mL of simulated gastric fluid (SGF) were added to the mixture. It consisted of SGF electrolyte solutions (eSGF), pepsin solution to achieve a 2000 U/mL activity in the final mixture, and HCl 1 N to lower pH to 3. The gastric phase was kept running for 2 h. Finally, 20 mL of simulated intestinal fluid (SIF) were added as the pH-stat titration was switched on. It consisted of SIF electrolyte solutions (eSIF), bile extract solution (10 mM bile salts in the final mixture), pancreatin added with pancreatic lipase (100 U/mL trypsin activity and 2000 U/mL lipase activity in the final mixture) and NaOH 1 N to adjust pH to 7. The intestinal phase was also 2 h long.

2.5. pH-stat monitoring for the intestinal proteolysis and lipolysis

As detailed in Sections 2.6 and 2.7, lipolysis and proteolysis performed by pancreatic enzymes lead to the release of protons, and hence to a decrease in pH. To monitor the kinetics of the reactions, an automatic titration unit (Titrino 7000, VWR, France) with a pH-stat programming to maintain the pH of the mixture at 7 was used with NaOH 0.1 N as the titrant solution. All pH-stat titrations were carried out in triplicates using a data acquisition frequency of 1 s.

Besides, 6 h long experiments were performed on the intestinal digestive mixture alone, without any added substrate, to determine whether the hydrolysis coming from the auto-digestion of the digestive fluids could be neglected. Results showed that this was not the case as there was a progressive addition of 0.420 mL of NaOH during the 2 h of intestinal phase (data not shown). As a conclusion, special care should be taken with such digestion protocol because auto-digestion of digestive fluids can contribute to the signal measured with pH-stat. In the present study, this contribution was taken into account for proper calculations of the degrees of hydrolysis.

2.6. Degree of proteolysis

During the hydrolysis of a peptide bond, one carboxylic group is produced along with one α -amino group. According to their low pK values, carboxylic groups release their proton at pH 7, which are titrated by NaOH during the pH-stat experiment. However, the co-produced α -amino group show pK values of about 7.4 at 37 °C (Adler-Nissen, 1986) and may therefore consume protons to form ammonium groups. In the latter case, the proton captured by the α -amino group therefore counteracts the one released by the carboxylic group and nothing is measured by titration (Nielsen, 1997). According to these phenomena, conversion from volumes of NaOH added into degree of hydrolysis ($\text{DH}_{\text{protein}}$, in %) can be calculated as follows (Asselin, Hébert, & Amiot, 1989; Spellman, McEvoy, O'Cuinn, & FitzGerald, 2003):

$$\text{DH}_{\text{protein}} = 100 \times \frac{V(\text{NaOH}) \times N(\text{NaOH})}{a(\text{RNH}_2) \times m(\text{protein}) \times h_{\text{tot}}} \quad (1)$$

where $V(\text{NaOH})$ is the volume (mL) of NaOH consumed during the titration, $N(\text{NaOH})$ is the NaOH normality (Eq/L), $m(\text{protein})$ is the protein mass (g), h_{tot} is the number of peptide bonds in the protein

substrate (= 8.8 meqv/g for whey proteins (Spellman et al., 2003)) and $\alpha(\text{RNH}_2)$ is the mean degree of dissociation of α -amino groups, which can be calculated as follows:

$$\alpha(\text{RNH}_2) = \frac{10^{(\text{pH}-\text{pK})}}{1 + 10^{(\text{pH}-\text{pK})}} \quad (2)$$

where pK is the average dissociation constant for the α -amino groups liberated during hydrolysis.

The value of pK depends on several parameters such as temperature, peptide chain length or the nature of the terminal amino acid. It can therefore vary depending on the protein substrate and enzymes used. To get a proper estimate of the pK value in our conditions, complementary experiments using the OPA (ortho-phthalaldehyde) method were therefore conducted.

Quantification of DH using OPA: Degrees of hydrolysis were measured on LCP at the end of an intestinal phase (with no preceding gastric phase) using the protocol proposed by Spellman et al. (2003) except that no SDS were added. Briefly, this method is based on the detection at 340 nm of a complex formed between the α -amino groups of peptides and OPA (ortho-phthalaldehyde) in the presence of N-acetyl-L-cysteine. The difference of absorbance between the hydrolyzed and the corresponding unhydrolyzed samples therefore provide the number of α -amino groups produced during the proteolytic reaction. In this study, a UV-Vis Spectrophotometer (Evolution 201, Thermo Scientific) was used and the unhydrolyzed samples were prepared by mixing LCP with heat-treated (90 °C – 10 min) SIF. By comparing the DH measured by the OPA method for LCP to the corresponding volume of added NaOH with pH-stat, a mean pK of the α -amino groups of about 7.85 could be estimated, which leads to a value of 0.12 for $\alpha(\text{RNH}_2)$ (Table 1). Note that the OPA method cannot be used to determine DH values with solid matrices because of sampling difficulties. For SCP, the degree of hydrolysis was therefore estimated using Eq. (1) with an $\alpha(\text{RNH}_2)$ value of 0.12.

2.7. Degree of lipolysis

When fully digested, one triglyceride molecule liberates two free fatty acids (FFA) coming from positions sn-1 and sn-3 as well as the sn-2-monoacylglyceride. Two moles of NaOH are therefore required to neutralize one mole of digested triglyceride. However, as for of proteins, all the FFA released are not necessarily readily ionized depending on the pH of the milieu and the pK of the fatty acids. In a similar way as previously described for proteolysis, the degree of hydrolysis for lipids (DH_{lipid} , in %) can be calculated as follows:

$$\text{DH}_{\text{lipid}} = 100 \times \frac{V(\text{NaOH}) \times N(\text{NaOH}) \times M(\text{lipid})}{a(\text{FFA}) \times m(\text{lipid}) \times 2} \quad (3)$$

where $V(\text{NaOH})$ and $N(\text{NaOH})$ have the same meaning as in Eq. (1), $m(\text{lipid})$ is the oil mass (g), $M(\text{lipid})$ is the molecular weight (g/mol) of the triglycerides in the oil (930 g/mol in this study), and $\alpha(\text{FFA})$ is the mean degree of dissociation of FFA carboxylic groups.

Table 1
Degree of hydrolysis at the end of 2 h of intestinal digestion and mean degree of dissociation of the peptide α -amino groups and fatty acid carboxyl groups.

