



HAL
open science

Caractérisation de coproduits d'origine bovine pour l'enrichissement protéique d'aliments : propriétés fonctionnelles et qualité nutritionnelle

Rozenn Le Foll

► **To cite this version:**

Rozenn Le Foll. Caractérisation de coproduits d'origine bovine pour l'enrichissement protéique d'aliments : propriétés fonctionnelles et qualité nutritionnelle. Sciences agricoles. Agrocampus Ouest, 2023. Français. NNT : 2023NSARB375 . tel-04611769

HAL Id: tel-04611769

<https://theses.hal.science/tel-04611769v1>

Submitted on 14 Jun 2024

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'Institut Agro Rennes-Angers

ECOLE DOCTORALE N° 600

Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et alimentation

Spécialité : *Science de l'aliment*

Par

Rozenn LE FOLL

Caractérisation de coproduits d'origine bovine pour l'enrichissement protéique d'aliments : propriétés fonctionnelles et qualité nutritionnelle

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 13/12/2023

Unité de recherche : INRAE L'institut Agro Rennes-Angers – Science et Technologie du Lait et de l'Œuf

Thèse N° : 2023-29 / B-375

Rapporteurs avant soutenance :

Vincenza FERRARO Chargée de Recherche, UR QuaPA-INRAE, St Genès Champanelle, France

Claire GAUDICHON Professeure, UPNCA – AgroParisTech - INRAE, Paris, France

Composition du Jury :

Président : Paul MENUT Professeur, AgroParisTech - INRAE, Paris, France

Examineurs : Didier REMOND Directeur de Recherche, INRAE, St Genès Champanelle, France

Dir. de thèse : Françoise NAU Professeure, L'Institut-Agro Rennes-Angers, Rennes, France

Co-dir. de thèse : Valérie LECHEVALIER Maître de conférences, L'Institut-Agro Rennes-Angers, Rennes, France

Co-dir. de thèse : Amélie DEGLAIRE Maître de conférences, L'institut Agro Rennes-Angers, Rennes, France

Invité(s)

▪ Xavier LAMBERT Directeur commercial et des achats spécifiques, CORNILLE sas, Cornillé, France

Remerciements

À l'issue de ces 3 années de thèse, c'est avec plaisir que je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'aboutissement ce travail.

Dans un premier temps, je remercie **Claire Gaudichon** et **Vincenza Ferraro** pour avoir accepté d'être les rapportrices de cette thèse. Je tiens également à remercier **Didier Rémond** et **Paul Menut** d'avoir bien voulu évaluer ce travail et participer à ce jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je souhaite remercier l'entreprise, **CORNILLE SAS**- filière du groupe AGROMousquetaires, sans qui ce projet n'aurait jamais vu le jour. En effet, grâce à leur collaboration et leur financement pour cette thèse *via* la Fondation de l'Institut Agro par la Chaire « Mieux produire pour mieux manger - de l'agriculteur au consommateur », nous avons pu mener à bien ce projet. Je tiens à remercier tout particulièrement **Xavier Lambert**, directeur commercial de CORNILLE SAS, pour m'avoir apporté le soutien et l'encadrement côté industriel et surtout pour m'avoir fait confiance en me laissant gérer ce projet de thèse avec beaucoup d'autonomie. Je remercie l'ensemble du personnel de CORNILLE SAS, de m'avoir accueillie durant un mois avant le début de la thèse pour leurs bienveillances et implication dans le projet, et notamment **Agnès Taitre**, ingénieur R&D, et **Antoine Ricordel**, responsable commercial, qui m'ont suivi tout au long de la thèse. Je remercie également **Pierre Buin**, directeur de la Filière Environnement Energie chez AGROMousquetaires, pour son implication et sa bienveillance pour ce projet au cours des réunions annuelles.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse, **Françoise Nau**, pour son accompagnement rigoureux et bienveillant tout au long de cette thèse, pour sa disponibilité et surtout pour sa patience pour toutes les révisions réalisées, notamment pour la publication de mon premier article.

Je remercie également, **Valérie Lechevalier** et **Amélie Deglaire**, mes deux co-directrices de thèse, pour leur accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité leur aide et leur expertise et pour leurs révisions toujours constructives.

Comment ne pas remercier **Catherine Guérin-Dubiard** dont j'ai partagé le bureau durant deux ans et qui a pu m'apporter des conseils et discussions intéressantes. Je la remercie pour son implication et sa disponibilité dans ce projet.

Je voulais aussi remercier les différents membres de mon comité de suivi de thèse, **Nathalie Le Floch** et **Véronique Santé-Lhoutellier**, pour leurs conseils scientifiques, regards extérieurs et leurs avis constructifs sur le déroulement de ce projet.

Je tiens à remercier **Yves Le Loir**, directeur de l'UMR Sciences et Technologie du Lait et de l'Œuf (STLO), de m'avoir accueillie durant ces 3 années au sein de son laboratoire. C'est dans un cadre de travail agréable que j'ai pu m'épanouir à réaliser ce projet de thèse. Je tiens à témoigner ma

reconnaissance envers tous les membres du laboratoire STLO pour l'accueil et l'intégration qu'ils m'ont réservée tout au long de ma thèse, et notamment ceux avec qui j'ai pu discuter dans les couloirs, pour leur aide et conseil.

Merci à **toute l'équipe du bâtiment 23 (L'institut Agro)**, pour votre accueil chaleureux, pour la convivialité qui règne aux pauses-café.

Merci à **Ghislaine**, pour sa réactivité et son implication dans les démarches administratives, pas toujours simple mais toujours avec de la bonne humeur.

Merci à tous les **membres de l'équipe Bioactivité & Nutrition (BN)** pour les échanges instructifs que nous avons eus et leur aide au cours de ce travail. Merci à **Yann Le Gouar** sans qui l'expérimentation animale n'aurait pas pu avoir lieu, merci pour ces moments de discussion autant intéressante qu'amusante. Merci à **Gwénaële Henry** de m'avoir fait partager son expertise sur l'analyse des acides aminés et la digestion *in vitro*. Je remercie **Frédérique Pédranno**, qui m'a intégrée dans le laboratoire l'année précédant le début de ma thèse dans le cadre de mon stage de fin d'études (master). C'est grâce à ce stage que j'ai pu commencer plus sereinement le déroulement de la thèse.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à **l'UE3P** (Eloïse Delamaire, Nelly Muller, Alain Chauvin, Julien Georges, Guillaume Poupeau, Simon Duteil...), pour vos conseils et votre implication dans les expériences *in vivo*.

Merci également à **INRAE (St-Gilles)** et particulièrement à **Cécile Perrier** et **Nicole Huchet** pour leur aide lors de l'analyse réalisée dans leurs locaux. .

Je tiens à remercier **Pascaline Hamon, Arlette Leduc, Éric Beaucher**, pour leur aide et la réalisation des diverses analyses menées dans cette étude et pour nos discussions.

Merci à **Capucine Picard**, stagiaire Master 2 R&D, d'avoir participé à une partie de mon projet de thèse.

Merci aux doctorants et notamment **Elise Charton et Lucile Chauvet** qui m'ont accueillie dans leur bureau durant ma dernière année de thèse, pour leur conseils et autres moments de discussion.

Pour terminer, je souhaite remercier ma famille, mes parents, mes sœurs, mes beaux-parents et surtout mon chéri Théo pour leur soutien au quotidien, leurs présence et leurs encouragement, dans les bons moments comme dans les moments plus compliqués. Merci pour tout.

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	5
Abréviations	9
Liste des figures	11
Liste des tableaux	15
Introduction générale	19
1. Contexte de l'étude	20
1.1. Contexte scientifique - Enjeux nutritionnels et environnementaux	20
1.2. Contexte de l'entreprise	22
2. Objectifs de l'étude et démarche mise en œuvre	24
Chapitre 1 – Synthèse Bibliographique	27
Partie 1 - Les coproduits issus de l'industrie de la viande	28
1. Généralités	28
1.1. Définition	28
1.2. Volumes disponibles et voies de valorisation	29
2. Nature et procédés de transformation des coproduits d'origine bovine	31
2.1. Valorisation du sang	33
2.2. Valorisation des organes	34
2.3. Valorisation des os	34
2.4. Valorisation de la graisse	35
Partie 2 - Propriétés techno-fonctionnelles des protéines de viande	36
1. Différents types de protéines de viande	36
1.1. Les protéines sarcoplasmiques	38
1.2. Les protéines myofibrillaires (MPs)	38
1.3. Les protéines stromales	38
2. Propriétés épaississantes	39
2.1. Quelques définitions	39
2.2. Propriétés rhéologiques des protéines de viande en solution ou suspension	40
2.3. Facteurs affectant la rhéologie des solutions de protéines de viande	41
3. Propriétés gélifiantes	42
3.1. Qu'est-ce qu'un gel ?	42
3.2. Caractérisation d'un gel	43
3.3. Propriétés gélifiantes des protéines de viande	45

3.4.	Facteurs affectant la gélification des protéines de viande.....	47
4.	Propriétés émulsifiantes.....	47
4.1.	Définition d'une émulsion.....	47
4.2.	Caractérisation d'une émulsion.....	49
4.3.	Propriétés émulsifiantes des protéines de viande.....	51
4.4.	Facteurs affectant les propriétés émulsifiantes des protéines de viande.....	51
Partie 3 -	Evaluation de la qualité nutritionnelle des protéines.....	53
1.	Digestion des protéines et absorption des acides aminés (AAs).....	53
1.1.	Phase orale.....	53
1.2.	Phase gastrique.....	53
1.3.	Phase intestinale.....	54
2.	Devenir métabolique de l'azote et des acides aminés alimentaires.....	54
2.1.	Voies métaboliques en phase postprandiale.....	55
2.2.	Voies métaboliques en phase post-absorptive.....	55
2.3.	Impact de la cinétique d'absorption des acides aminés sur l'assimilation des protéines.....	56
3.	Modèles d'étude de la digestion.....	57
3.1.	Chez l'Homme.....	57
3.2.	Modèles animaux.....	57
3.3.	Modèles de digestion <i>in vitro</i>	58
4.	Indicateurs de la qualité nutritionnelle des protéines.....	59
4.1.	Besoin en azote et acides aminés essentiels.....	59
4.2.	Digestibilité de l'azote et des acides aminés.....	63
4.3.	Indices de la qualité nutritionnelle des protéines (PDCAAS, DIAAS).....	64
5.	Besoin nutritionnel : cas des populations malnutries.....	65
5.1.	Les enfants.....	66
5.2.	Les personnes âgées.....	68
Chapitre 2 –	Caractérisation physique des poudres WRP et GGRP.....	71
1.	Introduction.....	72
2.	Matériels et méthodes.....	72
2.1.	Granulométrie, Ecoulement et Eboulement.....	72
2.2.	Capacité de réhydratation.....	76
2.3.	Analyses statistiques.....	76
3.	Résultats et discussion.....	77
3.1.	Des tailles de particules élevées et hétérogènes.....	77
3.2.	Faible écoulement et tendance à l'éboulement des poudres WRP et GGRP.....	78

3.3. Propriétés de réhydratation des poudres WRP et GGRP.....	81
3.4. La poudre WRP a des propriétés physiques similaires à celles de nombreuses poudres alimentaires, contrairement à la poudre GGRP.....	83
4. Conclusion.....	85
5. Données supplémentaires	87
Chapitre 3 – Caractérisation biochimique et techno-fonctionnelle des deux ingrédients WRP et GGRP	91
1. Introduction.....	93
2. Materials and Methods	95
2.1. Origin of the samples.....	95
2.2. Experimental design	95
2.3. Physicochemical characterization	96
2.4. Gelling properties	98
2.5. Emulsifying properties	99
2.6. Rheological properties.....	100
2.7. Statistical analyses	101
3. Beef protein ingredients from fat rendering process are promising functional ingredients	103
3.1. Abstract	104
3.2. Results and Discussion	104
3.3. Supplementary data.....	117
4. Innovative beef protein co-products to substitute gelatin as gelling agents, and sodium caseinate as emulsifiers.....	125
4.1. Abstract	126
4.2. Results and Discussion	126
4.3. Supplementary data.....	140
5. The flow properties of a beef protein co-product recovered from process water, can be modulated to mimic the flow behavior of commercial gelatin solutions.....	143
5.1. Abstract	143
5.2. Results and Discussion	144
5.3. Supplementary data.....	149
6. Conclusion.....	151
Chapitre 4 – Qualité nutritionnelle des deux ingrédients WRP et GGRP	153
1. Introduction.....	154
2. Nutritional quality of proteins from two beef co-products as determined in the growing pig	156
2.1. Abstract	156

2.2. Materials and Methods	157
2.3. Results	161
2.4. Discussion	170
3. Optimisation de la qualité nutritionnelle des ingrédients WRP et GGRP à destination de populations malnutries ou à risque de malnutrition	177
3.1. Matériels et Méthodes	177
3.2. Résultats et Discussion	177
3.3. Données supplémentaires	182
4. Conclusion	184
Chapitre 5 – Discussion générale et perspectives	185
1. WRP, un ingrédient prometteur pour sa fonctionnalité	189
2. GGRP, un ingrédient prometteur pour sa qualité nutritionnelle	190
3. Limites de l'étude et perspectives	191
Publications et communications scientifiques	195
1. Publications scientifiques à comité de relecture	196
1.1. Publication scientifique à comité de lecture	196
1.2. Publications en préparation.....	196
2. Communications	197
Références	205

Abréviations

AA	Acide aminé / amino acid
AAA	Acide aminé aromatique / aromatic amino acid
AAS / SAA	Acide aminé soufré / sulphur amino acid
ACP / PCA	Analyse en composantes principales / Principal component analysis
AUC	Aire sous la courbe / Area under the curve
BCAA	Acide aminé branché / Branched-chain amino acid
BS	BackScattering / Rétrodiffusion
BW	Poids corporel / Body weight
CCD	Conception composite centré / Central composite design
CE	Capacité émulsifiante
CP / PC	Composante principal / Principal component
CPC	Concentration protéique critique
DIAAS	Digestible indispensable amino acid score
DIV / TID	Digestibilité iléale vraie / True ileal digestibility
DTT	Dithiothreitol
AAE / EAA	Acide aminé essentiel / Essential amino acid
FC	Facteur de conversion
GGRP	Protéines récupérées des cretons gras / Greasy greaves recovered proteins
IAAO	Oxydation des acides aminés indicateurs / Indicator Amino Acid Oxidation
MAS	Malnutrition aigue sévère
MAT / TN	Matière azotée totale / Total nitrogen
MPs	Protéines myofibrillaires / Myofibrillary proteins
MS	Matière sèche
MSR / RSM	Méthodologie de surface de réponse / Response Surface Methodology
Mt	Millions de tonnes
NaCas	Caséinate de sodium / Sodium caseinate
NEAA	Acide aminé non-essentiel / Non-essential amino acid
pI	Point isoélectrique
RUSF	Aliments thérapeutiques prêts à l'emploi / Ready-to-use supplementary food
RUTF	Aliments complémentaires prêts à l'emploi / Ready-to-use therapeutic food
RP-HPLC	Chromatographie liquide en phase inverse / Reverse-phase high performance liquid chromatography

SC	Score chimique
SD	Ecart-type / Standard deviation
SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS / Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Erreur-type / Standard error of the mean
TAA s	Acides aminés totaux / Total amino acids
TPA	Analyse du profil de texture / Texture profile analysis
TSI	Indice de stabilité Turbiscan / Turbiscan stability index
WHC	Capacité de rétention d'eau / Water-holding capacity
WRP	Protéines récupérées dans l'eau / Water recovered proteins

Liste des figures

Figure 1: Nombre de publications recensées sur la plateforme Pubmed depuis 2008, répondant aux mots clés "extraction" ou "characterization" ou "properties" et "protein" et "meat coproduct(s)" ou "meat coproduct(s)" ou "meat waste coproduct(s)".....	21
Figure 2: Processus de fabrication des protéines bovines déshydratées produites par CORNILLÉ sas.	23
Figure 3: Exemple de séparateur-décanteur 3-phases (adapté de Tricanter®Flottweg).....	24
Figure 4: Démarche mise en œuvre au cours du projet.....	26
Figure 5: Classification réglementaire des coproduits et sous-produits d'animaux générés au stade de l'abattoir. ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine. (Rectificatif au règlement (CE) n° 853/2004; Règlement CE n° 1069/2009).....	28
Figure 6: Répartition des volumes de coproduits par secteur (en tonnes de matière sèche) (SifCO, 2021)	29
Figure 7: (A). Pourcentage de coproduits (alimentaire) et sous-produits (catégories 1, 2 et 3) animaux. (B). Pourcentage par espèce animale des coproduits et sous-produits animaux de catégorie C3 . (C). Parts relatives des différentes voies de valorisation des coproduits animaux. Données concernant les volumes traités en France en 2021 (SifCO, 2021).	30
Figure 8: Voies de valorisation des coproduits issus de viandes, exemple du bœuf (Réséda, 2017)...	30
Figure 9: Principaux coproduits bovins (Vernooij, 2012).....	31
Figure 10: Étapes de valorisation des protéines des coproduits de la transformation de la viande (Drummond et al., 2019)	33
Figure 11: Processus de production de protéines issues de graisses animales (Meeker & Hamilton, 2006)	35
Figure 12: Représentation schématique du muscle squelettique. (1) Coupe transversale de faisceaux musculaires et des tissus conjonctifs. (2) Fibre musculaire longitudinale composée de myofibrilles, elles-mêmes composées de groupes de myofilaments entourés par le sarcolemme. (3) Protéines musculaires organisées en sarcomères (adapté de Biga et al., 2019).	37
Figure 13: Structure des fibres de collagène (Matinong et al., 2022)	37
Figure 14: Différents types de comportement rhéologique. (A) Relation entre contrainte (τ en Pa) et taux de cisaillement (γ en s^{-1}). (B) Relation entre viscosité (η en Pa.s) et taux de cisaillement. τ_0 est le seuil d'écoulement (Pa) (adapté de Clavaud et al., 2018)	40
Figure 15: Profil type de l'évolution de la résistance à la compression d'un gel en fonction du temps lors d'un test TPA.	44
Figure 16: Phénomènes de déstabilisation d'une émulsion O/W (Tornberg & Hermansson, 1977)	48