Nutrients	Matrix	Degree of hydrolysis (%)	Degree of dissociation (correction factor)
Proteins	Liquid	52 ± 2	0.12 (α in Eq. (1))
	Solid	80 ± 1	
Lipids	Liquid	81 ± 10	0.54 (α in Eq. (3))
	Solid	51 ± 6	

To estimate the value taken by $\alpha(\text{FFA})$ in our experimental conditions, complementary 6 h30-long intestinal digestions were performed on reduced quantities (0.5 g) of an emulsion with 10 wt% rapeseed oil and 0.1 wt% WP in order to reach 100% liberation of fatty acids (controlled by the appearance of a real plateau during pH-stat measurements). Taking into account the auto-digestion of pancreatic juice, $\alpha(\text{FFA})$ was estimated to be 0.54 (Table 1). Note that this value corresponds to a pK of about 6.9 (Eq. (2)), which is in good agreement with the reported pK values for long chain fatty acids (Fernandez et al., 2008).

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the designed emulsions

Confocal microscopy images and droplet size distributions of the two emulsions are presented in Fig. 2. As expected, oil droplets are bigger in the solid emulsion (SE) and seem more poly-dispersed (Fig. 2B and D) than in the liquid emulsion (LE) (Fig. 2A and C). Mean droplet diameters were $0.748 \pm 0.055 \mu\text{m}$ for LE and $19.842 \pm 0.569 \mu\text{m}$ for the SE emulsion before the first heat treatment (Fig. 2C and D, respectively). Droplet size changes in SE after the first heat treatment were controlled using laser granulometry and found not significant. In LE, a uniform green background can be seen, suggesting a homogenous protein solution continuous phase (Fig. 2A). On the contrary, the continuous phase made of proteins shows irregularities in the SE structure (Fig. 2B), suggesting a non-homogenous gelation process during the second heat treatment (30 min at 80 °C). The rheology test performed on the SE gave the value of $58 \pm 1 \text{ kPa}$, corresponding to a quite high hardness. As a conclusion, the two designed matrices were different in both microstructure (droplet diameter ratio SE/LE = 26.5) and macrostructure (liquid vs solid).

3.2. Digestion of the liquid and solid emulsions

The results from pH-stat experiments during the intestinal digestion of the liquid and solid emulsions are shown in Fig. 3A. Both kinetics are similar in shape, with a fast rate at the beginning of the titration followed by a progressive slowing down leading to a pseudo-plateau that was reached earlier for LE (~0.1 h) than SE (~1 h). The final volume of added NaOH is also similar for both matrices (about 9 mL). A semi-log scale (Fig. 3B) was also used to give a complementary view of the data at both short and long digestion times. It confirms the faster liberation of titrated elements during the first minutes (6.3 mL within 0.1 h) for LE. Then the kinetics slow down to reach 8.9 mL at the end of the 2 h of digestion but do not tend to a plateau, indicating that the reactions were not ended at this time. The SE curve shows a rather reduced rate of hydrolysis at the beginning of the digestion. It starts to increase at a smaller rate than the LE curve and finally crosses it after 23 min. At the end of the 2 h, the SE curve has attained 9.5 mL. Like for LE, a real plateau is not reached after 2 h.

The different shapes of the titration curves can be related to the different physical states of the matrices. Protein molecules and oil droplets are moving freely in LE. Therefore, both substrates are rapidly exposed to the enzyme actions. On the contrary, gel pieces were still visible for SE after 2 h of gastric phase, implying that oil droplets were still entrapped in the proteinic network of gel pieces for this matrix. Therefore, enzymes have to diffuse into the SE gel pieces before finding their substrate, which leads to slower digestion kinetics. Luo, Boom, and Janssen (2015) have also compared *in vitro* gastric digestions of WP solutions and gels and explain similar behaviors by a “zipper” type mechanism for the proteins-in-solution reaction (fast initial hydrolysis followed by a steadier stage) opposed to a “one-by-one” mechanism for proteinic gels (slower initial rate followed by a more-sustained trend).

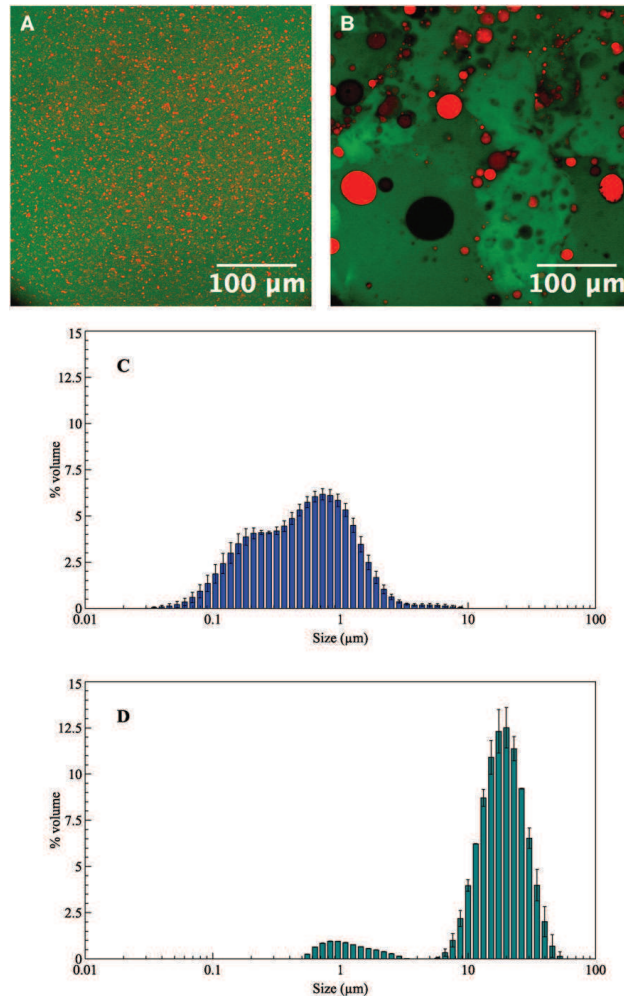


Fig. 2. Characterization of the microstructures of emulsions containing 15 wt% rapeseed oil and 10 wt% whey proteins. Confocal micrographs of the liquid emulsion (A) and the solid emulsion (B) at magnification $\times 40$ (lipids appear in red and proteins in green). Laser light scattering determination of the sizes of the oil droplets in the liquid emulsion (C) and in the emulsion prepared before heat treatment of the solid matrix (D).

3.3. Digestion of the proteinic continuous phase matrices (SCP and LCP)

In order to estimate the proteolysis contribution during pH-stat experiments performed on SE and LE, lipid-free matrices with the same structures were studied. This implicitly supposes that the absence of oil droplets does not significantly influence the kinetics of proteolysis and the structure of the protein network. Under these hypotheses, one can expect the overall trends and final extents of digestion to be largely unchanged.