Figure 17: Profil Turbiscan mettant en évidence différentes instabilités se produisant au sein d'un même échantillon (© <i>Turbiscan Lab, Formulation</i> ; Lu et al., 2017).....	50
Figure 18: Modèle du métabolisme des protéines chez l'homme (FAO et al., 2007)	55
Figure 19: Prévalence de la sous-alimentation dans le monde 2019-2021 (FAO et al., 2022)	66
Figure 20: Principe des mesures réalisées à l'aide du Powder tester (adapté de Schuck et al., 2012) .	73
Figure 21: Distributions granulométriques des poudres WRP et GGRP en voies sèche et liquide.....	77
Figure 22: Observation 5 min après le versement des poudres GGRP (à gauche) et WRP (à droite) dans l'eau. (A) Vue de côté. (B) Vue du dessus.	82
Figure 23: Projection des variables (A, C) et des individus (B, D) sur les trois premières dimensions (CP1 et CP2 ; CP1 et CP3) de l'analyse en composantes principales (ACP). (A, C) Les variables actives correspondent aux caractéristiques mesurées pour décrire les propriétés physiques. (B, D) Les individus correspondent à des ingrédients décrits dans la littérature (réf) (en noir) et aux poudres WRP et GGRP étudiées dans le présent projet (respectivement en bleu et en orange). Les clusters d'échantillons (cercles en pointillés) ont été déterminés par analyse de cluster hiérarchique (ACH).	84
Figure 24: SDS-PAGE profiles (4-20 % acrylamide) of the soluble proteins contained in Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) ingredients. Extraction was performed either at low ionic strength (*soluble in 50 mM phosphate buffer pH 7.5), or at high ionic strength (soluble in 0.45 M KCl phosphate buffer pH 7.5). MW = molecular weight; STD: molecular weight standards.	106
Figure 25: Protein solubility index of Water Recovered Protein (WRP, A) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP, B) depending on pH and concentration of added NaCl (mean \pm SD, n = 2). For a given concentration of added NaCl (green bars, 0 M; blue bars, 0.2 M; red bars, 0.4 M), different letters indicate a significant difference (p < 0.05) between pH. For a given pH, * indicates a significant difference (p < 0.05) between added NaCl concentrations. The multiple comparisons of means were performed using the post-hoc Tukey test.	107
Figure 26: Gelling properties of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) depending on protein concentration, pH, and ionic strength. The added NaCl level set for the cross-section of response surfaces is that corresponding to the optimum for each characteristic (maximum value, except for adhesiveness, for which the optimum is the minimum value).	112
Figure 27: Emulsifying properties of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) depending on protein concentration, pH, and ionic strength. TSI : Turbiscan Stability Index. Response surfaces are presented only when the quadratic regression models were significant. The added NaCl level set for the cross-section of response surfaces is that corresponding to the optimum for each characteristic (minimum value).....	115
Figure 28: Gelling properties: projection of the variables (A) and of the individuals (B) on the first two dimensions (PC1 and PC2) of the principal component analysis (PCA). (A) Active variables (black solid lines) correspond to the characteristics measured to describe gelling properties; pH, protein	

concentration, ionic strength and protein solubility were added as supplementary variables (blue dashed lines). (B) Individuals are represented by symbols according to the ingredients (triangles, Greasy Greaves Recovered Proteins (GGRP); squares, Water Recovered Proteins (WRP); circles, commercial beef gelatins (BG)). Empty symbols correspond to the barycenter of each of the two protein ingredients. The gels of commercial bovine gelatins, 150 Bloom (BG150B) and 240 Bloom (BG240B), have been prepared at 5 % protein, pH 5.55 and 0.2 M NaCl, after dissolution at 50 °C or 90 °C; these samples have been added as supplementary individuals in the PCA. 127

Figure 29: Desirability mapping for the four categories of gelling properties of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP). Desirability values indicate the capability of each ingredient to reproduce separately the gelling temperature, gel rupture, gel texture, or WHC of a 150 Bloom (A) and a 240 Bloom (B) commercial beef gelatins. Gel rupture optimization considers strength and deformation at the rupture of the gel simultaneously; gel texture optimization considers the gel hardness, cohesiveness, and adhesiveness simultaneously..... 131

Figure 30: Desirability mapping for all gelling properties of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) taken together. Desirability values indicate the capability of each ingredient to mimic a 150 Bloom and 240 Bloom beef gelatins in all dimensions of gelling properties (gelling temperature, gel rupture strength and deformation, gel hardness, cohesiveness, adhesiveness, and WHC). Desirability is presented as a function of protein concentration and pH, the ionic strength (M added NaCl) being set in each case for the maximum desirability. 132

Figure 31: Emulsifying properties: projection of the variables (A) and of the individuals (B) on the first two dimensions (PC1 and PC2) of the principal component analysis (PCA). (A) Active variables (black solid lines) correspond to the characteristics measured to describe emulsifying properties; pH, protein concentration, ionic strength, and protein solubility were added as supplementary variables (blue dashed lines). (B) Individuals are represented by symbols according to the ingredients (triangles, Greasy Greaves Recovered Proteins (GGRP); squares, Water Recovered Proteins (WRP); circles, commercial sodium caseinate). Empty symbols correspond to the barycenter of each of the two protein ingredients. The emulsion of sodium caseinate has been prepared at 12.5 % protein, pH 5.55 and 0.2 M NaCl; this sample has been added as a supplementary individual in the PCA. 135

Figure 32: Desirability mapping for the two categories of emulsifying properties of Water Recovered Proteins (WRP) and Greasy Greaves Recovered Proteins (GGRP). Desirability values indicate the capability of each ingredient to mimic a commercial sodium caseinate, for separately droplet size distribution, or emulsion stability after 1 h rest. The optimization of droplet size distribution simultaneously considers $d_{4,3}$ and span for WRP, and $d_{3,2}$ only for GGRP. Desirability is presented as a function of protein concentration and pH, the ionic strength (M added NaCl) being set in each case for the maximum desirability. 138

Figure 33: Desirability mapping for all emulsifying properties of Water Recovered Proteins (WRP) and Greasy Greaves Recovered Proteins (GGRP) taken together. Desirability values indicate the capability

of each ingredient to mimic a commercial sodium caseinate in all dimensions of emulsifying properties ($d_{3,2}$, $d_{4,3}$, span, stability). Desirability is presented as a function of protein concentration and pH, the ionic strength (M added NaCl) being set in each case for the maximum desirability.	139
Figure 34: Rheological properties of Water Recovered Protein (WRP) solutions at 50 °C depending on protein concentration, pH, and ionic strength. The added NaCl level set for the cross-section of response surfaces is that corresponding to the optimum for each characteristic (maximum value).	146
Figure 35: Desirability mapping for the rheological properties of Water Recovered Protein (WRP) solutions at 50 °C. Desirability values indicate the capability of each ingredient to mimic a 150 Bloom and a 240 Bloom beef gelatin in all dimensions of rheological properties (yield stress, consistency coefficient and flow index). Desirability is presented as a function of protein concentration and pH, the ionic strength (M added NaCl) being set in each case for the maximum desirability.	147
Figure 36: Total AA concentration (A), non-essential AA concentration (B) and essential AA concentration (C) in plasma of pigs fed experimental diets containing WRP (blue, n = 7) or GGRP (orange, n = 10) as the only dietary protein source. <i>Means ± SEM. Statistically significant factors were referenced with $p < 0.001$ (***) , $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*) and $p > 0.05$ (NS) or $p < 0.1$ (*). Essential amino acids are the sum of His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val and conditionally EAA (Tyr, Cys). Non-essential amino acids are the sum of Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Pro, HyPro, and Ser.</i>	165
Figure 37: Essential amino acid (EAA) concentrations in plasma of pigs fed experimental diets containing WRP (blue, n = 7) or GGRP (orange, n = 10) as the only dietary protein source. <i>Means ± SEM. Statistically significant factors were referenced with $p < 0.001$ (***) , $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*) and $p > 0.05$ (NS).</i>	166
Figure 38: Non-essential amino acid concentrations in plasma of pigs fed experimental diets containing WRP (blue, n = 7) or GGRP (orange, n = 10) as the only dietary protein source. <i>Means ± SEM. Statistically significant factors were referenced with $p < 0.001$ (***) , $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*) and $p > 0.05$ (NS). ASP = Asn + Asp ; GLU = Gln + Glu.</i>	167
Figure 39: Postprandial urea (A) and insulin (B) concentration in plasma of pigs fed experimental diets containing WRP (blue, n = 7) or GGRP (orange, n = 10) as the only dietary protein source. <i>Means ± SEM. Statistically significant factors were referenced with $p < 0.001$ (***) , $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*) and $p > 0.05$ (NS) or $p < 0.1$ (*).</i>	168
Figure 40: Structural change of the experimental meals (WRP, blue; GGRP, orange) during <i>in vitro</i> semi-dynamic digestion at 0, 40, 80 and 120 min of digestion. Visual observations (A-C); confocal laser scanning microscopy images (B-D); particle size distribution (E). (B-D) Proteins are colored in green and lipids in red.; scale bar: 50 µm. (E-D) Size distribution and viscosity data are means ± SEM (n = 2).	169

Liste des tableaux

Tableau 1: Principales propriétés et caractéristiques des coproduits de bœuf utilisés comme substituts de viande (adapté de Lynch, Álvarez, et al., 2018 ; Shirsath & Henchion, 2021 ; Anzani et al., 2020).AAE : Acide aminé essentiel.	32
Tableau 2: Méthodes de mesure des caractéristiques d'un gel (adapté de Banerjee & Bhattacharya, 2012).....	43
Tableau 3: Fonctions des acides aminés essentiels (AAEs) et de leurs principaux métabolites dans la nutrition et le métabolisme (Wu, 2009).....	60
Tableau 4: Profils de référence en acides aminés essentiels pour les nourrissons, jeunes enfants et enfants, adolescents, adultes (en mg/g de protéine ; FAO, 2013).	61
Tableau 5: Profils en AAEs (mg/g de protéines), digestibilité iléale vraie des protéines (DIV – N) et DIAAS (%) des protéines de différentes sources suivant les profils de référence des populations « enfants de 6 mois à 3 ans » (a) et « enfants, adolescents, adultes » (b) d'après la littérature (1-24) ; en gras : score chimique le plus faible pour les populations (a) et/ou (b).	62
Tableau 6: Profil de référence en acides aminés essentiels (AAEs), besoin en protéines et en AAEs des enfants malnutris de 6 mois à 5 ans (gain de poids cible de 10 g/kg/j, FAO, 2018a).	67
Tableau 7: Nombre de point pour l'évaluation de l'indice d'écoulement, Schuck et al. (2012).	74
Tableau 8: Nombre de points pour l'évaluation de l'indice d'éboulement, Schuck et al. (2012).	75
Tableau 9: Caractéristiques granulométriques des poudres en voies sèche et liquide	77
Tableau 10: Propriétés physiques des poudres WRP et GGRP. (A) Valeurs expérimentales. (B) Transposition en points et interprétation d'après les grilles des Tableaux 7 et 8.	79
Tableau 11: Propriétés de réhydratation des poudres WRP et GGRP	81
Tableau 12: Propriétés physiques et procédés de séchage des poudres WRP et GGRP et de poudres alimentaires tel que rapporté par Schuck et al. (2012). Mo : mouillabilité ; Disp. eau : dispersibilité dans l'eau.	84
Table 13: Central Composite Design (CCD) for independent variables of protein solutions. C1: protein concentration (%) for gelling properties of WRP, emulsifying properties of WRP and GGRP, flow properties of WRP; C2: protein concentration (%) for gelling properties of GGRP; I: ionic strength (M added NaCl).	96
Table 14: Physicochemical characteristics of dehydrated Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) ingredients (mean \pm SD, n = 3). On a given lane, different letters and grey intensity indicate significant difference obtained from multiple comparison of means (Tukey test, p < 0.05).	104
Table 15: Regression coefficients and analysis of variance of the regression models for the gelling properties of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) ingredients. C: protein concentration; I: ionic strength; ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 (exact p-	

values are given in Supplementary Table S2) . SEE : standard error of estimation; MAE: mean absolute error.	109
Table 16: Regression coefficients and analysis of variance of the regression models for the emulsifying properties of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP ingredients). C: protein concentration; I: ionic strength; TSI : Turbiscan Stability Index; the shaded columns indicate not significant models; ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 (exact p-values are given in Supplementary Table S4). SEE : standard error of estimation; MAE: mean absolute error.	114
Table 17: Optimal conditions for Water Recovered Proteins (WRP) and Greasy Greaves Recovered Proteins (GGRP) gels to mimic a commercial beef gelatin, considering four categories of gelling properties (A), or all properties taken together (B). Protein concentration (C), pH, and ionic strength (I) are given to mimic a 150 Bloom gelatin, tested at 5 % protein, pH 5.55, and 0.2 M added NaCl, after heating for 30 min at 50 °C (when compared with WRP) or 90 °C (when compared with GGRP). d: desirability function of a response value equal to y on a scale of 0 to 1. D: all responses were combined for a single desirability score.....	129
Table 18: Optimal conditions for Water Recovered Proteins (WRP) and Greasy Greaves Recovered Proteins (GGRP) gels to mimic a commercial beef gelatin, considering four categories of gelling properties (A), or all properties taken together (B). Protein concentration (C), pH, and ionic strength (I) are given to mimic a 240 Bloom gelatin, tested at 5 % protein, pH 5.55, and 0.2 M added NaCl, after heating for 30 min at 50 °C (when compared with WRP) or 90 °C (when compared with GGRP). d: desirability function of a response value equal to y on a scale of 0 to 1. D: all responses were combined for a single desirability score.....	130
Table 19: Optimal conditions for Water Recovered Protein (WRP) and the Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) to mimic a commercial sodium caseinate (NaCas), considering the size distribution and emulsion stability separately (A), or all properties taken together (B). Protein concentration (C), pH, and ionic strength (I) are given to mimic a NaCas tested at 12.5 % protein, pH 5.55, and 0.2 M added NaCl. d: desirability function of a response value equal to y on a scale of 0 to 1; D: all responses were combined for a single desirability score.....	137
Table 20: Regression coefficients and analysis of variance of the regression models for the flow behavior characteristics of Water Recovered Protein (WRP) solutions at 50 °C. C: protein concentration; I: ionic strength;	145
Table 21: Optimal conditions for Water Recovered Protein (WRP) solutions to mimic the flow behavior of commercial beef gelatins. Protein concentration (C), pH, and ionic strength (I) are given to mimic either a 150 Bloom, or a 240 Bloom gelatin, both tested at 5 % protein, pH 5.55, and 0.2 M added NaCl. d: desirability function of a response value equal to y on a scale of 0 to 1; D: all responses were combined for a single desirability score.....	147
Table 22: Ingredient composition of the diets (g/kg)	157

Table 23: Protein and amino acid composition of the experimental diets (%) containing WRP or GGRP. Data are mean values \pm SD (n = 3).....	162
Table 24: True ileal digestibility of N and amino acid N (%) in growing pigs fed either WRP-diet or GGRP-diet. Data are mean values \pm SEM (WRP: n = 6; GGRP: n = 10).....	163
Table 25: Digestible indispensable amino acid ratio (DIAAR) and scores (DIAAS) of the WRP- and GGRP-diets for three different target populations. <i>The primary limiting amino acid is given in brackets. As the digestibility of Trp and Cys could not be determined in the WRP diet, the average AA digestibility of each pig (87.94 ± 3.25) was used to calculate the DIAARs for these two AAs.</i>	164
Table 26: Particule size and viscosity of the reconstituted diets and of the gastric digesta at 40, 80 and 120 min of digestion (G40, G80, G120). Data are given as mean \pm SEM (n = 2).	170
Table 27: Endogenous flows of total N and individual amino acids at the ileum from pigs (n = 10) that were fed a protein-free diet. Data are means \pm SEM.....	171
Table 28: Digestible Indispensable Amino Acid Scores (DIAAS) for WRP and GGRP. Amino acid profile presented in the FAO report published in 2013 and 2018a used as protein reference pattern. The content of AA expressed in mass AA residue profile.	174
Tableau 29: Qualité nutritionnelle des farines de légumineuses et céréales rapportée aux besoins en AAE des enfants malnutris 6 mois à 5 ans (FAO, 2018a). DIAAR : Digestible indispensable amino acid ratio ; SAA : AA souffré (Cys + Met) ; AAA : AA aromatique (Phe + Tyr). En gras les AA limitants de chaque source végétale.....	178
Tableau 30: Mélanges protéiques sélectionnés à l'issue du processus d'optimisation en réponse aux besoins en AAEs des enfants malnutris de moins de 5 ans.....	179
Tableau 31: Qualité nutritionnelle de farines de légumineuses et céréales rapportée aux besoins en AAEs des séniors (FAO, 2013). DIAAR : Digestible indispensable amino acid ratio ; SAA : AA souffrés (Cys + Met) ; AAA : AA aromatiques (Phe + Tyr). En gras les AAs limitants de chaque source végétale.	180
Tableau 32: Mélange protéique sélectionné lors du processus d'optimisation adapté au besoin en AAE des séniors.....	181
Tableau 33: Origine des coproduits WRP et GGRP, caractérisation physico-chimique, propriétés techno-fonctionnelles et qualité nutritionnelle.	187

Introduction générale

Contexte, objectifs et démarche

1. Contexte de l'étude

1.1. Contexte scientifique - Enjeux nutritionnels et environnementaux

À l'heure où les perspectives démographiques prévoient une augmentation de la population mondiale de 2 milliards de personnes au cours des 30 prochaines années, pour atteindre 9,7 milliards en 2050, la question des ressources alimentaires se pose avec acuité. Les taux de croissance démographique les plus élevés s'observeraient essentiellement dans les régions les plus pauvres (Afrique subsaharienne), qui concentrent également les plus forts taux de sous-nutrition. Dans le même temps, un vieillissement de la population mondiale est attendu (16 % de plus de 65 ans en 2050, contre 9 % en 2019), plus particulièrement marqué dans les pays développés. Compte tenu des exigences nutritionnelles particulières de ces populations, ces perspectives soulignent l'urgence des défis qui s'annoncent, parmi lesquels la nécessité d'une augmentation considérable des ressources alimentaires à l'échelle mondiale, et plus particulièrement la lutte contre la faim et la malnutrition. L'augmentation à venir de la demande en protéines est notamment une préoccupation majeure, comme en témoigne déjà l'augmentation du nombre de personnes en situation de déficit protéino-énergétique en Asie et en Afrique (OECD & FAO, 2022; Concern Worldwide, 2022). Par ailleurs, si le modèle développé dans les pays industrialisés, où les protéines alimentaires proviennent surtout des produits animaux, ne peut être dupliqué à l'échelle mondiale pour des raisons aujourd'hui évidentes de durabilité, il n'en est pas moins essentiel de rechercher des sources alternatives de protéines qui présentent des qualités nutritionnelles et fonctionnelles proches de celles des protéines animales (Day et al., 2022).