It can first be noted that, as for SE, gel pieces of SCP were almost not modified in shape at the end of the gastric phase, implying limited pepsin hydrolysis and the persistence of solid state effects on digestion.

The pH-stat results obtained during the intestinal digestion of the liquid and solid proteinic continuous phase matrices (LCP and SCP) are presented in Fig. 4A and B on a linear and semi-log scale, respectively. Both curves draw similar trends to the ones shown in Fig. 3 with a faster reaction rate in the first minutes of digestion, and similar inflection points and slowdowns. This result validates the major contribution of the continuous phase's physical state on hydrolysis kinetics. In this case, however, a real plateau is reached for both LCP and SCP (Fig. 4A and B), indicating that the proteolysis reactions were finished within the 2 h of intestinal digestion. The major difference between the liquid and solid matrices lies in the final levels of NaOH added which, after 2 h, were of 4.2 mL and 6.5 mL, respectively. This means that the

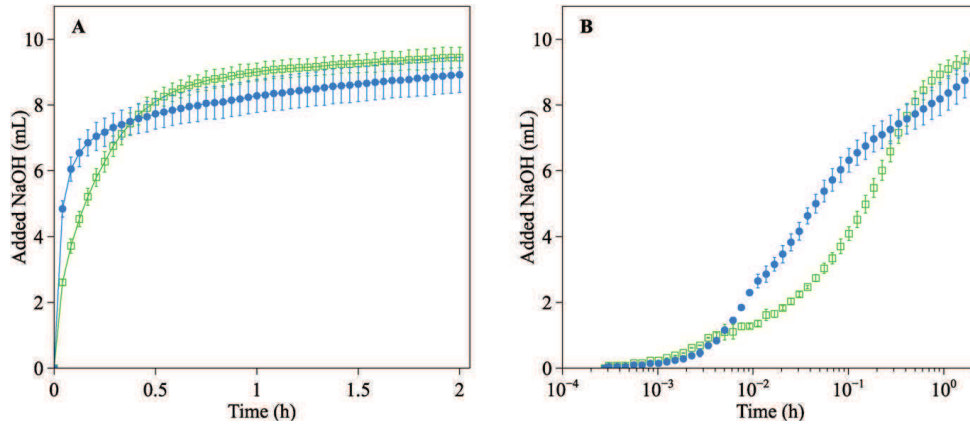


Fig. 3. pH-stat profiles measured during the intestinal phases of digestion for the liquid emulsion (filled circles) and the solid emulsion (open squares) on linear (A) and semi-log (B) scales. Values are means \pm SD over 3 replicates.

contribution of proteolysis to the overall pH-stat signal measured during digestion of the lipo-proteinic emulsions was important, and represented about 50% and 70% of the added NaOH for LE and SE, respectively.

At the end of the intestinal phase, the degree of hydrolysis was estimated to be $52 \pm 2\%$ for LCP and $80 \pm 1\%$ for SCP (Table 1). These results are in good agreement with the recent studies of Picariello et al. (2015) and Egger et al. (in this issue) who reported values of about 60% using the INFOGEST *in vitro* protocol to digest dairy proteins. Besides, the greater final level reached with SCP than LCP can probably be attributed to the greater sensitivity of denatured whey proteins to hydrolysis by intestinal proteases. This finding is indeed consistent with the literature (Macierzanka et al., 2012; Singh et al., 2014).

3.4. Estimation of the lipolytic kinetics

The contributions of the lipolysis reactions to the SE and LE kinetics were approximated by subtracting, point by point, the pH-stat data

collected with proteinic continuous phase (LCP and SCP) from the ones collected with emulsions (LE and SE). Results are presented in Fig. 5 (linear and semi-log). The curve shapes are similar to the ones obtained for the digestions of emulsions (LE, SE) and proteinic continuous phases (LCP, SCP) (Figs. 3 and 4), meaning a faster rate in the first minutes followed by slower kinetics after an inflection point. Comparatively to Fig. 4 though, the final amount of added NaOH obtained with the liquid matrix is higher than the solid one (4.7 mL vs. 2.9 mL). Moreover, a real plateau was not reached after 2 h for both curves, as previously observed with LE and SE (Fig. 3). This demonstrates that the kinetics of lipolysis are slower than the kinetics of proteolysis (Fig. 4).

Using Eq. (3), a final degree of lipolysis of $81 \pm 10\%$ and of $51 \pm 6\%$ for the lipids of LE and SE were found, respectively (Table 1). The order of magnitude of these values are in good accordance with the literature (Giang et al., 2015; Li & McClements, 2010; Williams et al., 2012). Besides, the higher level of lipolysis for LE than SE may be related to the physical state of the continuous phase and to the sizes of the oil

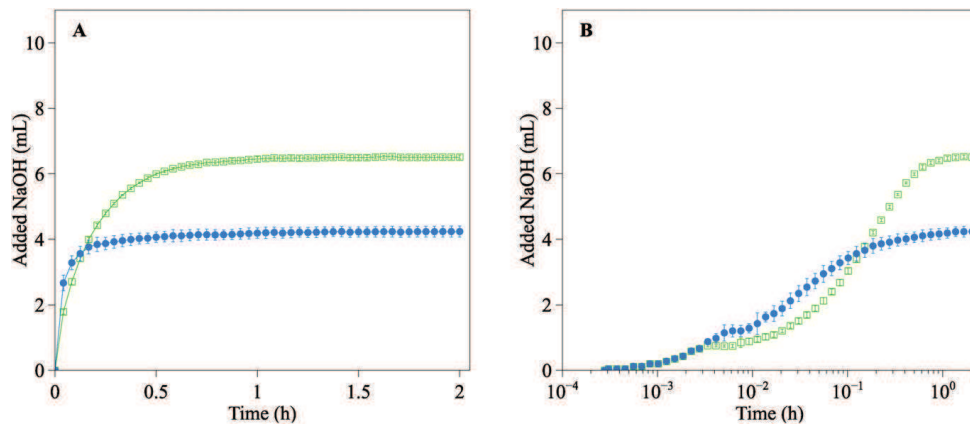


Fig. 4. pH-stat profiles measured during the intestinal phases of digestion for the liquid proteinic continuous phase matrix (filled circles) and the solid proteinic continuous phase matrix (open squares) on linear (A) and semi-log (B) scales. Values are means \pm SD over 3 replicates.

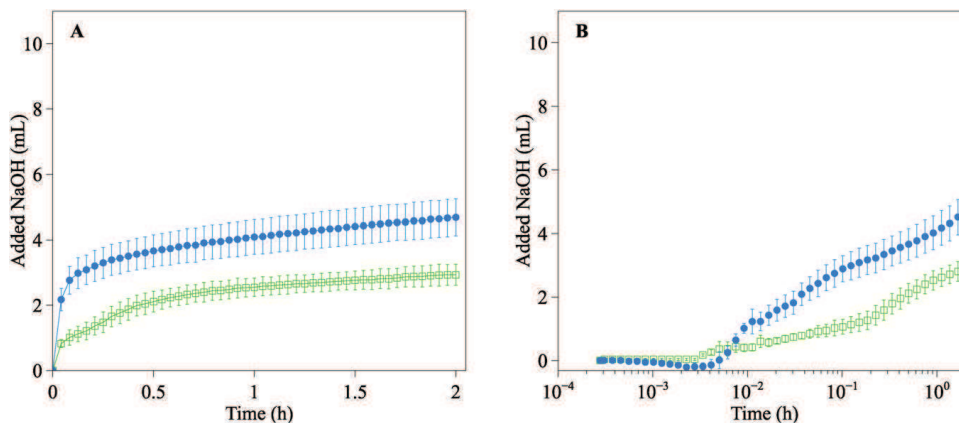


Fig. 5. pH-stat profiles of the lipolysis during the intestinal phases of digestion estimated by subtracting Fig. 4 from Fig. 3, for lipids in the liquid emulsions (filled circles) and in the solid emulsions (open squares), on linear (A) and semi-log (B) scales. Values are means \pm SD over 3 replicates.

droplets in the emulsions. Indeed, lipids are readily available for hydrolysis as soon as enzyme adjunction has been made for LE, whereas pancreatic lipase have to diffuse into the gel pieces and/or oil droplets must first be liberated from the protein gel network for the reaction to take place. Moreover, the faster rate of titration for LE may also be related to the smaller sizes of oil droplets dispersed in it. Lipolysis is an interfacial enzymatic reaction; so, for the same amount of lipids, the smaller the droplets, the larger the oil/water interfacial area, and the faster the reaction.

The fact that lipolysis is not finished at the end of the experiments is a classical result with long-chain triglycerides (Clifton et al., 2011; Giang et al., 2015; Li & McClements, 2010). The slowdown in the kinetics could be due to an inhibition of the reaction by the lipolysis products (Mun et al., 2007; Pafumi, 2002) or a certain degree of coalescence that decreased the interface area available to the lipase action (Giang et al., 2015; Clifton et al., 2011; Day et al., 2014).

4. Conclusion

This study was aiming at developing a methodology to compare structure-related effects of model lipo-proteinic foods on their digestion. The feasibility and interest of using the pH-stat method in association with the INFOGEST *in vitro* digestion protocol was proved. It resulted in a simple and quantitative method that allows a continuous monitoring of the intestinal digestions of both proteins and lipids. This method is a very valuable add-on to the INFOGEST protocol because it makes possible to follow *in vitro* digestion in real time without the requirement of samplings at specific time points.

Applying this method to model emulsion-type food matrices with the same compositions but different structures allowed observing differences in their digestion kinetics and extents for both proteins and lipids. The physical state of the continuous phase and the native *versus* denatured state of whey proteins were found to be important factors of the overall dynamics for both protein and lipid digestion.

Acknowledgments

This work received support from the French National Research Agency under the "Investissements d'Avenir" program (reference No. ANR-11-IDEX-0003-02). The author would like to thank Thomas

Cattenoz (UMR782 GMPA, Thiverval-Grignon, France) for his help with the setting of the digestion protocol. A special thank to Véronique Bosc (UMR1145 GENIAL, Massy, France) for sharing her knowledge of the emulsification process and to Gabrielle Moulin and Delphine Huc for their help for confocal microscopy observations. The authors are involved in the Food and Agriculture COST (European Cooperation in Science and Technology) Action FA1005 "Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process (INFOGEST)".

References

- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Science Limited.
- Armand, M., Pasquier, B., André, M., Borel, P., Senft, M., Peyrot, J., et al. (1999). Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(6), 1096–1106.
- Asselin, J., Hébert, J., & Amiot, J. (1989). Effects of *in vitro* proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. *Journal of Food Science*, 54(4), 1037–1039. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb07938.x>
- Clifton, P. M., Golding, M., Keogh, J., Wooster, T. J., Lundin, L., Xu, M., et al. (2011). Impact of gastric structuring on the lipolysis of emulsified lipids. *Soft Matter*, 7(7), 3513. <http://dx.doi.org/10.1039/c0sm01227k>.
- Day, L., Golding, M., Xu, M., Keogh, J., Clifton, P. M., & Wooster, T. J. (2014). Tailoring the digestion of structured emulsions using mixed monoglyceride-caseinate interfaces. *Food Hydrocolloids*, 36, 151–161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.019>.
- Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., et al. (2015). *The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action* (in this issue).
- Fernandez, S., Rodier, J. D., Ritter, N., Mahler, B., Demarne, F., Carrière, F., & Jannin, V. (2008). Lipolysis of the semi-solid self-emulsifying excipient Gelucire (R) 44/14 by digestive lipases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1781(8), 367–375. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.05.006>.
- Giang, T. M., Le Feunteun, S., Gaucel, S., Brestaz, P., Anton, M., Meynier, A., & Trelea, I. C. (2015). Dynamic modeling highlights the major impact of droplet coalescence on the *in vitro* digestion kinetics of a whey protein stabilized submicron emulsion. *Food Hydrocolloids*, 43, 66–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.037>.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 591–600. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.001>.
- Huc, D., Mariette, F., Challos, S., Barreau, J., Moulin, G., & Michon, C. (2014). Multi-scale investigation of eyes in semi-hard cheese. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 24, 106–112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.10.002>.
- Li, Y., & McClements, D. J. (2010). New mathematical model for interpreting pH-stat digestion profiles: impact of lipid droplet characteristics on *in vitro* digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 8085–8092. <http://dx.doi.org/10.1021/jf101325m>.
- Li, Y., & McClements, D. J. (2014). Modulating lipid droplet intestinal lipolysis by electrostatic complexation with anionic polysaccharides: Influence of cosurfactants. *Food Hydrocolloids*, 35, 367–374. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.011>.
- Luo, Q., Boom, R. M., & Janssen, A. (2015). Digestion of protein and protein gels in simulated gastric environment. *LWT-Food Science and Technology*. <http://dx.doi.org/10.1021/jf60208a021>.