Dans ce contexte, il est envisagé que l'augmentation de la demande en protéines soit comblée en partie par une augmentation de la consommation de protéines animales, notamment celles issues de coproduits carnés. En effet, de grandes quantités de coproduits de viande sont générées lors de l'abattage et de la transformation de la viande et ils sont une source alternative de protéines, déjà disponibles mais peu valorisées en alimentation humaine (Lynch, Mullen, et al., 2018). Dans le passé, les coproduits étaient considérés dans la valorisation des carcasses comme des déchets et par conséquent, ils étaient éliminés. Désormais, une attention particulière est portée à l'extraction de ces protéines animales (Toldrá et al., 2021). Leur valorisation s'inscrit dans une démarche d'économie circulaire basée sur le recyclage, en les intégrant à nouveau dans une chaîne de production. Dans ce but, les coproduits d'abattoirs sont transformés en extrayant les matières valorisables. Cela contribue à une alimentation plus durable, tout en créant de la valeur ajoutée pour la filière viande qui voit en même temps son impact environnemental diminuer. Cependant, le nombre de publications liées à l'extraction et à la caractérisation des protéines extraites de coproduits de viande est encore faible (Toldrá et al., 2021 ; Lynch, Mullen, et al., 2018 ; Figure 1).

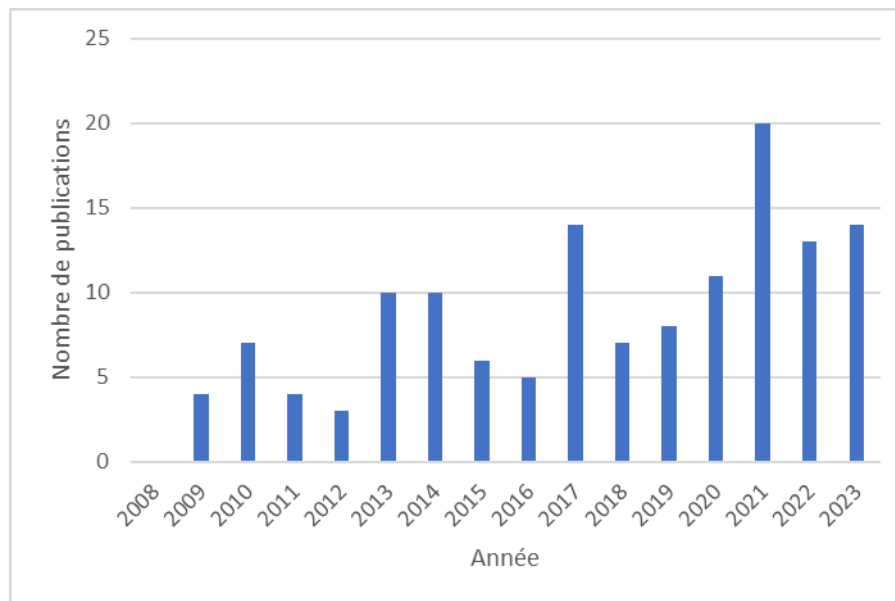


Figure 1: Nombre de publications recensées sur la plateforme Pubmed depuis 2008, répondant aux mots clés "extraction" ou "characterization" ou "properties" et "protein" et "meat coproduct(s)" ou "meat co-product(s)" ou "meat waste coproduct(s)".

Il est établi que les protéines animales sont de bonne qualité nutritionnelle, car elles permettent de fournir des quantités adéquates d'azote et d'acides aminés essentiels (AAE), et qu'elles sont très digestibles. De ce point de vue, elles ont généralement une qualité nutritionnelle supérieure à celle des protéines végétales (Day et al., 2022). Cependant, la qualité nutritionnelle des protéines dépend de leur origine (matière première dont elles sont issues) puisqu'il existe une grande variabilité dans leur composition en acides aminés et leur digestibilité (Adhikari et al., 2022). Ainsi, les coproduits animaux sont difficilement comparables entre eux et des études approfondies sont nécessaires pour chaque nouveau coproduit animal développé.

En plus de leur valeur nutritionnelle, les protéines animales jouent également un rôle important dans les propriétés physico-chimiques et la qualité sensorielle/organoleptique des aliments. En effet, elles possèdent diverses propriétés fonctionnelles intéressantes pour l'industrie agroalimentaire (solubilité, rétention d'eau, gélification, émulsification, épaissement ...) (Day et al., 2022 ; Zayas, 1997). Toutefois, la fonctionnalité des protéines dépend de la nature des protéines en question, et peut être également influencée par divers facteurs (pH, force ionique, température, concentration en protéine...) (Zayas, 1997). Ainsi, il reste encore beaucoup à apprendre sur les protéines issues de coproduits animaux, qu'on envisage leur utilisation pour des raisons nutritionnelles ou technologiques.



1.2. Contexte de l'entreprise

Ce projet de thèse était une collaboration entre l'UMR STLO INRAE - L'Institut Agro Rennes-Angers (Rennes, France) et la société *CORNILLÉ sas* (Cornillé, France), établie dans le cadre de la chaire « Mieux produire pour mieux manger : de l'agriculteur au consommateur » de la Fondation Institut Agro. *CORNILLÉ sas* fait partie de la filière opérationnelle *Valorisation* du groupe *AGROMOUSQUETAIRES* qui constitue le pôle circulaire agroalimentaire du Groupement *LES MOUSQUETAIRES*.

CORNILLE sas, créé en 2000, a la responsabilité d'améliorer la valorisation des coproduits d'abattage d'origine bovine, par la suite destinés à la nutrition humaine, la nutrition animale (animaux de rente ou de compagnie), l'oléochimie, ou la fertilisation, tout en réduisant ainsi la production de déchets. Les coproduits collectés sont des graisses et des os d'origine bovine, qui sont transformés en suifs, protéines bovines déshydratées, protéines animales transformées (PAT) et minerais d'os. Cependant, les ingrédients produits par *CORNILLE sas* ne sont pas toujours valorisés à la hauteur de leurs qualités. C'est le cas en particulier des protéines déshydratées d'origine 100 % bovine que *CORNILLE sas* est la seule entreprise française à produire, et l'une des deux seules en Europe (il existe un concurrent aux Pays-Bas). En effet, du fait de l'histoire (crise encéphalopathie spongiforme bovine, ESB), de la méconnaissance du produit par les clients industriels, et surtout faute de bases solides de caractérisation et de conseils à l'utilisation, ces ingrédients protéiques (protéines bovines déshydratées) sont souvent mis en œuvre en tant que simples «protéines de charge», «substituts de viande» ou «texturants» sans plus de précision, et seule une infime partie de ces ingrédients est aujourd'hui utilisée en alimentation humaine, bien qu'ils soient pleinement conformes à la réglementation européenne en la matière (Rectificatif au règlement (CE) n° 853/2004).

Les deux protéines de bœuf déshydratées produites par *CORNILLE sas* (près de 2500 t /an) ont été renommées selon leur origine. Nous distinguerons ainsi les protéines issues de cretons gras (Greasy Greaves Recovered Proteins, GGRP) et celles issues des eaux de récupération de la fonte des graisses et des os dégraissés (Water Recovered Proteins, WRP). Elles sont produites sous forme de poudres et suivant deux procédés différents (Figure 2).

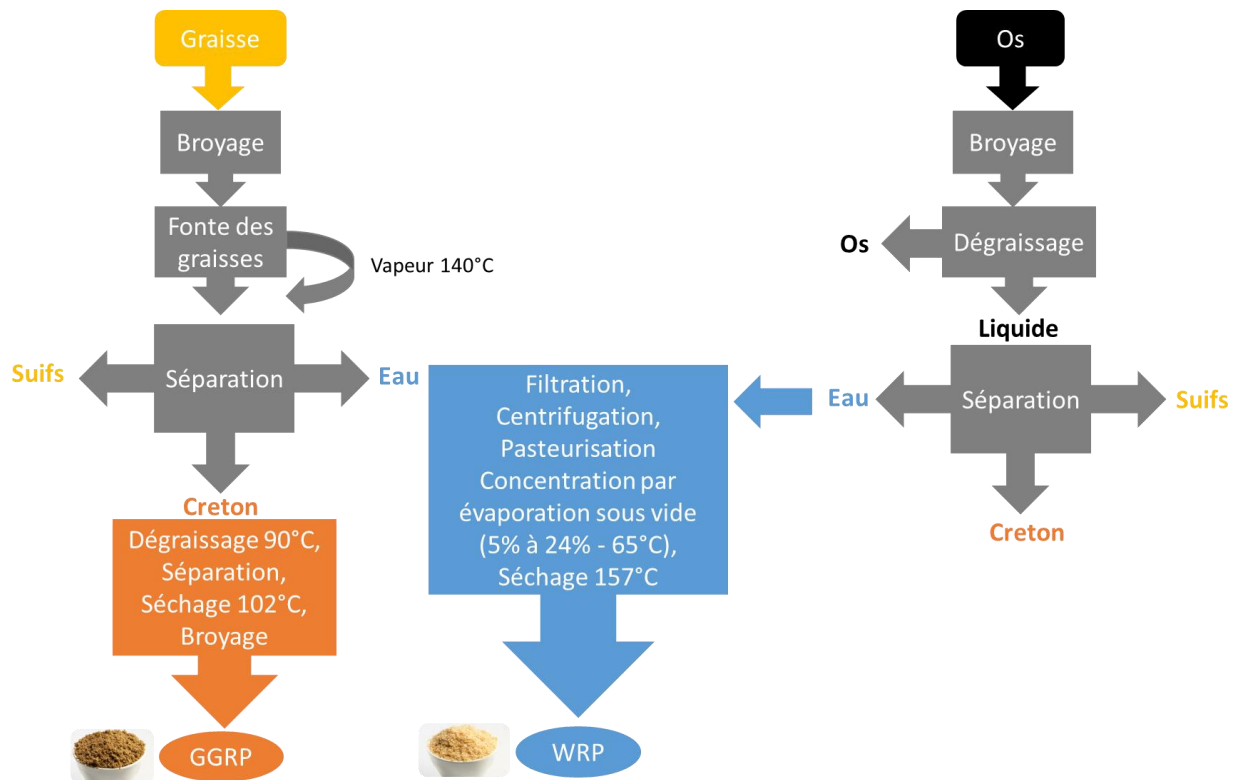


Figure 2 : Processus de fabrication des protéines bovines déshydratées produites par CORNILLÉ sas.

2.1.1. Origine des matières premières

CORNILLE sas se fournit en matières premières (coproduits d'abattage et de découpe) de qualité alimentaire. Les graisses alimentaires avant fente (avant la fente en demi-carcasses) proviennent d'abattoirs situés dans le Grand Ouest de la France. Les graisses d'étal proviennent d'ateliers de 2^{ème} transformation ; elles sont issues de salles de désossage, et sont donc collectées après le refroidissement de la carcasse. Les os proviennent d'ateliers situés en France, du Grand Ouest à Villefranche. Ces ateliers sont tous agréés et doivent à ce titre attester de la bonne application de la réglementation par le biais de la validation de leur procédure de tri par les services vétérinaires.

L'ensemble des matières premières (graisses alimentaires avant fente et étal, os de pieds ou maxillaire ou os de désossage) est produit sous système de gestion des risques : le système HACCP.

2.1.2. Processus de fonte des graisses alimentaires

Le processus de fonte des graisses combine des transformations physiques et chimiques, comprenant le traitement thermique, l'élimination d'eau et la séparation des graisses (Prokop, 1985 ; Meeker & Hamilton, 2006 ; Galanakis, 2018). Le processus de fonte des graisses alimentaires consiste en une première étape de broyage et de tri avant l'injection de vapeur (140 °C) dans le produit, provoquant la fonte de la graisse. Un décanteur 3-phases est utilisé pour la séparation simultanée de phases de différentes densités (Figure 3). Il sépare ainsi la fraction protéique solide (cretons), de la graisse animale fondue (suifs) et d'une fraction aqueuse (eau de récupération).

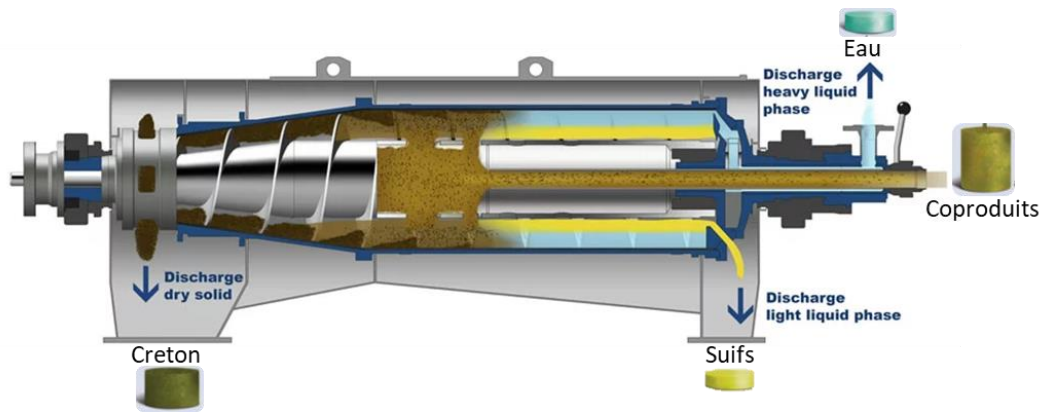


Figure 3: Exemple de séparateur-décanteur 3-phases (adapté de Tricanter@Flottweg)

2.1.3. Production des ingrédients protéiques GGRP et WRP

Le GGRP est produit à partir des cretons gras, c'est-à-dire la fraction solide séparée à l'issue de l'extraction des suifs (graisses de bœuf). Les cretons sont ensuite dégraissés en repassant dans un décanteur 3-phases (à 90 °C), séchés sur un séchoir rotatif à tambour (à 102 °C, vapeur indirecte) et broyés (granulométrie maximale de 2 mm).

Le WRP est produit à partir de l'eau récupérée lors du même processus d'obtention des suifs, mais aussi lors du processus de dégraissage des os à 90 °C (Figure 2) (Denis, 2009). Ces deux fractions aqueuses sont ensuite filtrées et pasteurisées, avant d'être concentrées par évaporation sous vide à 65 °C (passage de 5 % à 24 % de matière sèche), séchées sur un séchoir cylindre chauffant (à 157 °C), puis broyées (granulométrie d'environ 2 mm) pour obtenir le WRP sous forme de poudre.

2. Objectifs de l'étude et démarche mise en œuvre

L'intérêt croissant pour les protéines dites alternatives est l'une des réponses à la demande croissante en protéines due à l'augmentation de la population mondiale. Cette évolution est favorisée par les avancées récentes de la recherche et du développement qui s'est attachée à caractériser les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles d'un grand nombre de « nouvelles » sources de protéines. En effet, les propriétés techno-fonctionnelles, comme la qualité nutritionnelle, sont des paramètres essentiels à prendre en compte dans une stratégie de valorisation des protéines, qu'il s'agisse de les utiliser comme ingrédients pour des applications alimentaires usuelles ou pour des usages spécifiques, comme par exemple pour des aliments enrichis en protéines à destination de populations malnutris. Toutefois, parmi les « nouvelles » sources de protéines, celles issues de coproduits de la filière viande ne sont pas les plus étudiées et en particulier, aucune étude ne s'est intéressée aux deux coproduits innovants d'origine bovine au cœur de ce projet.

Dans le cadre de cette thèse, l'objectif du projet était de caractériser de la manière la plus exhaustive et précise possible les protéines bovines déshydratées produites par *CORNILLE sas*, tant du point de vue nutritionnel, dans l'hypothèse de leur utilisation en tant que sources de protéines, que du point de vue techno-fonctionnel, afin de pouvoir accompagner les potentiels utilisateurs de ces ingrédients dans leur

mise en œuvre au sein d'aliments formulés et transformés. Ainsi, l'ambition était de pouvoir proposer des produits innovants répondant aux recommandations nutritionnelles pour l'homme (établies par la FAO, 2013), tout en diminuant l'impact environnemental de la filière viande bovine par une valorisation optimale des protéines qui en sont issues. Les propriétés fonctionnelles et la digestibilité de ces ingrédients protéiques ont donc été étudiées.

Notre objectif a été dans un premier temps de caractériser sur le plan physique les deux coproduits déshydratés, sur la base de critères en lien avec leur aptitude à la mise en œuvre en industrie alimentaire (Chapitre 2), puis de les positionner dans le domaine des texturants (épaississants, gélifiants, émulsifiants) pour évaluer leur aptitude à se substituer à des ingrédients « classiques » tels que la gélatine et le caséinate de sodium. Pour ce faire, leur comportement en fonction des conditions du milieu (pH, force ionique, température) a été étudié pour une mise en œuvre optimisée à l'étape de formulation de produits finis (Chapitre 3). Dans un second temps, nous avons évalué la qualité nutritionnelle des protéines des deux coproduits au travers de la digestibilité iléale vraie de l'azote et des acides aminés (AAs) et de la cinétique de mise à disposition des AAs plasmatiques mesurées *in vivo* sur le modèle porc, et complétées par des expérimentations *in vitro* centrées spécifiquement sur la compréhension du comportement de ces deux ingrédients à l'étape gastrique (Chapitre 4). Cette approche nous permet ainsi d'évaluer l'aptitude des deux coproduits à être valorisés en tant qu'ingrédients fonctionnels (texturants) et d'établir des recommandations sur les conditions à appliquer pour maximiser leurs propriétés. Elle doit également permettre de conclure sur leur qualité nutritionnelle et la possibilité de les intégrer dans la formulation de produits alimentaires adaptés à certaines stratégies nutritionnelles spécifiques (enrichissement protéique). L'étude *in vivo* devait également contribuer à l'acquisition de connaissances sur le lien entre les propriétés biochimiques et nutritionnelles des aliments protéiques. L'étude *in vitro* visait à comprendre l'évolution de la structure des repas au cours de la digestion. La stratégie expérimentale mise en place pour répondre à ces différents objectifs est présentée en Figure 4.

Ce manuscrit est composé d'une synthèse bibliographique en premier chapitre afin d'apporter des informations sur les coproduits animaux (Partie 1), les propriétés techno-fonctionnelles des protéines animales (Partie 2), la qualité nutritionnelle des protéines et les besoins nutritionnels des différentes populations (Partie 3). Ensuite, les résultats seront principalement présentés sous forme de publications soumises ou en préparation pour soumission. Le chapitre 2 porte sur la caractérisation physique de deux ingrédients « protéines bovines déshydratées », puis le chapitre 3 se focalise sur leurs caractéristiques biochimiques et techno-fonctionnelles (gélifiant, émulsifiant et épaississant). Le chapitre 4 présente une étude *in vivo* visant à mesurer la qualité nutritionnelle de ces deux mêmes ingrédients. Enfin, dans le chapitre 5, une discussion générale et des perspectives permettront de souligner les principaux résultats de ce projet et les thèmes de recherche qu'il conviendrait d'approfondir pour compléter le présent travail.

Les coproduits bovins GGRP et WRP issus de la fonte des graisses peuvent-ils être des ingrédients fonctionnels et nutritionnels intéressants dans l'alimentation humaine ?

1

Quelle est la « position » de ces ingrédients protéiques innovants par rapport aux extraits de viande classique et autres sources protéiques ?



2 ingrédients protéiques
issus de co-produits

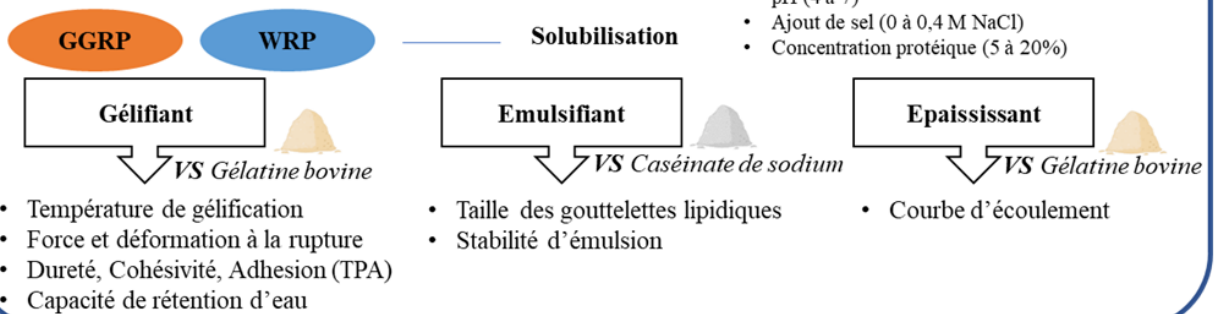
Caractérisations des physico-chimiques des poudres

- Composition fine
- Granulométrie
- Ecoulement/Eboulement
- Réhydratation (solubilité, dispersibilité, mouillabilité)

2

Comment ces ingrédients protéiques se comportent-ils en fonction des conditions de l'environnement (pH, force ionique, température) dans le domaine des texturants (gélifiant, émulsifiant, épaississant) ?

Propriétés Techno-Fonctionnelles



3

Quelles est la qualité nutritionnelle de ces ingrédients protéiques ?

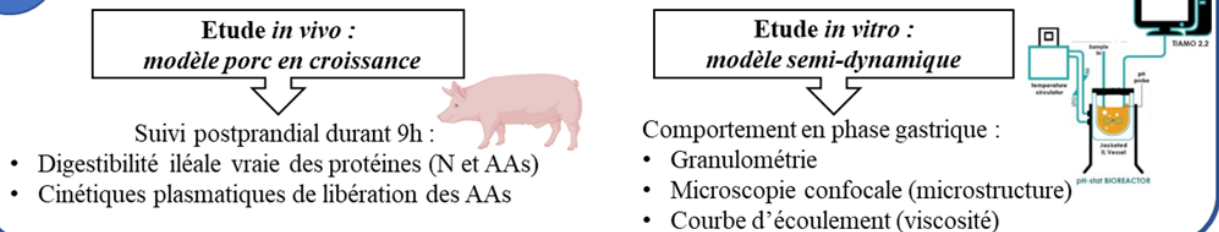


Figure 4: Démarche mise en œuvre au cours du projet

Chapitre 1

Synthèse Bibliographique

Partie 1 - Les coproduits issus de l'industrie de la viande

1. Généralités

1.1. Définition

Il n'y a pas de réglementation en tant que telle pour le terme coproduit, comme mentionné dans un rapport de Réséda & ADEME (2008) et repris plus récemment par Chapoutot et al. (2018). La définition et l'utilisation du terme « coproduit » relèvent plutôt d'un consensus entre professionnels. Ainsi un coproduit est une substance ou un produit inévitable apparaissant lors d'un processus de production. Il peut dans certaines filières être considéré comme un produit à part entière, disposant d'un marché et d'une cotation, comme par exemple les tourteaux de colza, le son de blé, la pulpe de betteraves... (Réséda & ADEME, 2008).

Concernant les « coproduits comestibles de viande », ils sont définis comme des produits animaux autres que les muscles de viande rouge ou blanche. Il s'agit par exemple des parties comestibles de la carcasse, des os cuits, ou des produits issus de la découpe et de la transformation de la viande. Ils sont susceptibles d'être utilisés pour la consommation humaine, soit directement, soit après une transformation ultérieure (Mullen et al., 2017). Pour être valorisé en alimentation humaine, un coproduit doit respecter la réglementation relative à l'hygiène des denrées alimentaires d'origine animale (Rectificatif au règlement (CE) n° 853/2004). Les coproduits animaux ne doivent pas être confondus avec les sous-produits animaux qui, dans l'Union Européenne, désignent des produits d'origine animale exclus de la consommation humaine et classés en trois catégories selon le risque sanitaire qu'ils représentent, et dont seule la catégorie 3 peut être valorisée en alimentation animale (définie par le Règlement CE n° 1069/2009) (Figure 5).

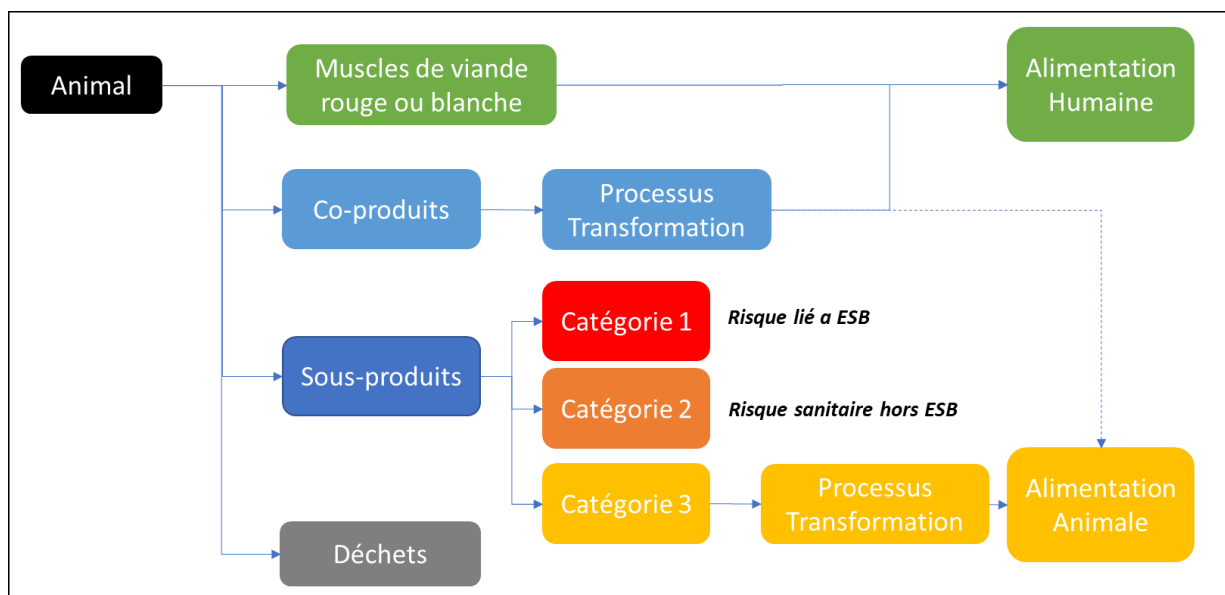


Figure 5: Classification réglementaire des coproduits et sous-produits d'animaux générés au stade de l'abattoir. ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine. (Rectificatif au règlement (CE) n° 853/2004; Règlement CE n° 1069/2009).

1.2. Volumes disponibles et voies de valorisation

Actuellement, les abattoirs gèrent leurs coproduits et sous-produits d'abattage par un partenariat avec l'industrie du "cinquième quartier" (traitement des peaux, fonte des graisses, nettoyage et préparation des boyaux, équarrissage), qui assure la valorisation de ces produits. Selon le Réseau des organisations professionnelles et interprofessionnelles pour la Sécurité et la qualité des Denrées Animales (RéseDA), le volume de coproduits issus des principales industries agroalimentaires en France a été estimé en 2017 à 12,1 millions de tonnes (Mt) de matière sèche (MS) (RéseDA, 2017), dont 8 % étaient issus de l'industrie de la viande et de la transformation des produits de la pêche et de l'aquaculture (Figure 6). Selon le Syndicat des Industries Françaises des Coproduits animaux (SifCO), environ 3 Mt de coproduits et sous-produits issus d'animaux ont été générées en France en 2021 ; 2 % de ce tonnage (57000 t) était composé de coproduits et 68 % (2,1 Mt) de sous-produits de catégorie 3, dont 36 % (0,8 Mt) étaient issus de ruminants (Figure 7A et Figure 7B). Parmi les 57000 t de coproduits, seules 3700 t sont valorisées en alimentation humaine sous l'appellation « protéines alimentaires » comprenant le creton (partie solide issue de la fonte des graisses) et les produits de sang (Figure 7C) (SifCO, 2021). La majorité des coproduits permet la fabrication de gélatine à partir d'os dégraissés, comme c'est le cas pour le bœuf (Figure 8).

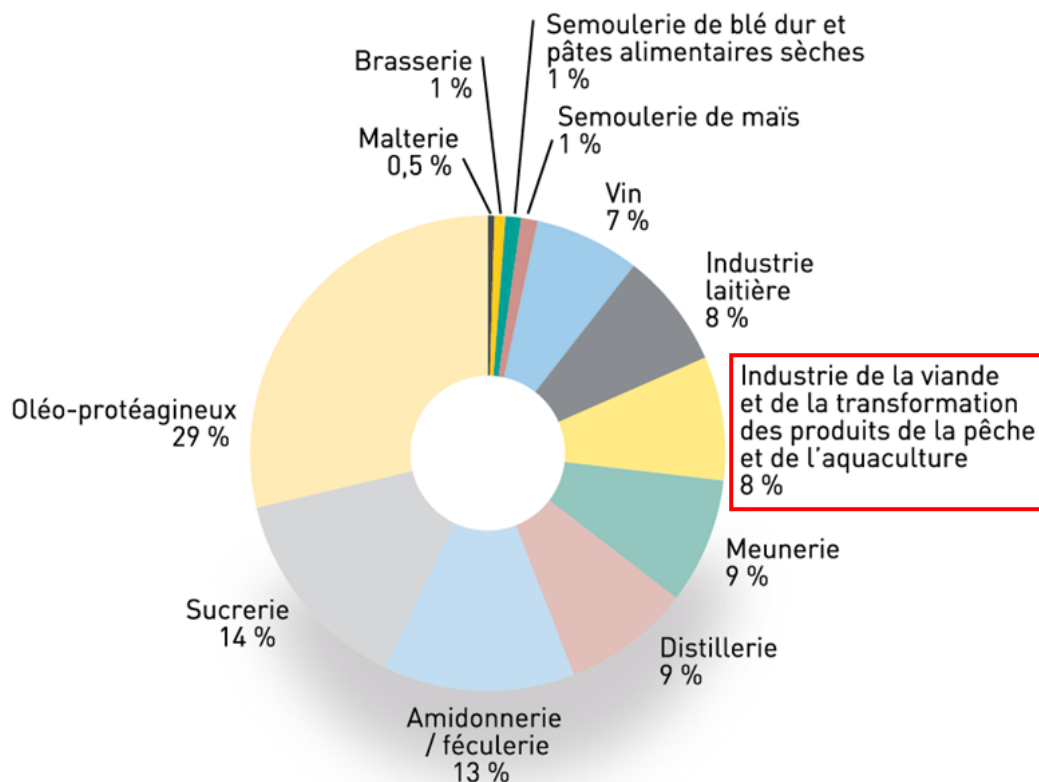


Figure 6: Répartition des volumes de coproduits par secteur (en tonnes de matière sèche) (SifCO, 2021)

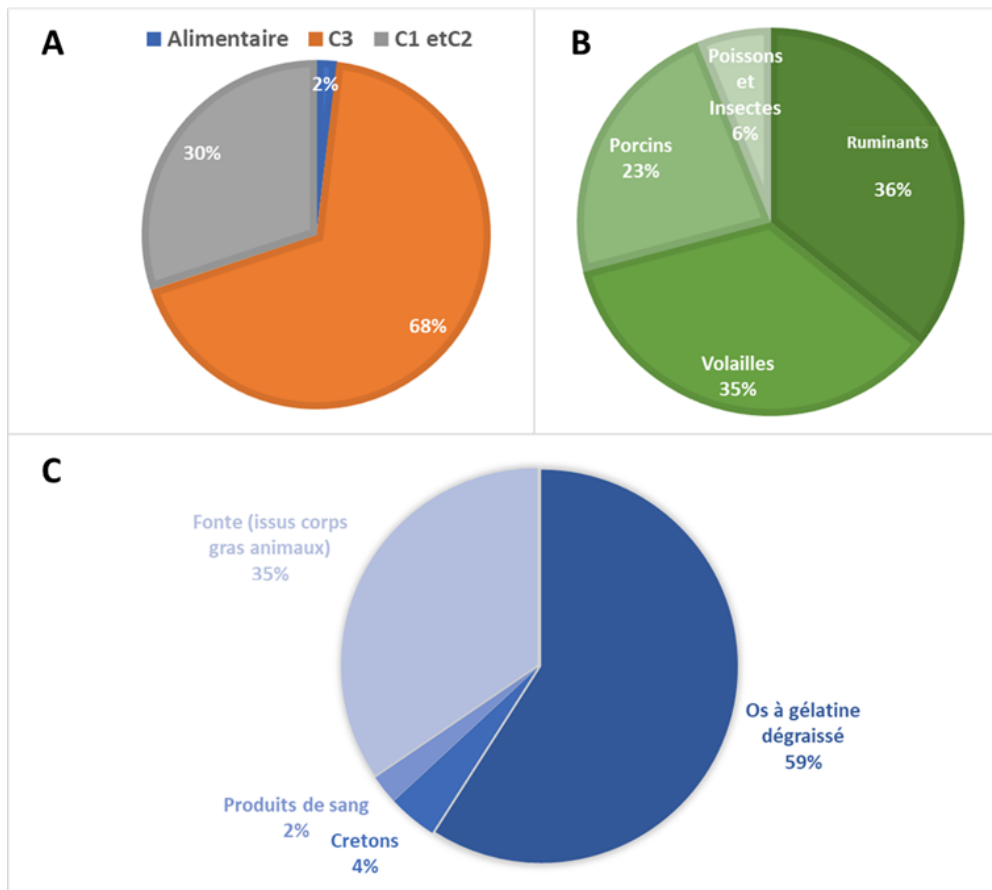


Figure 7: (A). Pourcentage de coproduits (alimentaire) et sous-produits (catégories 1, 2 et 3) animaux. (B). Pourcentage par espèce animale des coproduits et sous-produits animaux de catégorie C3. (C). Parts relatives des différentes voies de valorisation des coproduits animaux. Données concernant les volumes traités en France en 2021 (SifCO, 2021).