- Macierzanka, A., Böttger, F., Lansonneur, L., Groizard, R., Jean, A. -S., Rigby, N. M., et al. (2012). The effect of gel structure on the kinetics of simulated gastrointestinal digestion of bovine β -lactoglobulin. *Food Chemistry*, 134(4), 2156–2163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.018>.
- Mackie, A., & Macierzanka, A. (2010). Colloidal aspects of protein digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1–2), 102–108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.005>.
- Mantovani, R. A., Cavallieri, A. L. F., Netto, F. M., & Cunha, R. L. (2013). Stability and in vitro digestibility of emulsions containing lecithin and whey proteins. *Food & Function*, 4(9), 1322–1331. <http://dx.doi.org/10.1039/c3fo60156k>.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, N. C., et al. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – An international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–1124. <http://dx.doi.org/10.1039/c3fo60702j>.
- Mun, S., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2007). Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Research International*, 40(6), 770–781. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2007.01.007>.
- Nielsen, P. M. (1997). Functionality of protein hydrolysates. *Food proteins and their applications* (pp. 694). Taylor & Francis.
- Nik, A. M., Wright, A. J., & Corredig, M. (2010). Surface adsorption alters the susceptibility of whey proteins to pepsin-digestion. *Journal of Colloid and Interface Science*, 344(2), 372–381. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2010.01.006>.
- Norton, J. E., Wallis, G. A., Spyropoulos, F., Lillford, P. J., & Norton, I. T. (2014). Designing food structures for nutrition and health benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(1), 177–195. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092315>.
- Pafumi, Y. (2002). Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(31), 28070–28079. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M202839200>.
- Picariello, G., Miralles, B., Mamone, G., Sánchez-Rivera, L., Recio, I., Addeo, F., & Ferranti, P. (2015). Role of intestinal brush border peptidases in the simulated digestion of milk proteins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(5), 948–956. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201400856>.
- Singh, H., Ye, A., & Horne, D. (2009). Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Progress in Lipid Research*, 48(2), 92–100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2008.12.001>.
- Singh, T. K., Øiseth, S. K., Lundin, L., & Day, L. (2014). Influence of heat and shear induced protein aggregation on the in vitro digestion rate of whey proteins. *Food & Function*, 5(11), 2686–2698. <http://dx.doi.org/10.1039/c4fo00454j>.
- Spellman, D., McEvoy, E., O’Cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13(6), 447–453. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00053-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00053-0).
- Turgeon, S. L., & Rioux, L. -E. (2011). Food matrix impact on macronutrients nutritional properties. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1915–1924. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.026>.
- Williams, H. D., Sassene, P., Kleberg, K., Bakala-N’Goma, J. -C., Calderone, M., Jannin, V., et al. (2012). Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, part 1: Method parameterization and comparison of in vitro digestion profiles across a range of representative formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(9), 3360–3380. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.23205>.

E Posters

Sont réunis ici tous les posters réalisés au cours de la thèse pour des conférences internationales, présentés par ordre chronologique.

D. J. L. Mat^{a,b}, S. Le Feunteun^a, C. Michon^b, M. Beaumont^c, F. Blachier^c, D. Jaoui^d, M. Leclerc^d, I. Souchon^a

a. UMR782 GMPA, AgroParisTech/INRA
 b. UMR1145 GENIAL, AgroParisTech/INRA
 c. UMR914 PINCA, AgroParisTech/INRA
 d. UMR 1319 NICALIS, AgroParisTech/INRA

La structure d'aliments modèles, contrôlée par le procédé, permet de moduler les cinétiques de digestion en condition *in vitro*.

Contexte

Il a été démontré que le régime alimentaire a un potentiel de modulation du microbiote intestinal de l'hôte. Toutefois, les liens entre alimentation, microbiote et santé restent complexes.

Objectif

Comprendre la modulation des cinétiques de digestion des lipides et des protéines à partir de matrices alimentaires de structure contrôlée, lors de leur déconstruction au cours d'une digestion *in vitro*.

Stratégie

- Conception raisonnée de deux matrices modèles de type émulsion lipo-protéique : composition identique mais propriétés structurales différentes afin de rendre vers une cinétique différente de mise à disposition des nutriments lors de la déconstruction dans le tube digestif[1][2].
- Digestion *in vitro* statique des matrices et suivi par titration de la dynamique de libération des nutriments.

Matériel et méthodes

Fabrication des matrices alimentaires

Composition identique :
15 % protéines de lactosérum + 10 % matière grasse

Procédé

Macro et micro structures des matrices différenciées

Matrice liquide → Matrice solide

Digestion *in vitro* statique et titration

- Digestion *in vitro* statique selon les recommandations du COST INFOGEST [3]: 37°C sous agitation ; **phase gastrique** (pH 3, pepsine, 2h) puis **phase intestinale** (pH 7, pancréatine, lipase, bile, 2h).
- Phase intestinale maintenu à pH 7 par titration automatique à la soude [4] :
 - Dynamique d'ajout de soude = dynamique réactions enzymatiques.
 - Protéolyse et lipolyse titrées simultanément :

Résultats

Digestion lipo-protéique en phase intestinale des deux matrices

- Phase I : cinétique ML plus rapide que MS
- Phase II : cinétiques similaires entre les deux matrices ML et MS
- H : les gouttelettes plus fines de ML développent une plus grande surface d'échange pour interagir avec les enzymes ; les gouttelettes de MS sont par ailleurs moins accessibles aux enzymes car contenues dans une phase continue solide.

Digestion protéique en phase intestinale des deux matrices sans lipides

- Matrices protéiques : validation du suivi cinétique de digestion des protéines par simple titration
- Régime de plateau au bout d'une heure
- H : L'état de dénaturation des protéines influe sur les cinétiques et la biodisponibilité *in vitro* ; les protéines ayant subi un traitement thermique sont "plus digérées" en conditions *in vitro*.

Digestion lipidique en phase intestinale des deux matrices lipo-protéiques par soustraction

- Mise en évidence des cinétiques de digestion des lipides par soustraction de la contribution des protéines sur les cinétiques de digestion des matrices lipo-protéiques.
- Lipolyse de ML plus rapide et plus intense que MS car accessibilité enzymatique facilitée par :
 - plus grande surface d'échange entre la phase aqueuse et la phase continue
 - l'état liquide de la phase continue
- Lipolyse non terminée après 2h de digestion *in vitro* pour les deux matrices

Comparaison semi-log de toutes les digestions en phase intestinale

- Intérêt de l'échelle log en temps pour distinguer les temps courts et écraser les temps longs de la digestion
- Mise en évidence des différences de régimes entre matrice liquide et matrice solide :
 - aux temps courts, expliquées par les cinétiques de lipolyse
 - aux temps long, expliquées par une protéolyse terminée

Conclusions

- Deux matrices alimentaires modèles de type émulsion lipo-protéique ont été conçues. Elles présentent une composition identique mais des structures différentes aux échelles macro et micro.
- Ces deux aliments modèles montrent des cinétiques de digestion en condition *in vitro* différenciées (digestion plus ou moins rapide). De plus les cinétiques de protéolyse ont pu être distinguées de celles de la lipolyse.