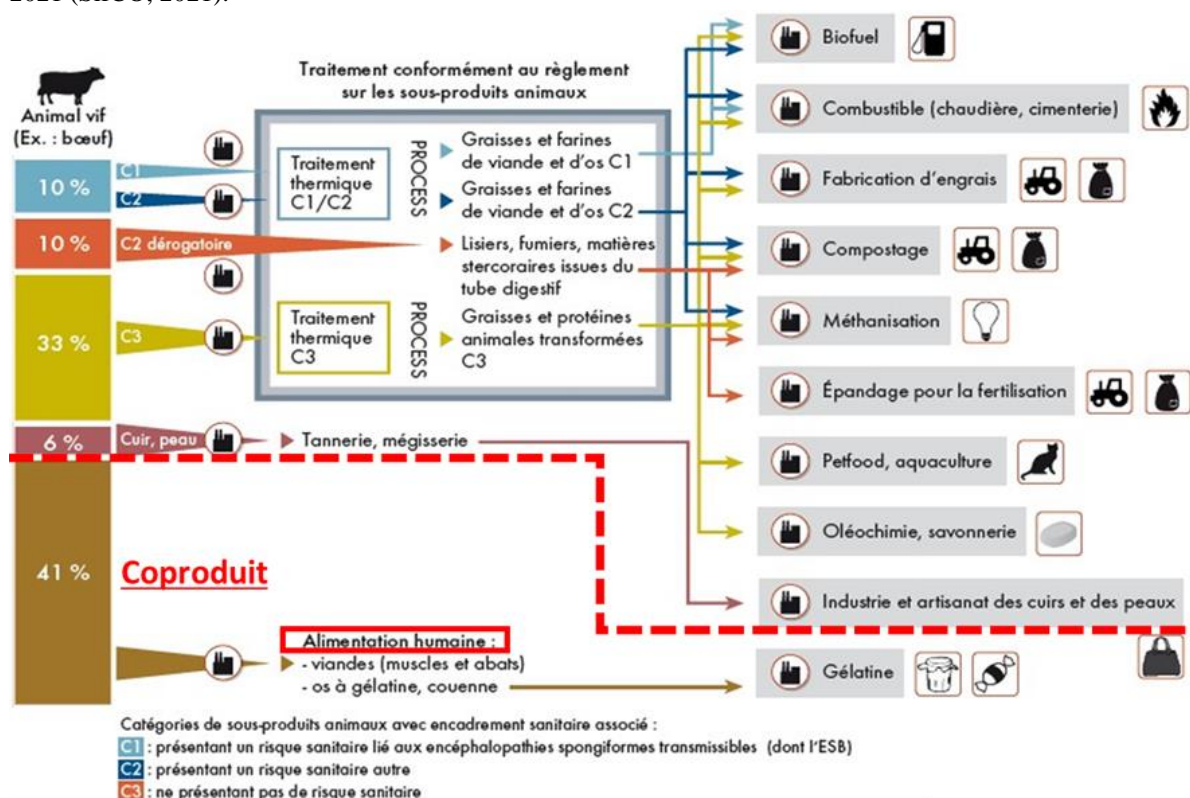


Figure 8: Voies de valorisation des coproduits issus de viandes, exemple du bœuf (Réséda, 2017)

2. Nature et procédés de transformation des coproduits d'origine bovine

Au cours de ces dernières années, afin de limiter son impact sur l'environnement, l'industrie de la viande s'est intéressée à valoriser davantage ses coproduits, tels que le sang, les os, divers organes et les graisses (Figure 9) en tant qu'aliments, ingrédients fonctionnels ou peptides bioactifs (Shirsath & Henchion, 2021). En effet, une grande variété de produits peut être fabriquée à partir de ces coproduits (Tableau 1). Cependant, ils sont sous-utilisés comme sources de protéines pour la consommation humaine (Mullen et al., 2017 ; Walsh, 2014). En effet, pour diverses raisons, notamment des questions réglementaires, la voie la plus simple consiste à valoriser ces coproduits en alimentation animale pour laquelle la réglementation est moins stricte (Jayathilakan et al., 2012). Cependant, ces coproduits sont riches en composés nutritionnels tels que des protéines, acides aminés essentiels, vitamines, minéraux et antioxydants (Mullen & Álvarez, 2016). Ils pourraient ainsi servir de substituts aux protéines de viande, car leurs performances fonctionnelles semblent similaires (Anzani et al., 2020). Au final, les principaux facteurs influençant l'utilisation des coproduits animaux en alimentation humaine sont les exigences réglementaires, l'acceptabilité par les consommateurs (culture, tradition), les avantages nutritionnels et économiques (Lynch, Álvarez, et al., 2018). Il a pu être démontré que l'incorporation de coproduits en tant qu'ingrédients dans les aliments, après un prétraitement plutôt que sous leur forme d'origine, peut aider à améliorer la perception des consommateurs (Henchion et al., 2016).

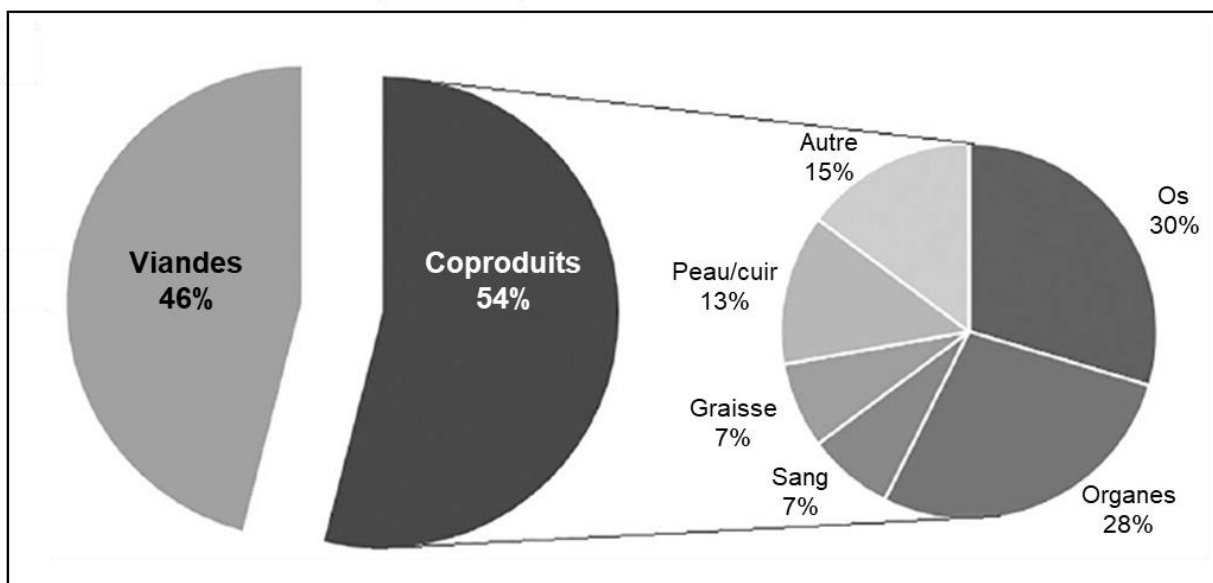


Figure 9: Principaux coproduits bovins (Vernooij, 2012)

Tableau 1: Principales propriétés et caractéristiques des coproduits de bœuf utilisés comme substituts de viande (adapté de Lynch, Álvarez, et al., 2018 ; Shirsath & Henchion, 2021 ; Anzani et al., 2020). AAE : Acide aminé essentiel.

Co-produit	Protéine (%)	AAE (%)	Lipides (%)	Nutriments spécifiques	Propriétés	Utilisation/Préparation
Cœur	17	47,7	4,4	Niacine, vitamine B12, Fe	Viscosité et onctuosité	Farcis et braisés, rôtis, grillés, saucisses, viandes transformées, pains de viande, galettes
Rein	15,3	48	3,2	Vitamines A, B12, B6 et B9, Fe, Cu	Liaison à l'eau	Entiers ou tranchés, grillés, braisés ou sautés, utilisés dans tartes, en soupe, en ragoût
Foie	19	48,9	3,7	Vitamines A, B12, B6, B9, C, niacine, heparine, Fe, P, Zn, Cu	Liaison à l'eau et bon rendement de cuisson	Tranchés et sautés, saucisses de foie, pâtés, terrines, fagots, farcis, braisés, grillés, frits, en pain, galettes et saucisses
Poumon	15	37,8	2,7	Vitamines A et C, collagène, Fe, Na, K	Émulsifiant et moussant	Saucisses, braisés, haggis, fagots, hachis, ragoûts
Langue	16,3	40,2	17,2	Glucides, Ca		Viandes braisées ou bouillies, fraîches ou marinées, salées, boyaux de saucisses
Os	12		16	Ca, Mg, P, Na, K, Cl	Émulsifiant et gélifiant	Production de bouillons, moelle, production de gélatine, bonbons
Peau/cuir	30-35		2,5-3	Collagène	Gélifiant, liant l'eau et les graisses, émulsifiant et stabilisant	Production de gélatine, bonbons
Graisse			100			Suif/matière grasse, Bonbons, chewing-gum, huiles industrielles, friture, boulangerie
Sang	18,5	61	0,4	Fe	Émulsifiant, stabilisant, clarifiant, additif colorant, liant eau et graisse	Boudins, biscuits et pains

Les coproduits d'origine bovine peuvent notamment être transformés pour en extraire les composants cibles que sont les protéines. L'extraction et la purification des protéines des coproduits constituent un moyen efficace pour les valoriser, car elles permettent d'exprimer leurs propriétés fonctionnelles. Cependant, compte tenu de l'hétérogénéité des coproduits en termes de composition, leur extraction et leur purification nécessitent des schémas technologiques très divers (Lynch, Álvarez, et al., 2018) et dont les principales étapes et méthodes sont résumées Figure 10. Par ailleurs, différents facteurs affectent l'extraction des protéines, dont notamment le taux de lipides. Ainsi, les coproduits riches en lipides doivent être dégraissés avant l'extraction des protéines afin d'empêcher la formation d'une émulsion. Pour cela, divers solvants peuvent être utilisés, combinant solvants polaires et apolaires (Arêas et al., 1993). La principale étape consiste à solubiliser le coproduit dans un solvant approprié permettant de

faire passer sélectivement la fraction protéique d'intérêt en solution et de maintenir les autres constituants en suspension (Lynch, Mullen, et al., 2018 ; Aluko, 2004). Ensuite, les protéines solubles et insolubles sont généralement séparées par centrifugation (Aluko, 2004) puis stabilisées par séchage.

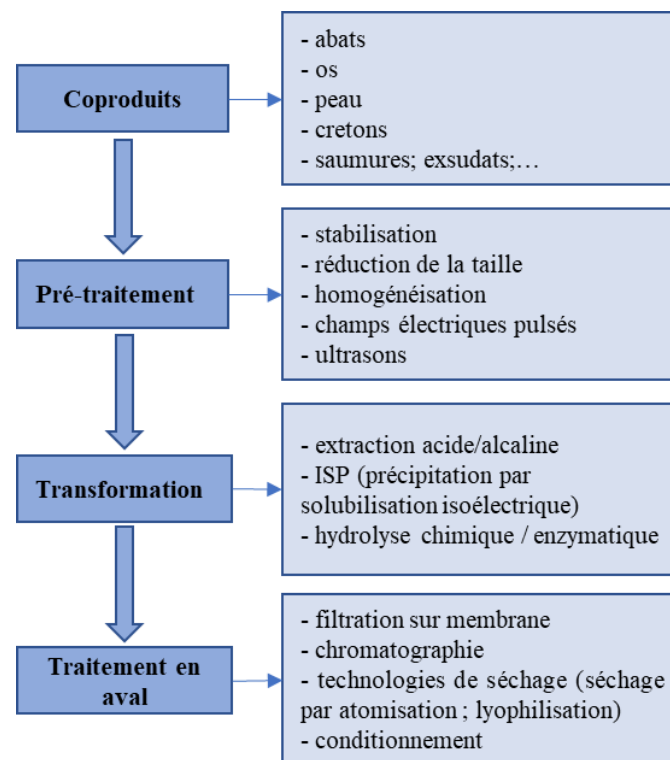


Figure 10: Étapes de valorisation des protéines des coproduits de la transformation de la viande (Drummond et al., 2019)

2.1. Valorisation du sang

Le premier coproduit issu de l'abattage des animaux est le sang. Le sang est transformé en plusieurs dérivés, car la technologie relativement simple de la centrifugation permet de séparer le sang en plasma et globules rouges. Le sang bovin, et notamment le plasma, est riche en protéines telles que le fibrinogène, les globulines et les albumines ; c'est une excellente source d'acides aminés essentiels (Duarte et al., 1999). Le sang et ses protéines présentent de bonnes propriétés techno-fonctionnelles telles que des propriétés gélifiantes, moussantes et émulsifiantes et peuvent donc être utilisés comme ingrédients fonctionnels dans l'industrie alimentaire (Lynch et al., 2017). Ils sont notamment utilisés comme nutriments, agents liants, exhausteur naturel des couleurs, émulsifiants, stabilisants.

L'hémoglobine est une protéine particulièrement intéressante dans l'industrie alimentaire en raison de sa couleur rouge et de sa forte teneur en fer ; elle est utilisée comme colorant pour les produits à base de viande (Lynch et al., 2017). Riche en fer héminique, le sang bovin peut permettre d'enrichir des aliments couramment consommés afin d'augmenter les niveaux de fer hautement biodisponible. Ainsi, de l'hémoglobine bovine a été incorporée dans des biscuits (6 % p/p) pour la supplémentation en fer d'enfants au Chili (Walter et al., 1993).

Les albumines représentent les protéines les plus abondantes dans le plasma et sont des éléments clé dans la régulation de la pression osmotique et du transport des petits métabolites (Rondeau & Bourdon, 2011).

L'albumine sérique bovine (BSA) est l'une des protéines les plus étudiées et utilisées en biotechnologie pour son potentiel à fournir de nombreux composés bioactifs et à améliorer les performances de nombreux facteurs bioactifs qui influencent la croissance des cellules en culture (Rondeau & Bourdon, 2011).

2.2. Valorisation des organes

Les entreprises de transformation de la viande génèrent plusieurs produits comestibles issus de divers organes et propres à la consommation humaine, qui peuvent constituer des ingrédients fonctionnels utiles dans de nombreux produits (Tableau 1). Ils possèdent des teneurs élevées en protéines et en éléments nutritifs tels que des vitamines (Mullen & Álvarez, 2016). L'incorporation de poudre de poumon de bœuf (10 %) dans des pâtes fraîches a par exemple été utilisée pour augmenter leur teneur en protéines et en fer (Jayawardena et al., 2019). Les reins, poumons et cœurs de bœuf offrent une meilleure biodisponibilité du fer non-héminique que la viande de bœuf elle-même (O'Flaherty et al., 2019). Les protéines extraites de poumons de bœuf ont également démontré des propriétés émulsifiantes pouvant permettre la substitution du caséinate de sodium (Selmane et al., 2010). Les coproduits tels que les poumon peuvent être une ressource utile pour générer des peptides bioactifs aux propriétés bénéfiques pour la santé et pouvant être ajoutés aux produits alimentaires en tant qu'ingrédients alimentaires fonctionnels (Lafarga et al., 2017). L'héparine peut être extraite de la muqueuse intestinale, du foie et des poumons des bovins et être utilisée comme anticoagulant (Jayathilakan et al., 2012).

2.3. Valorisation des os

Les os bovins sont une source importante de collagène (25 %) (Walsh, 2014) et permettent de fabriquer de la gélatine grâce à un processus d'hydrolyse (Gómez-Guillén et al., 2011). Les protéines extraites d'os de bœuf améliorent les propriétés texturales des produits de charcuterie au même titre que les protéines de soja ou de lactosérum (Boles et al., 2000). Des protéines extraites d'os de veau ont également démontré de bonnes propriétés émulsifiantes (Linder et al., 1996). Récemment, une nouvelle méthode d'extraction de protéines osseuses de bœuf, incluant un prétraitement par une lipase, a été développée pour améliorer la production d'arômes de bœuf à partir de l'ingrédient protéique en raison de l'abondance d'acides aminés dans l'extrait et de la réaction de Maillard (Song et al., 2016).