Perspectives

- Compléter les mesures par d'autres méthodes (imagerie RMN, spectroscopie) et identifier les processus mécanistiques de déconstruction ces matrices.
- Etude *in vivo* chez le rat en collaboration : impact des matrices sur des marqueurs du métabolisme et du comportement alimentaire associé à l'analyse du microbiote.



Damien J. L. Mat
 INRA, GMPA, Bât CBA1
 Avenue Lucien Brétignières
 FR - 78850 Thiverval-Grignon
 damien.mat@grignon.inra.fr

Journées Francophones de Nutrition - Décembre 2014 - Bruxelles

Références :

- [1] McClements, Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles, Current Opinion in Colloid & Interface Science, Volume 17, Issue 3, 2012
- [2] Mackie, Macierzanka, Colloidal aspects of protein digestion, Current Opinion in Colloid & Interface Science, Volume 15, Issues 1-2, 2010
- [3] Minekus et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus, Food & Function, Issue 6, 2014
- [4] David, Julien, McClements, Yan, Li, Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components, Advances in Colloid and Interface Science, Volume 159, Issue 2, 15 September 2010.

Damien Mat^{a,b}, S. Le Feunteun^a, I. Souchon^a, C. Michon^ba. UMR782 GMPA, AgroParisTech/INRA, Thiverval-Grignon, France
b. UMR1145 GENIAL, AgroParisTech/INRA, Massy, France

Designing emulsion-type food structures to modulate lipid and protein digestion

Context

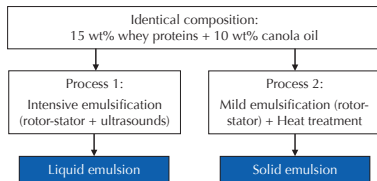
It is currently admitted that the structure of food can facilitate or delay the release of nutrients during digestion. Oil droplet size of an emulsion [1] and the physical state of the continuous phase [2] have been reported as key parameters to influence digestion, *in vitro* and *in vivo*.

Objectives

- Process two emulsions of the same composition but differently structured, controlling the dispersed phase as well as the continuous phase.
- Design the emulsion in order to achieve as opposite digestion behaviors as possible.
- Validate the matrix structure effects on digestion in *in vitro* conditions.

Methods

Food matrix processing



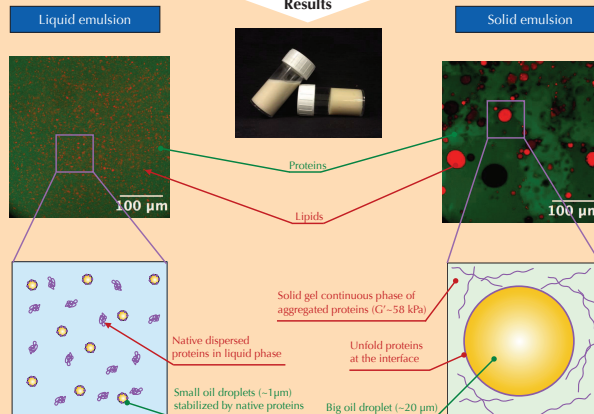
Physico-chemical characterization

- Confocal laser scanning microscopy : markers for lipids (Bodipy) and proteins (Dylight)
- Rheology : gelation of the continuous phase with Couette geometry
- Laser particle size analysis
- Differential scanning calorimetry (DSC)

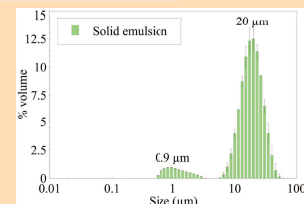
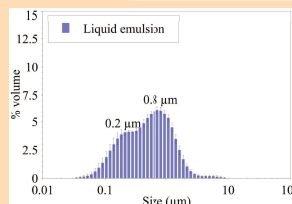
Monitoring digestion kinetics

- Gastro-intestinal *in vitro* static digestion
- Using the INFOGEST COST guidelines [3]
- Titration in pH-stat mode during the intestinal phase to monitor enzymatic reactions
- Digestion of the two emulsions
- Digestion of the proteinic continuous phase (fat-free matrices)

Results

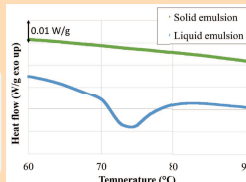


Droplets in solid emulsion ~25x larger than in liquid emulsion

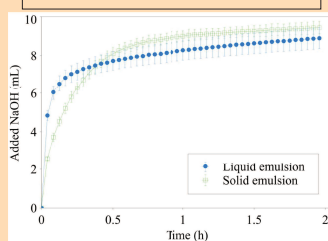


Denaturation of proteins (DSC analysis)

- Denaturation and cross-linking occurs at ~74°C
- No significant denaturation observed in the liquid emulsion
- Complete denaturation in the solid emulsion

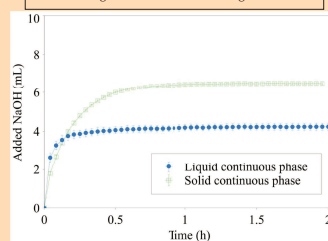


① Kinetics of intestinal digestion for the emulsions



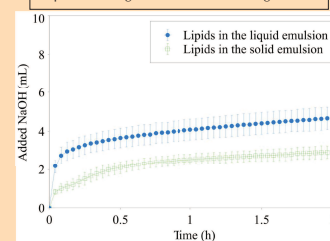
- Faster initial rate of digestion with liquid emulsion
- Pseudo plateau reached after 30 min for the liquid emulsion, after 1 h for the solid emulsion
- Digestion not completed after 2 h

② Contribution of proteins (continuous phase) during kinetics of intestinal digestion



- Plateau: Protein hydrolysis completed within one hour
- Proteins in solid continuous phase hydrolyzed to a greater extent than in liquid phase. \square : denaturation of proteins facilitates their digestion

① - ② Calculated contribution of lipids (dispersed phase) during kinetics of intestinal digestion



- Lipolysis not completed after 2h but more advanced with the liquid emulsion than for the solid one
- \square : droplets readily available for enzymes in the liquid state of continuous phase
- \square : smaller droplet size in liquid emulsion leads to greater interfacial area

Conclusions and Perspectives

- Two food emulsions were designed in order to achieve two very differentiated structures at the micro and macro level, while keeping the same composition.
- These emulsions led to different kinetics and different levels of both lipolysis and proteolysis in *in vitro* digestion conditions: initial rate of hydrolysis was faster with the liquid emulsion than the solid one. The final level of lipolysis was also enhanced in the liquid emulsion thanks smaller to droplets but the denatured proteins of the thermo-set solid emulsion could explain the greater final extent of proteolysis.
- In progress: an *in vivo* study on rats with these emulsions. Metabolization markers and microbiota metabolomics analysis, showing the impact of food structure on digestion as well on microbiota.