Le collagène est l'un des biomatériaux les plus utilisés dans les industries pharmaceutique, cosmétique, biomédicale et alimentaire (Silvipriya et al., 2015). Il existe différents types de collagène (28) dont le plus répandu est le collagène de type I issu de la peau, des tendons et des os (Henriksen & Karsdal, 2016). Bien que la valeur nutritionnelle du collagène soit très faible, il est riche en acides aminés non-essentiels (Glycine, Proline et Hydroxyproline, Alanine) et est une excellente ressource pour la génération de peptides bioactifs (antihypertenseurs, antithrombotiques)(Lafarga et al., 2017). Plusieurs produits contenant des peptides bioactifs générés par hydrolyse enzymatique du collagène bovin sont actuellement commercialisés dans le monde. On peut citer par exemple CH-Alpha (Gelita Health

Products GmbH, Allemagne) et Peptan (Rousselot SAS, France) commercialisés pour la protection des articulations et du cartilage contre la dégénérescence (Lafarga et al., 2017).

La gélatine, dérivée du collagène, est un excellent agent clarifiant, stabilisant, gélifiant et émulsifiant (Jayathilakan et al., 2012), largement utilisé dans l'industrie alimentaire pour ses propriétés fonctionnelles (Toldrá et al., 2012). Cependant, les procédés d'extraction des gélatines sont relativement complexes et font intervenir des réactifs chimiques (bases et acides forts), qu'elles soient de type A (os concassés, déminéralisés et dégraissés ; extraction acide ; point isoélectrique compris entre pH 6 et 9) ou de type B (extraction alcaline ; point isoélectrique compris entre pH 5) (Hanani, 2016).

2.4. Valorisation de la graisse

Les graisses proviennent de différentes parties du corps, et sont qualifiées de graisses d'avant fente (avant la fente en demi-carcasses) ou de graisses d'étal (provenant d'ateliers de 2^{ème} transformation). Le processus de fonte des graisses (tissus adipeux) est un processus courant dans l'industrie de la viande, au cours duquel les matières grasses sont fondues et les protéines (creton) sont récupérées (Prokop, 1985; Meeker & Hamilton, 2006 ; Galanakis, 2018). Le processus de transformation, à la fois physique et chimique, comprend le traitement thermique (combinaison chaleur/pression), l'élimination de l'humidité et la séparation des graisses (Figure 11). La température et la durée du processus de cuisson sont critiques ; ce sont les principaux déterminants de la qualité du produit fini. La graisse fondue est séparée de la partie solide (appelée creton) qui est ensuite broyée et séchée. Bien que ces protéines issues du creton soient peu utilisées en alimentation humaine, il s'agit d'une source naturelle de nutriments, avec des teneurs notables en certains acides aminés essentiels, notamment la valine, la leucine, l'isoleucine et la phénylalanine (Pion & Belsunce, 1963 ; Jobling, 1994). Récemment, un procédé de récupération des protéines à partir des eaux utilisées durant le processus de fonte des graisses a été décrit (Álvarez et al., 2018). Ces protéines possèdent des propriétés émulsifiantes et gélifiantes, formant des gels thermoréversibles (Álvarez et al., 2018).

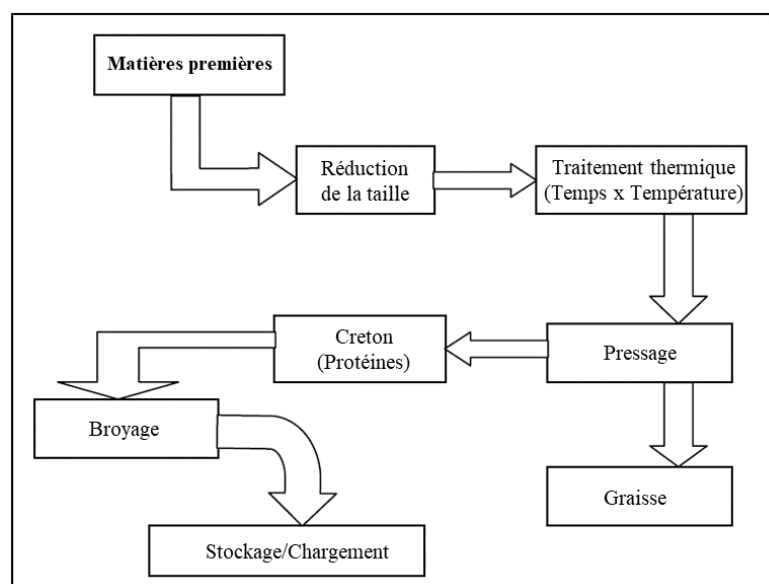


Figure 11: Processus de production de protéines issues de graisses animales (Meeker & Hamilton, 2006)

Partie 2 - Propriétés techno-fonctionnelles des protéines de viande

En plus de leur valeur nutritionnelle, les protéines jouent un rôle important dans les caractéristiques sensorielles des aliments, du fait de leurs propriétés fonctionnelles nombreuses et variées. Les propriétés fonctionnelles des protéines sont les propriétés physicochimiques qui affectent leur comportement dans les aliments pendant la préparation, la transformation, le stockage et la consommation, et qui contribuent de ce fait à la qualité et aux attributs sensoriels des aliments (Kinsella & Melachouris, 1976).

De nombreuses études sur la fonctionnalité des protéines de viande ont été réalisées sur des systèmes modèles composés d'une seule protéine purifiée ou d'un mélange simplifié de protéines. Leurs principales fonctionnalités, applicables aux viandes transformées, sont la gélification, l'émulsification et la capacité de rétention d'eau (Xiong, 2018 ; Kijowski, 2001). Les propriétés fonctionnelles des protéines musculaires (type de texture, saveur de viande, ...) ne peuvent être reproduites par aucune autre protéine alimentaire ou aucun ingrédient fonctionnel non protéique (Xiong, 2018). Toutefois, à l'instar des autres protéines, divers facteurs affectent les propriétés fonctionnelles des protéines de viande, qu'ils soient intrinsèques (liés à la structure de la protéine) ou extrinsèques (dépendant de l'environnement). Il est donc important de connaître ces facteurs et la manière dont ils influencent le comportement des protéines afin de pouvoir contrôler avec précision les propriétés sensorielles des aliments qui les contiennent, et d'offrir à l'industrie alimentaire une grande variété d'ingrédients protéiques adaptés aux différentes applications. La connaissance des propriétés techno-fonctionnelles des protéines en fonction des conditions du milieu est également nécessaire pour pouvoir envisager la substitution d'une protéine par une autre.

1. Différents types de protéines de viande

Les protéines représentent 50 à plus de 95 % de la matière sèche organique de la viande, selon la teneur en lipides des tissus. Les protéines de viande sont classées en trois catégories en fonction de leur solubilité dans l'eau et de leur localisation dans le muscle : les protéines sarcoplasmiques, les protéines myofibrillaires (MPs) et les protéines stromales (ou protéines des tissus conjonctifs) (Xiong, 2018 ; Chen et al., 2017) (Figure 12 et Figure 13). Seuls 50 % environ des protéines de viande sont solubles dans l'eau à faible force ionique ; il s'agit des protéines sarcoplasmiques. Parmi les 50 % restant, les MPs nécessitent de fortes concentrations en sel (> 2 % NaCl, soit environ 0.3 M) pour être solubilisées, quand les protéines des tissus conjonctifs (2 à 5 % des protéines totales) restent insolubles, même dans ces conditions de forte salinité (Chen et al., 2017). Les protéines des tissus conjonctifs peuvent toutefois être solubilisées dans des solutions acides ou alcalines, et également par une cuisson lente et humide en l'absence de composés acides ou alcalins (Xiong, 2018). Or, la solubilité dans l'eau est souvent un prérequis pour l'expression des propriétés techno-fonctionnelles des protéines (Zayas, 1997). C'est pourquoi il est généralement admis que des ajouts de 2 à 3 % de sel sont nécessaires pour l'expression complète des propriétés fonctionnelles des protéines du muscle (Sun & Holley, 2011).

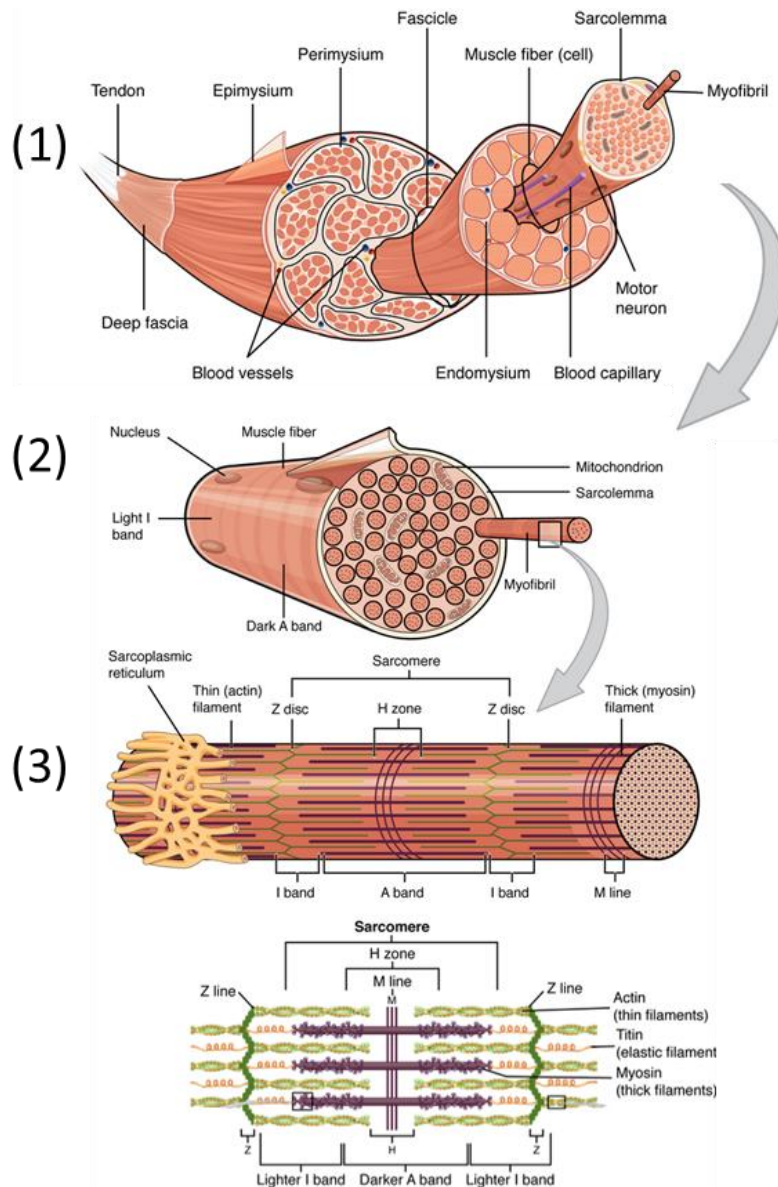


Figure 12: Représentation schématique du muscle squelettique. (1) Coupe transversale de faisceaux musculaires et des tissus conjonctifs. (2) Fibre musculaire longitudinale composée de myofibrilles, elles-mêmes composées de groupes de myofilaments entourés par le sarcolemme. (3) Protéines musculaires organisées en sarcomères (adapté de Biga et al., 2019).

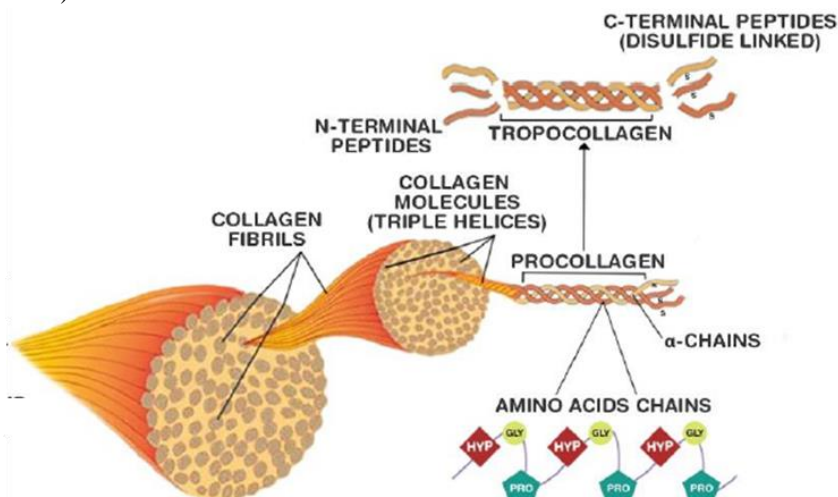


Figure 13: Structure des fibres de collagène (Matinong et al., 2022)

1.1. Les protéines sarcoplasmiques

Les protéines sarcoplasmiques sont des protéines intracellulaires. Elles sont très nombreuses puisque près de 500 protéines de ce type ont été identifiées, dont une majorité d'enzymes métaboliques comme l'aldolase, la glycéraldéhyde-phosphate-déshydrogénase, mais aussi des oxydoréductases, des protéases, des transférases et enfin une protéine essentielle au transport de l'oxygène dans le muscle, la myoglobine (Kijowski, 2001 ; Grujić et al., 2018 ; Nair et al., 2017). La myoglobine est probablement le membre le plus connu de la superfamille des globulines. Elle joue un rôle déterminant pour la qualité de la viande fraîche, en tant que principale protéine responsable de sa pigmentation. La plupart des protéines sarcoplasmiques ont une structure globulaire avec une densité élevée de résidus d'acides aminés polaires et chargés. Cela explique pourquoi elles sont solubles dans l'eau et les solutions à faible force ionique (Pearson & Young, 1989). Ces protéines ont des masses moléculaires relativement faibles (entre 17 et 100 kDa), et des points isoélectriques (pI) relativement élevés (6,5 à 9,5) (Grujić et al., 2018 ; Kijowski, 2001).

1.2. Les protéines myofibrillaires (MPs)

Les MPs, qui représentent la fraction protéique la plus abondante, sont responsables des propriétés de contraction du muscle. Elles sont présentes sous la forme de myofilaments composés d'actine (myofilaments fins) et de myosine (myofilaments épais) (Figure 12). La myosine, qui représente environ 45 % des MPs des muscles de mammifères (Sun & Holley, 2011), possède une structure fibreuse composée de six sous-unités (deux chaînes lourdes de 220 kDa ; quatre chaînes légères de 130 kDa) associées en une tige hélicoïdale hydrophile (queue) et une tête globulaire hydrophobe (Pearce et al., 2011). L'actine (environ 20 % des MPs) (Sun & Holley, 2011) est sous forme de filaments en double hélice (actine-F) composés de monomères d'environ 43 kDa chacun (Xiong, 1994). Le complexe formé par l'interaction entre la tête globulaire de la myosine d'une part, et l'actine d'autre part, est appelé actomyosine ; il s'agit du complexe protéique fonctionnel dominant dans les viandes transformées à faible teneur en sel (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005). L'actomyosine constitue la structure des myofibrilles qui contiennent par ailleurs un certain nombre d'autres protéines comme la desmine, la filamine, la taline, la vinculine, la connectine, les troponines... (Pearce et al., 2011). Le rôle de la plupart de ces protéines secondaires dans le muscle n'est pas entièrement compris.

1.3. Les protéines stromales

Les protéines stromales sont principalement situées dans l'espace interstitiel des cellules musculaires et sont pour cette raison généralement appelées protéines du tissu conjonctif. Elles sont composées du collagène, la protéine majoritaire de ces tissus, et de l'élastine, qui forme des fibres plus extensibles et moins rigides que celles du collagène et de la réticuline (Pearson & Young, 1989). Ces protéines extracellulaires constituent les fines fibrilles de collagène et réticulaires qui sont les principaux constituants de l'endomysium (fibres musculaires individuelles), du pérимыsium (faisceaux de fibres musculaires) et de l'épimysium (membrane recouvrant les muscles) (Figure 12) (Xiong, 2018). L'unité

de base d'une molécule de collagène est une structure en triple hélice (tropocollagène) (Figure 13) composée de trois chaînes polypeptidiques qui sont principalement stabilisées via des liaisons hydrogène, et composées de répétitions presque continues de la séquence Gly-X-Y-, où X est principalement de la proline et Y principalement de l'hydroxyproline. Il existe 28 types de collagène, les types I et III étant les plus répandus dans les muscles des mammifères (Henriksen & Karsdal, 2016). La quantité et le type de liaisons covalentes déterminent la solubilité et la digestibilité du collagène.

2. Propriétés épaississantes

2.1. Quelques définitions

Les épaississants alimentaires sont largement utilisés pour modifier les propriétés rhéologiques et texturales des aliments (Himashree et al., 2022). La rhéologie des produits alimentaires joue un rôle important dans le développement des produits, le contrôle de la qualité, l'évaluation sensorielle (Borwankar, 1992). Les polysaccharides (amidon, xanthane, gomme guar) sont fréquemment utilisés comme épaississants dans des aliments tels que les soupes, sauces, desserts, pâtes à gâteaux (Saha & Bhattacharya, 2010 ; Himashree et al., 2022). Un régime alimentaire épaissi est aussi une stratégie courante pour l'alimentation des patients atteints de dysphagie (difficulté à la déglutition) (Schmidt et al., 2021). La principale fonction des épaississants alimentaires est la modification des propriétés d'écoulement (Himashree et al., 2022).

Les propriétés d'écoulement des liquides sont étudiées en qualifiant le comportement d'écoulement des échantillons sous l'effet d'une contrainte de cisaillement (τ) en fonction d'un taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$), via l'analyse des courbes d'écoulement (Sojoudi & Saha, 2013) (Figure 14A). Le comportement d'écoulement est généralement utilisé pour caractériser les interactions intermoléculaires ; il représente la fonctionnalité des produits en termes de viscosité (η) (Figure 14B) (Couarraze et al., 2014). Plusieurs modèles ont été utilisés pour décrire le comportement d'écoulement des solutions : modèle linéaire (Newtonien ou Bingham), loi de puissance (Oswald-de-Waele), loi de puissance avec seuil d'écoulement (Herschel-Bulkley) et modèle de Casson. Le modèle de loi de puissance est le modèle le plus largement utilisé pour les liquides non-newtoniens (Barnes et al., 1989). Ce modèle établit les relations suivantes :

$$\tau = \tau_0 + K(\dot{\gamma})^n \quad [\text{Eq. 1}]$$

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = K(\dot{\gamma})^{n-1} \quad [\text{Eq. 2}]$$

avec τ la contrainte de cisaillement appliquée (Pa), τ_0 le seuil d'écoulement (Pa), K l'indice de consistance (Pa.s^n), $\dot{\gamma}$ le taux de cisaillement, n l'indice de comportement d'écoulement (sans dimension) et η la viscosité (Pa.s).

Un fluide est dit newtonien si sa viscosité ne dépend pas du taux de cisaillement ($n = 1$) (Figure 14), les liquides non-newtoniens étant ceux pour lesquels $n \neq 1$. Parmi les fluides non-newtoniens, on distingue les fluides rhéofluidifiants dont la viscosité diminue lorsque le gradient de cisaillement augmente ($n < 1$) ; le fluide apparaît de moins en moins visqueux au fur et à mesure que l'agitation augmente. À l'inverse, un fluide rhéoépaississant est un fluide dont la viscosité augmente lorsque le gradient de

cisaillement augmente ($n > 1$); le fluide devient de plus en plus épais (Couarraze et al., 2014) (Figure 14). De plus, certains fluides se caractérisent par l'existence d'un seuil d'écoulement qui indique que le fluide ne peut s'écouler qu'à partir d'une contrainte de cisaillement minimale (τ_0) (Figure 14A), comme c'est le cas par exemple pour le ketchup (Koocheki et al., 2009).

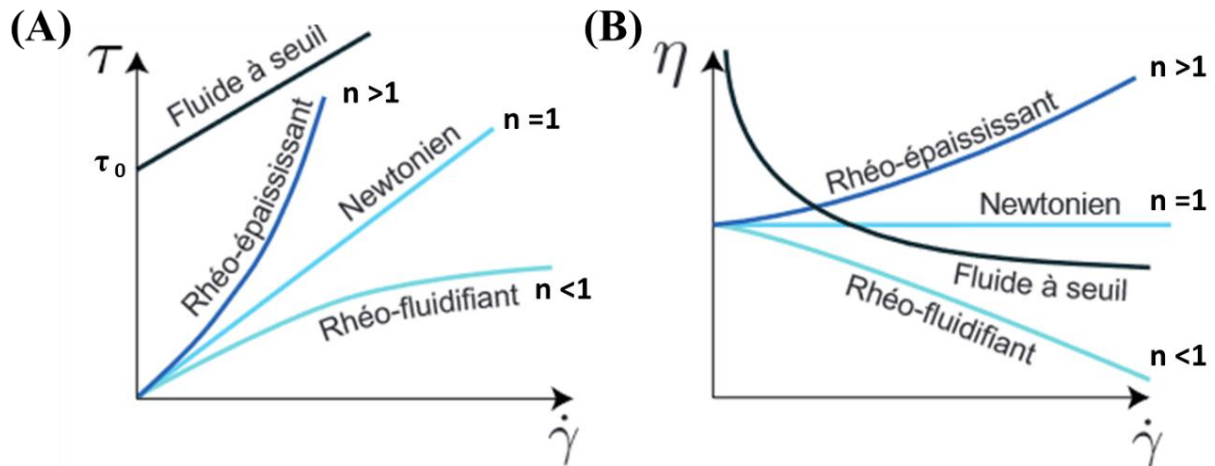


Figure 14: Différents types de comportement rhéologique. (A) Relation entre contrainte (τ en Pa) et taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$ en s^{-1}). (B) Relation entre viscosité (η en Pa.s) et taux de cisaillement. τ_0 est le seuil d'écoulement (Pa) (adapté de Clavaud et al., 2018)

2.2. Propriétés rhéologiques des protéines de viande en solution ou suspension

Les protéines alimentaires et notamment celles de viande sont des matériaux complexes sur le plan de la composition et de la structure et peuvent présenter une large gamme de comportements rhéologiques dans différentes conditions (Phillips et al., 1994).

2.2.1. Cas des MPs

Les MPs en solution ont un comportement rhéofluidifiant à 20 °C, qui peut tendre vers un comportement Newtonien après un traitement à hautes pressions, avec une viscosité à peine six fois la viscosité de l'eau (Chapleau & de Lamballerie-Anton, 2003). Un comportement Newtonien a également été observé à 37 °C, à une concentration en protéines inférieure à 1 mg/ml (Dara et al., 2021).

Les propriétés rhéologiques des MPs seraient liées principalement à la myosine puisqu'elle est le composant majeur des MPs (Chen et al., 2018). En raison de sa longue queue α -hélicoïdale, la myosine présente généralement une structure de chaîne caractéristique en forme de tige et peut être facilement modifiée sous cisaillement. En effet, à un faible taux de cisaillement, les molécules en forme de tige ou les agrégats de MPs ont tendance à se chevaucher et à s'emmêler (Chen et al., 2018). L'encombrement stérique et le frottement interne au sein des chaînes protéiques pourraient provoquer une viscosité élevée. Lors de l'augmentation du taux de cisaillement, les connexions entre les chaînes moléculaires de la myosine peuvent être perturbées et les molécules dispersées asymétriques s'aligneraient plus probablement sur les plans de cisaillement, affaiblissant ainsi la résistance au frottement et rendant la suspension plus fluide (Chen et al., 2018).

2.2.2. Cas des protéines sarcoplasmiques

La littérature sur les propriétés rhéologiques des protéines sarcoplasmiques est très pauvre et seuls des éléments sur la rhéologie d'émulsions à base de ces protéines ont pu être trouvés (Zhu et al., 2020 ; Hrynets et al., 2010 ; Chan et al., 2011).

2.2.3. Cas des protéines stromales

Le collagène, principal composant des protéines stromales, a également un comportement rhéofluidifiant, en raison de l'agrégation des particules de collagène (Duan et al., 2013). Au repos, elles maintiennent un ordre interne irrégulier et s'enchevêtrent, puis, sous l'effet d'un cisaillement croissant, les particules de collagène en solution se « démêlent » progressivement et glissent les unes sur les autres plus facilement, entraînant une diminution de la viscosité (Duan et al., 2013).

En revanche, alors que la gélatine est obtenue par dissociation complète des fibres de collagène, les solutions de gélatine se comportent comme des fluides newtoniens (Olivares et al., 2006 ; Wulansari et al., 1998). Cette différence de comportement peut principalement s'expliquer par la modification de structure moléculaire et les phénomènes d'agrégation des molécules (Wulansari et al., 1998).

2.3. Facteurs affectant la rhéologie des solutions de protéines de viande

2.3.1. Influence de la concentration en protéines

La concentration en protéines a une influence sur le comportement rhéologique des MPs et du collagène (Dara et al., 2021 ; Lai et al., 2008). Ainsi l'indice de consistance (K) des solutions de MPs augmente de 5,5 à 24 Pa.s lorsque la concentration en protéines augmente de 1 à 5 mg/ml (Dara et al., 2021). L'augmentation de la concentration en protéines de 5 à 15 mg/ml entraîne également une augmentation de la viscosité des solutions d'actomyosine, de 50 à 150 Pa.s (Cofrades et al., 1993). Enfin, la viscosité d'une solution de collagène augmente de façon exponentielle lorsque la concentration en protéines augmente au-delà de 0,75 % ; elle passe ainsi de 2,4 à 3,6 Pa.s lorsque la concentration augmente de 0,5 à 0,75 %, pour atteindre 406,2 Pa.s à 1,5 % de collagène (Lai et al., 2008).

Ce comportement résulterait de l'enchevêtrement des macromolécules (Chapleau & de Lamballerie-Anton, 2003) qui serait d'autant plus important que leur concentration est élevée, et qui imposerait des contraintes physiques entre les segments des chaînes polypeptidiques, un peu comme des nœuds ; les chaînes sont peu à peu bloquées et ne peuvent plus se déplacer les unes par rapport aux autres.

2.3.2. Influence du pH

Parce que les protéines sont des molécules amphotères, c'est-à-dire dont l'état de charge dépend du pH environnant, et que l'état de charge des protéines influe sur leurs caractéristiques structurales et sur leurs interactions, la viscosité des solutions protéiques peut varier en fonction du pH du milieu. Ainsi, lorsque le pH en solution s'éloigne du point isoélectrique (pI) d'une protéine, celle-ci peut voir son rayon hydrodynamique augmenter sous l'effet d'une hydratation plus importante, augmentant le frottement intrinsèque du système et donc la viscosité du milieu (Cofrades et al., 1993). Ainsi l'augmentation du

pH de 5.2 à 8 augmente la viscosité des solutions d'actomyosine, dont le pI est d'environ 5,8 (Cofrades et al., 1993). Dans le cas des solutions de collagène, la diminution de la viscosité observée lorsque le pH augmente de 4 à 7,4 résulterait de modifications conformationnelles de la protéine par une semi-flexibilité ou flexion progressive diminuant sa longueur (Amis et al., 1985).

2.3.3. *Influence de la force ionique*

L'ajout de NaCl (2 %) renforce le caractère rhéofluidifiant des solutions de MPs, tout en diminuant la viscosité (Bianchi et al., 1987). L'augmentation du seuil d'écoulement (τ_0) et de l'indice de consistance (K) résulterait de la solubilisation accrue de l'actomyosine et de l'augmentation du rayon hydrodynamique des MPs. Le frottement intrinsèque plus important entre des protéines de rayon hydrodynamique plus élevé nécessiterait alors une contrainte plus élevée pour que la solution s'écoule. Dans le cas de solutions de collagène à 6 mg/ml, la viscosité et le caractère rhéofluidifiant diminuent lorsque la concentration de NaCl augmente de 0 à 0.1 mol/L en raison d'une augmentation de la solubilité (salting-in) (Duan et al., 2013). En revanche, au-delà de 0.1 mol/L de NaCl, la diminution de la solubilité (salting-out) entraîne une augmentation de la viscosité et du caractère rhéofluidifiant des solutions de collagène (Duan et al., 2013).

3. Propriétés gélifiantes

3.1. Qu'est-ce qu'un gel ?

Le terme de gel fait généralement référence à une entité viscoélastique qui, dans le domaine alimentaire, est composée de macromolécules reliées entre elles par des liaisons covalentes ou non-covalentes, formant un réseau continu tridimensionnel capable d'immobiliser une certaine quantité d'eau (Xiong, 2018). Les aliments gélifiés sont populaires sur le marché en raison de leur faculté à augmenter la satiété (Nath et al., 2023). Les ingrédients alimentaires gélifiants sont généralement des polysaccharides ou des protéines, tels que les gommages naturelles, les amidons, les pectines, l'agar-agar et la gélatine (Banerjee & Bhattacharya, 2012 ; Nath et al., 2023). Les agents gélifiants sont ajoutés à une large gamme d'aliments, tels que les desserts (yaourt, gelée, garniture de pâtisserie), confitures, bonbons (chewing-gum, gomme, glaçage de confiserie), vinaigrettes, produits fromagers liquides, fromages à la crème, margarines, sauces, soupes... (Banerjee & Bhattacharya, 2012 ; Nath et al., 2023). La gélification de produits alimentaires peut également jouer un rôle thérapeutique comme c'est le cas pour les eaux gélifiées qui sont utilisées pour les personnes âgées souffrant de dysphagie (Sangnim et al., 2021).

La gélification peut être induite par voie physique (chaleur, pression) et/ou chimique (acide, ion) et/ou enzymatique. Dans le cas des ingrédients gélifiants protéiques, elle implique le dépliement et la dénaturation préalables des protéines (Nath et al., 2023). Les conditions de formation d'un gel protéique dépendent donc principalement des facteurs physico-chimiques influençant la structure des protéines.

3.2. Caractérisation d'un gel

Les gels peuvent varier considérablement dans leurs caractéristiques, qu'elles soient évaluées par des méthodes rhéologiques ou de texturométrie (Zayas, 1997). Ces différentes méthodes permettent d'accéder à différentes grandeurs pour caractériser un gel (Tableau 2). En général, les méthodes sont regroupées en trois catégories, à savoir les tests « fondamentaux », imitatifs et empiriques.

Tableau 2: Méthodes de mesure des caractéristiques d'un gel (adapté de Banerjee & Bhattacharya, 2012)

Nature du test	Type de mesure	Instrument utilisé	Grandeurs mesurées
Test fondamental	Oscillation	Rhéomètre à contrainte imposée	Module de stockage (G'), module de perte (G''), angle de phase, module complexe, viscosité, point de gélification
Test empirique	Compression	Texturomètre	Force maximale, fermeté, énergie de compression. Capacité de rétention d'eau
Imitatif	Analyse du profil de texture (TPA)		Dureté, fragilité, adhésivité, élasticité, cohésion

3.2.1. Caractérisation rhéologique des gels

La connaissance du comportement des gels en fonction de la température est importante dans le développement de produits alimentaires en raison de son influence sur les attributs sensoriels tels que la consistance et la fonte en bouche pendant le processus de consommation (Steffe, 1996). Par ailleurs, la détermination de la température de gélification d'une solution est essentielle pour définir les conditions dans lesquelles un gel peut être obtenu. La température de gélification peut être mesurée par des méthodes rhéologiques (Michon et al., 1993; Osorio et al., 2007), ou encore par microcalorimétrie différentielle (Ma & Harwalkar, 1991).

Une fois le gel formé, la rhéométrie oscillatoire, au cours de laquelle l'échantillon est soumis à une contrainte-déformation oscillatoire de fréquence connue (Saha & Bhattacharya, 2010), permet de caractériser ses propriétés viscoélastiques au travers du module de stockage G' qui représente la part élastique du gel, le module de perte G'' qui représente la part visqueuse, et l'angle de phase δ . Le rapport G''/G' , égal à $\tan \delta$, donne une mesure du déphasage entre la contrainte imposée et la déformation subie par l'échantillon, reflétant le degré de viscoélasticité des gels (Michon et al., 1993). Ainsi, il est possible de déterminer le point de gel, c'est-à-dire la transition de l'état liquide (visqueux) à l'état solide (gel, élastique), lorsque $G' = G''$ ou $\tan \delta = 1$ (Osorio et al., 2007 ; Michon et al., 1993).

3.2.2. Caractérisation de la texture des gels

La texture des gels alimentaires peut être étudiée par plusieurs méthodes mécaniques (compression, torsion, traction ou cisaillement). Actuellement, la méthode instrumentale la plus couramment utilisée est le test Warner-Bratzler (cisaillement) et l'analyse du profil de texture ou test TPA (compression, Friedman et al., 1963 ; Bourne et al., 1978). Le test TPA consiste en deux cycles de compression-décompression successifs au cours desquels la force de résistance à la compression de l'échantillon est mesurée de manière continue. Il a l'avantage de fournir des données aux déformations à la fois faibles

et élevées permettant aux gels d'être caractérisés par de multiples paramètres tels que la dureté, la cohésion et l'adhésivité (collant) (Figure 15). Les paramètres de compression obtenus avec le test TPA ont été utilisés par de nombreux auteurs pour décrire les produits alimentaires (Herrero et al., 2008 ; Romero de Ávila et al., 2014 ; Lau et al., 2000 ; Zhou & Regenstein, 2007 ; Rahman & Al-Mahrouqi, 2009).