Damien Mat
INRA, GMPA, Bât CBAI
Avenue Lucien Bréguiniers
FR - 78850 Thiverval-Grignon
damien.mat@agroparistech.fr

Food Structures, Digestion, Health, 3rd international conference, 28-30th October 2015, Wellington, New-Zealand

[1] Giang, T. M. et al. (2015). *Food Hydrocolloids*, 43, 66-72. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.037>

[2] Barbé, F. et al. (2013). *Food Chemistry*, 136(3-4), 1203-1212. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.022>

[3] Mtnikus, M. et al. (2014). *Food & Function*, 5(6), 1113-1124. <http://doi.org/10.1039/C3fo60702j>

For more informations on the present work, see submitted article: Mat, D., Le Feunteun, S., Michon, C., Souchon, I. (2015). *In vitro* digestion of foods using pH-stat and the INFOGEST protocol: Impact of matrix structure on digestion kinetics of macronutrients, proteins and lipids. *Food Research International*.

Damien Mat^{a,b}, S. Le Feunteun^a, C. Michon^b, I. Souchon^a

a. UMR782 GMPA, AgroParisTech/INRA, Thiverval-Grignon, France
b. UMR1145 GENIAL, AgroParisTech/INRA, Massy, France

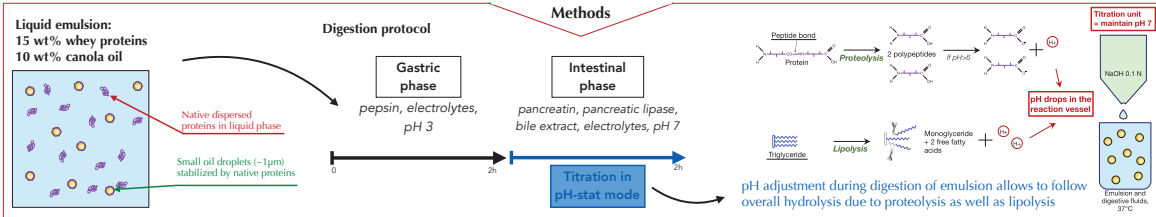
A pH-stat protocol based on the INFOGEST* guidelines to monitor the *in vitro* intestinal proteolysis and lipolysis kinetics of complex emulsions

Context

An international consensus for static *in vitro* digestion of foods has been proposed aiming at an harmonization of conditions used in different research groups and in different studies [1]. However its efficiency to study complex foods still needed to be tested. The pH-stat method is a very convenient method to instantaneously monitor the enzymatic reactions kinetics occurring during digestion while allowing to study complex food matrices.

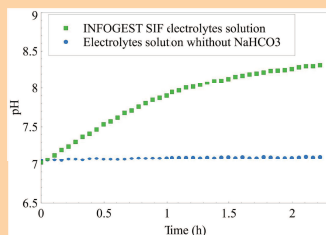
Objectives

- To adapt the INFOGEST protocol to a pH-stat method in order to follow enzymatic reactions kinetics during the intestinal digestion of an emulsion.
- To distinguish the contributions of proteolysis and lipolysis occurring in the measured kinetics, and to estimate the extent of each reaction.



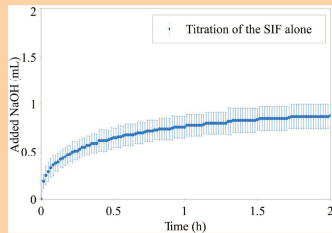
Two important points for implementation of the INFOGEST protocol with the pH-stat method:

△ Necessity to adapt the electrolyte mix used in the simulated intestinal fluid (SIF)



- pH is increasing if INFOGEST recommendations of salt concentration are strictly followed
- Explanation: [NaHCO₃] is above the solubility limit in an open volume at 37°C, leading to CO₂ release and pH increase
- Solution: NaHCO₃ replacement with NaCl at the same molarity to maintain the ionic strength → pH changes only if enzymatic reaction occurs

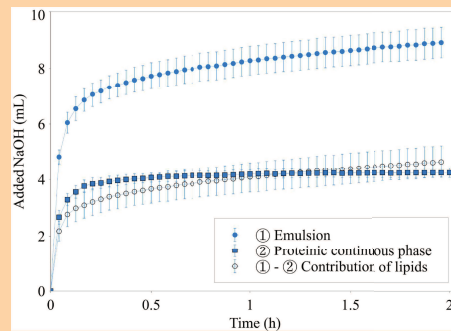
△ Necessity to titrate the simulated intestinal fluid alone



- pH evolves with enzyme and bile alone (no matrix here)
- Accounted as a blank: this contribution was subtracted to all other measurements

Results

Digestion kinetics of the emulsion and identification of hydrolysis due to the proteic continuous phase, and due to the lipidic dispersed phase.



- ① Titration of the digested emulsion:
 - Quick start followed by a deceleration of the reaction
 - Lipids and proteins consumption titrated altogether
 - ② Digestion of the proteic continuous phase alone (fat-free matrix):
 - Plateau: protein hydrolysis completed within one hour
 - Contribution of proteins can be subtracted from the whole emulsion titration curve to estimate the lipolysis kinetics.
- ① - ② = Dispersed phase hydrolysis:
• Digestion of lipids not completed within 2 h

Calculation of final degrees of hydrolysis (DH): Proteolysis and lipolysis

V_{NaOH} (mL) volume of NaOH added during the titration
 N_{NaOH} (Eq/L) normality of NaOH used
 m (g) mass of protein or lipid in the digested sample
 n_{tot} number of peptide bonds in the protein substrate (= 8.8 meq/g for whey proteins [2])

→ α factors (degree of H⁺ dissociation) are the only unknown parameters. They were determined as follows:

$$DH_{lipid} = 100 \times \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH}}{\alpha_{FFA} \times m_{lipid} \times 2}$$

$$DH_{protein} = 100 \times \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH}}{\alpha_{RNH_2} \times m_{protein} \times n_{tot}}$$

Nutrient	Method used	Correction factor α	Final degree of hydrolysis (%)
Proteins	photo-spectroscopic analysis (OPA method)	$\alpha_{RNH_2} = 0.12$ mean degree of dissociation of α -amino groups	52 ± 2
Lipids	digestion of a 0.1 wt% protein emulsion to achieve 100% digestion (stable plateau)	$\alpha_{FFA} = 0.54$ mean degree of dissociation of free fatty acids carboxylic groups	81 ± 10

Conclusions and Perspectives

- The INFOGEST guidelines for gastro-intestinal *in vitro* digestions were implemented through a pH-stat method. However an adaptation of the concentration of electrolytes in the simulated intestinal fluid was necessary, and a blank with no food must be measured first.
- A liquid emulsion of 15 wt% whey proteins and 10 wt% canola oil was used as a model complex food. Enzymatic reactions during the intestinal phase were monitored.
- Proteolysis was monitored alone to measure its contribution to the titration of the whole emulsion. Final degrees of lipid and protein hydrolysis were calculated and agreed with the literature.
- The pH-stat has proved to be a simple and efficient method allowing to follow *in vitro* digestion of emulsion and to obtain a characterization of kinetics and levels of both lipolysis and proteolysis
- This protocol should now be tested on other complex food matrices.



Damien Mat
INRA, GMPA, Bât CBA1
Avenue Lucien Brétignières
FR - 78850 Thiverval-Grignon
damien.mat@agroparistech.fr

Food Structures, Digestion, Health, 3rd international conference, 28-30th October 2015, Wellington, New-Zealand

* Food and Agriculture COST (European Cooperation in Science and Technology) action FA1005 'Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process (INFOGEST)'.

[1] Minekus, M. et al. (2014). *Food & Function*, 5(6), 1113-1124. <http://doi.org/10.1039/c3fo66702j>
[2] Spellman, D., McEvoy, E., O'Cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2003). *International Dairy Journal*, 13(6), 447-453. [http://doi.org/10.1016/S0950-2688\(03\)00333-0](http://doi.org/10.1016/S0950-2688(03)00333-0)
For more informations on the present work, see submitted article : Mat, D., Le Feunteun, S., Michon, C., Souchon, I. (2015). *In vitro* digestion of foods using pH-stat and the INFOGEST protocol: Impact of matrix structure on digestion kinetics of macronutrients, proteins and lipids. *Food Research International*.

Titre : Cinétiques d'hydrolyse des protéines et des lipides lors de digestions *in vitro* d'aliments modèles : influence des paramètres de structure des matrices

Mots clés : Digestion *in vitro*, Émulsions, Structure de la matrice alimentaire, Hydrolyse des protéines et des lipides, Aliments fonctionnels

Résumé : L'aliment est une source structurée de nutriments. Les différents éléments qui le composent sont arrangés et associés à plusieurs échelles et lui confèrent des propriétés organoleptiques et rhéologiques. Cette structure va être déconstruite par les différents étages de l'appareil digestif et prise en charge par l'organisme et son microbiote. La réponse qualitative et cinétique du système digestif à une structure particulière doit donc être prise en compte pour compléter notre compréhension des attributs nutritionnels de l'aliment et aller vers des formulations à visée de bien-être et de santé.

Cette thèse s'est concentrée sur des matrices complexes riches en protéines de type émulsions huile dans eau. Tout en gardant constante la composition (10 % d'huile et 15% de protéines de lactosérum), des matrices de structures diverses et parfaitement maîtrisées ont été définies puis préparées en modulant les conditions des procédés de fabrication. Pour étudier leur comportement lors de la digestion, un protocole de digestion *in vitro* statique a été mis en œuvre, associé à la titration par pH-stat. Cette méthodologie a permis de suivre, de façon originale, l'hydrolyse, et des protéines, et des lipides, au cours de la phase intestinale simulée.

Son usage a ensuite été étendu à la phase gastrique pour le suivi de la protéolyse par la pepsine. L'étude des matrices solides représente un challenge dans les protocoles *in vitro* car elles ont un degré de complexité supplémentaire par rapport aux matrices liquides ou semi-solides. Une partie du travail s'est ainsi concentrée sur l'étude de l'effet de la taille des fragments sur la libération des nutriments, ainsi que leur impact sur la qualité de la mesure par pH-stat.

Le potentiel de ce travail méthodologique a été démontré sur différents effets de structure des aliments sur la digestion. L'état physique de la phase continue en particulier et la taille des gouttelettes d'huile étaient parmi les plus influents. Des interactions entre protéolyses et lipolyse ont aussi été observées, ce qui démontre que le suivi simultané des cinétiques d'hydrolyse est un aspect important pour une compréhension plus complète des effets de structure.

Par ailleurs la collaboration avec des physiologistes et des microbiologistes a permis la conduite de deux études *in vivo* chez le rat dont les premiers résultats attestent d'un effet structure à la fois sur la composition du microbiote et sur des marqueurs physiologiques.

Title: Lipolysis and proteolysis kinetics during *in vitro* digestions of model foods: influence of the structure parameters of the matrix

Keywords: *In vitro* digestion, Emulsions, Food matrix structure, Hydrolysis of proteins and lipids, Functional foods

Abstract: Food is a structured source of nutrients. Its different components are arranged and associated on several scales and provide organoleptic and rheological properties. This structure is going to be deconstructed by the different stages of the digestive tract and managed by the organism and its microbiota. The qualitative and kinetical response of the digestive tract to a specific structure must then be taken into account to complete our understanding of the nutritional attributes of the food and achieve functional formulations aiming to well-being and health.

This thesis focused on complex protein-rich oil-in-water emulsion-type matrices. While keeping the composition constant (10 % oil and 15 % whey proteins), matrices with various and perfectly controlled structures have been designed and prepared by modulating the conditions of the fabrication process. To study the behavior during the digestion, a static *in vitro* digestion protocol has been carried out, associated to pH-stat titration. This method allowed to follow, in an innovative way, concurrent hydrolysis of both lipids and proteins during the simulated intestinal phase.

Its use was then further extended to the gastric phase in order to follow the proteolysis by the pepsin. The study of solid matrices represents a challenge in *in vitro* protocols since they have an additional degree of complexity compared to liquid and semi-solid ones. A part of this work thereby focused on the study of the influence of the size of the fragments on the nutrients release, as well as on their impact on the quality of the pH-stat monitoring.

The methodologic potential of this work has been demonstrated on different structure effects of the food onto its digestion. The physical state of the continuous phase in particular and the size of oil droplets were among the most influent parameters. Interactions between proteolysis and lipolysis were also observed, proving that simultaneous following of the hydrolysis kinetics is an important aspect for a more complete understanding of the structure effects.

Moreover, collaborating with physiologists and microbiologists allowed the conduct of two *in vivo* studies with rats, the first results of which attest a structure effect on the microbiota composition and on physiological markers.