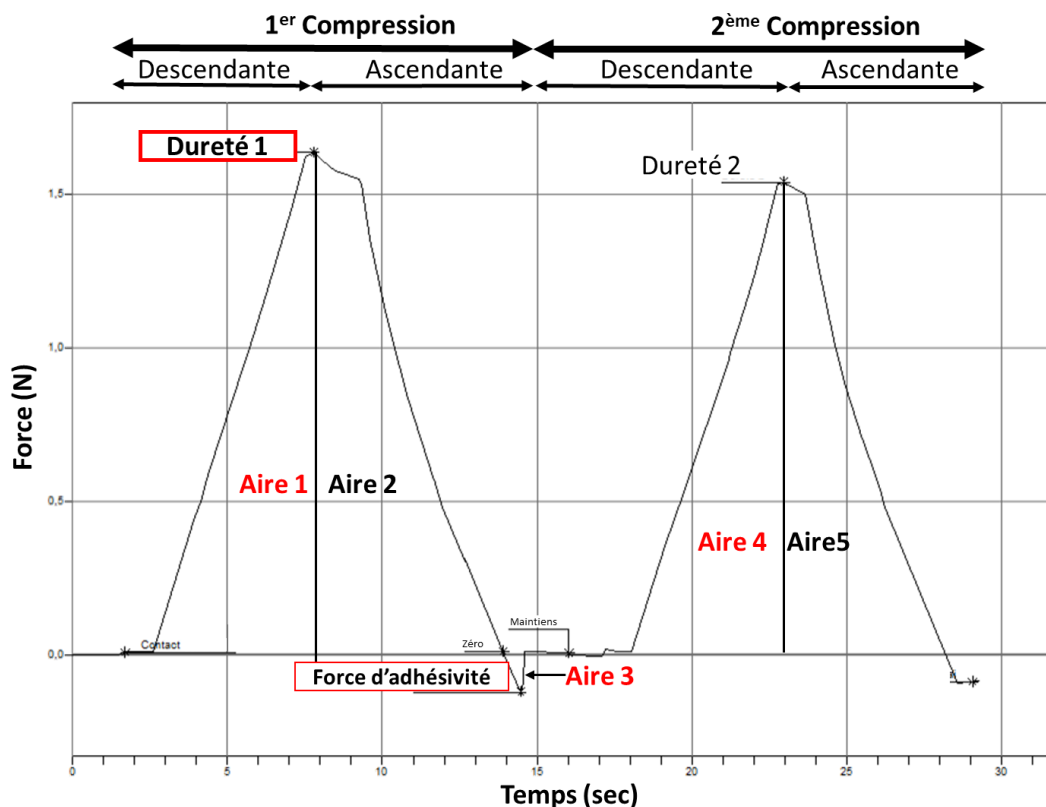


Figure 15: Profil type de l'évolution de la résistance à la compression d'un gel en fonction du temps lors d'un test TPA.

La valeur de dureté est déterminée comme la force maximale (N) enregistrée après une déformation imposée lors de la première compression. La cohésion (sans dimension), correspondant à la capacité de l'échantillon à retrouver sa forme d'origine après l'arrêt de la déformation (mémoire de déformation), est calculée en divisant l'aire sous la courbe (AUC) de la seconde compression par l'AUC de la première compression. L'adhésivité (J) est définie comme le travail nécessaire pour décoller la sonde de l'échantillon lors de sa remontée après la première compression (aire négative entre la courbe et l'axe des abscisses après la première compression) (Bourne et al., 1978).

Il est également possible d'évaluer la fermeté d'un gel en réalisant un test de compression uniaxial permettant d'étudier la résistance à la déformation (Zhou & Regenstein, 2007 ; Rahman & Al-Mahrouqi, 2009). Plusieurs paramètres peuvent être mesurés tels que la résistance à la rupture, c'est-à-dire la force nécessaire pour casser le gel (N) et la déformation à la rupture, exprimée en % et calculée en divisant la valeur de déformation à la rupture par la hauteur initiale de l'échantillon (Bourne, 2002). Mais le paramètre le plus couramment utilisé pour évaluer la qualité d'un gel est la force de résistance à l'enfoncement sans aller jusqu'à la rupture. Ainsi, il a été défini un protocole spécifique pour les gels de

gélatine, permettant de mesurer la résistance à l'enfoncement exprimé en « degré Bloom » (Bloom, 1925). Le « degré Bloom » est défini comme étant le poids mesuré en grammes (g) nécessaire pour enfoncer de 4 mm un cylindre de 12.7 mm de diamètre dans un gel à 6.67 % (p/p) de gélatine après une phase de maturation de 16 à 18 heures à 10 °C. La plupart des gélatines se situent entre 30 et 300 °Bloom (Johnston-Banks, 1990), avec une classification des gélatines comme faibles (< 150 °B), moyenne (150-220 °B) ou élevée (220-300 °B).

La capacité des gels protéiques à retenir l'eau dans leurs structures contre différentes forces externes est une autre caractéristique d'intérêt pour l'industrie alimentaire. Cette capacité, traditionnellement appelée capacité de rétention d'eau (WHC, Xiong, 2018), peut être mesurée en réalisant un test de compression uniaxiale à l'issue duquel la proportion de l'eau retenue dans le gel est calculée à partir de la mesure de la quantité d'eau exsudée lors de la compression (Lechevalier et al., 2007). L'exsudation peut aussi être provoquée par la centrifugation du gel (Correa de Moraes & Lopes Cunha, 2013) ; Wang et al., 2020).

3.3. Propriétés gélifiantes des protéines de viande

Théoriquement, les trois fractions de protéines musculaires peuvent former des gels si elles sont placées dans des conditions appropriées. En pratique cependant, les protéines sarcoplasmiques et stromales ne jouent qu'un faible rôle dans le phénomène global de gélification des aliments carnés (Xiong, 2018). Il existe quelques articles de synthèse sur la gélification et la texture des gels de protéines de viande, en particulier des MPs (Ziegler & Foegeding, 1990 ; Kijowski, 2001 ; Yasui & Samejima, 1990 ; Xiong, 2018).

Dans le cas des protéines de viande (MPs et sarcoplasmiques), la gélification, se produit en deux étapes, à savoir le dépliement des protéines, par exemple par dénaturation thermique, traitement par des acides, des alcalis ou de l'urée, suivi de l'agrégation des protéines, généralement en présence de sels (Kijowski, 2001 ; Zayas, 1997). Les propriétés du gel dépendent de la vitesse relative de chacune des deux étapes du processus. Si, l'étape d'agrégation est plus lente que celle de la dénaturation, les protéines dénaturées (« déployées ») peuvent se réorganiser pour former un réseau ordonné ; à l'inverse, des associations aléatoires entre polymères forment des agrégats de masse moléculaire élevée qui interagissent entre eux pour former un gel plus « grossier ». L'ampleur des modifications structurales des protéines avant agrégation, c'est-à-dire le taux de dénaturation, est donc d'une importance cruciale (Xiong, 2018).

En revanche, la gélification de la gélatine (issue du collagène) se déroule différemment, s'agissant d'un processus de gélification à froid (détaillé dans la section 3.3.3.) (Xiong, 2018).

3.3.1. Cas des MPs

L'aptitude à la gélification est la principale propriété fonctionnelle des MPs dans les produits carnés reconstitués. Le traitement thermique est la méthode la plus courante pour provoquer leur gélification, du fait de la dénaturation des protéines qu'il engendre et qui conduit à la formation d'un réseau tridimensionnel à base de liaisons disulfures, d'interactions électrostatiques, d'interactions hydrophobes

et de liaisons hydrogène (Zhang et al., 2015). Il est généralement admis qu'une forte concentration de NaCl (2 à 3 %) est nécessaire pour solubiliser les MPs et permettre ensuite la formation d'un gel (Sun & Holley, 2011).

La myosine est la principale protéine responsable de la gélification par la chaleur des MPs (Sun & Holley, 2011). La gélification de la myosine est optimisée à pH 5,5-6, à force ionique de entre 0,2 et 0,6 M KCl et à 65 °C (Ishioroshi et al., 1983).

L'actine peut également former un gel par polymérisation de molécules natives, mais elle ne gélifie pas par la chaleur (Yasui et al., 1980). En revanche, la présence d'actine en faible concentration augmente la force des gels thermo-tropiques de myosine ; la rigidité maximale est observée pour un ratio pondéral myosine/actine de 2/7 dans du KCl 0,6 M à pH 6,0 (Yasui & Samejima, 1990).

À l'inverse, la combinaison de MPs et de gélatine conduit à des gels moins fermes que ceux préparés avec des MPs seules ou de la gélatine seule, à concentration protéique équivalente. La gélatine n'interagissant pas avec les MPs, elle interrompait la matrice tridimensionnelle du gel de MPs (Sun & Holley, 2011). Il en est de même avec l'ajout de protéines sarcoplasmiques aux MPs qui affaiblissent les propriétés mécaniques du gel (Macfarlane et al., 1977).

3.3.2. Cas des protéines sarcoplasmiques

Les protéines sarcoplasmiques sont réputées offrir de moins bonnes propriétés techno-fonctionnelles que les MPs. En particulier, elles ont un très faible rôle dans les propriétés gélifiantes des protéines de viande. Lors de la formulation des produits carnés et notamment lors de la cuisson, elles coagulent très rapidement, dès 40 à 60 °C (Macfarlane et al., 1977). Elles possèdent en revanche des capacités de rétention d'eau qui, bien que faibles, sont utiles lors de la formulation des produits carnés (Zayas, 1997).

3.3.3. Cas des protéines stromales

Le collagène, principale protéine des tissus conjonctifs et la plus abondante dans une carcasse animale, est insoluble et donc sans aucune propriété fonctionnelle à l'état natif. Il doit subir un certain nombre de traitements physiques et chimiques pour être transformé en une forme extractible, soluble et hautement fonctionnelle : la gélatine. Le degré et le type de dégradation du collagène au cours de la fabrication des gélatines varient selon les conditions de traitement. Ces traitements combinent des étapes de chauffage en solution aqueuse et des traitements acides ou basiques (Gómez-Guillén et al., 2011). Des procédés enzymatiques ont également été proposés pour permettre à cette protéine fibreuse insoluble qu'est le collagène, d'exprimer des propriétés techno-fonctionnelles (Damrongsakkul et al., 2008).

La gélatine issue du collagène est une protéine aux propriétés gélifiantes uniques. Elle forme des gels aqueux thermiquement réversibles, durcis à froid, qui sont stabilisés par des liaisons hydrogène dans une large gamme de pH, relativement insensibles à la force ionique (Xiong, 2018). Au sein des gélatines de mammifères, la gélatine de bœuf donne des gels moins fermes et plus turbides que la gélatine de porc.

3.4. Facteurs affectant la gélification des protéines de viande

Les propriétés des gels de MPs et de gélatine dépendent largement des conditions environnementales dans lesquelles le traitement thermique est appliqué, à savoir le pH, la force ionique, et la concentration en protéine. Elles dépendent également de l'espèce animale ou du type de muscle dont ces protéines sont issues (Sun & Holley, 2011 ; Ahmed, 2017).

3.4.1. Influence de la concentration en protéine

La concentration minimale en protéines requise pour la formation d'un gel, ou concentration protéique critique (CPC) de gélification, dépend de l'origine et des propriétés des protéines. Dans le cas de la gélatine, la CPC est relativement faible, entre 0,5 et 1 % de gélatine en poids (Zayas, 1997). Au-delà de cette concentration seuil, la fermeté des gels augmente avec la concentration en protéines, du fait d'interactions intermoléculaires de plus en plus nombreuses (Zayas, 1997). Concernant les MPs, une teneur d'environ 0,5 % est suffisante pour produire un gel induit par la chaleur (Sun & Holley, 2011).

3.4.2. Influence du pH

Au point isoélectrique (pI), les protéines sont à leur minimum de solubilité et le taux d'agrégation est généralement élevé en raison de moindres répulsions électrostatiques. Cela conduit à des gels moins ordonnés et moins hydratés (Sikorski, 2001). C'est le cas pour la myosine à pH 5,3, où seuls des gels médiocres se forment, voire où la gélification est inhibée (Sun & Holley, 2011). La valeur de pH optimale pour la thermo-gélification de la myosine est pH 6. La gélatine offre quant à elle la particularité de former des gels dont les propriétés rhéologiques sont indépendantes du pH sur une large plage, de pH 4,6 à pH 8,0, c'est-à-dire autour de son pI qui est d'environ 5 (Pang et al., 2014).

3.4.3. Influence de la force ionique

Parmi les facteurs affectant les propriétés de gélification des MPs, la force ionique a longtemps été considérée comme très importante car elle influence la solubilité de ces protéines (Sun & Holley, 2011). Effectivement, la microstructure des gels de MPs est affectée par la force ionique. À faible force ionique (< 0,3 M), des structures de gel à brins fins (filaments) sont formées, alors qu'à force ionique élevée (0,6 M), des agrégats grossiers se forment (Hermansson et al., 1986). Or, la structure à brins fins possède une plus grande rigidité que la structure grossièrement agrégée (Hermansson et al., 1986). De plus, le type de sel peut également moduler la force des gels. Dans le cas de gels de protéines de bœuf, elle est la plus forte après l'ajout de chlorure de potassium, suivi du chlorure de sodium, puis du chlorure de calcium (Comfort & Howell, 2003). Toutefois, il convient de noter que l'effet de la force ionique sur la gélification dépend de l'état de charge des protéines et donc du pH de la solution (Sun & Holley, 2011).

4. Propriétés émulsifiantes

4.1. Définition d'une émulsion

Une émulsion est une dispersion de gouttelettes liquides (phase colloïdale) dans une phase continue (phase dispersive), les deux phases n'étant pas miscibles (McClements, 2015). L'émulsification est le

processus de formation d'une émulsion, majeur dans la fabrication de nombreux aliments formulés (crème glacée, vinaigrette, pâte à tartiner, saucisse à pâte fine...). Avec une taille de gouttelettes comprise entre 0,1 et 100 μm , les émulsions alimentaires sont classées comme macro-émulsions (McClements, 2007). Les attributs physicochimiques et sensoriels (stabilité, texture, saveur) des émulsions alimentaires sont fortement influencés par les caractéristiques des gouttelettes qu'ils contiennent (McClements, 2007). Les émulsions peuvent être du type huile dans eau (O/W, oil-in-water) ou eau dans huile (W/O, water-in-oil). Les émulsions de type O/W présentent généralement une texture crémeuse, tandis que celles de type W/O ont une texture grasse (Zayas, 1997).

Un mélange émulsionné de deux liquides non-miscibles n'est pas stable par nature et a donc tendance à se séparer spontanément en deux phases. Les émulsions alimentaires peuvent se déstabiliser en raison de divers mécanismes physico-chimiques. Les étapes de cette déstabilisation sont le crémage (migration ascensionnelle des gouttelettes lipidiques sous l'effet de la gravité dans le cas d'une émulsion O/W), la floculation (agrégation de gouttelettes lipidiques), et pour finir la coalescence (fusion irréversible des gouttelettes) (Damodaran, 2006) (Figure 16). Le critère de stabilité est un critère important de la qualité d'une émulsion.

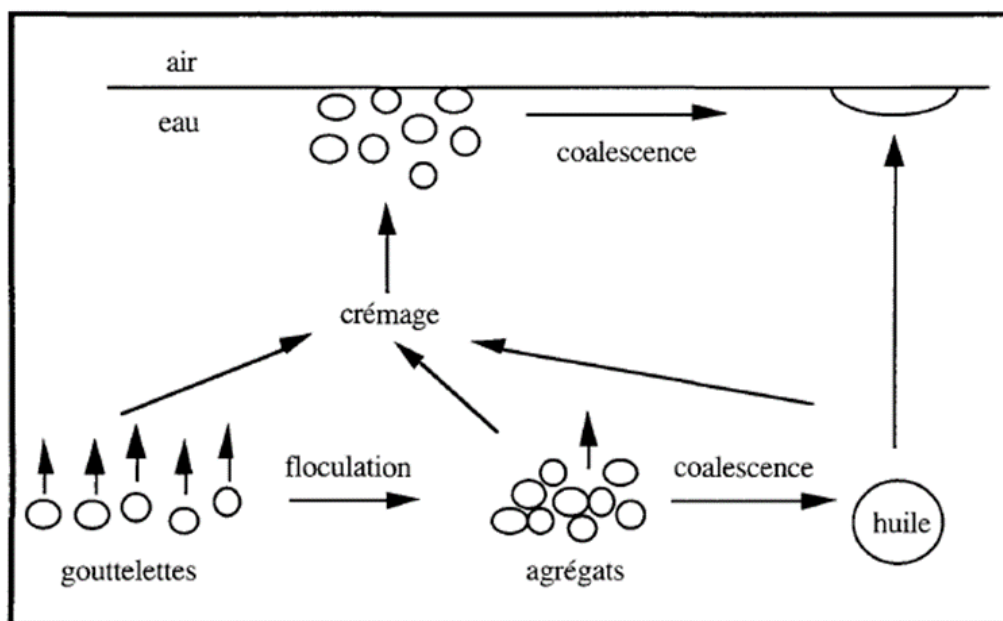


Figure 16: Phénomènes de déstabilisation d'une émulsion O/W (Tornberg & Hermansson, 1977)

Les protéines qui peuvent s'adsorber aux interfaces huile-eau et les stabiliser sont des émulsifiants efficaces. La formation d'une émulsion stabilisée par une protéine implique la diffusion de la protéine de la phase aqueuse vers une interface nouvellement formée, son adsorption à l'interface et souvent sa réorganisation structurale de manière à optimiser le contact de ses zones hydrophobes avec la phase lipidique, puis la mise en place d'interactions intermoléculaires (réticulation), voire d'autres réarrangements conformationnels au fil du temps (Zayas, 1997). Les protéines sont pour la plupart des agents émulsifiants efficaces car elles peuvent d'une part abaisser la tension aux interfaces huile-eau, et d'autre part stabiliser les émulsions lorsqu'elles ont la capacité à former un film interfacial stable,

cohésif et viscoélastique, via des interactions intermoléculaires hydrophobes, hydrogène et/ou électrostatiques, voire covalentes dans certains cas (Zayas, 1997).

4.2. Caractérisation d'une émulsion

Plusieurs caractéristiques définissent la qualité d'un agent émulsifiant, dont la capacité émulsifiante (CE) et la stabilité de l'émulsion formée (McClements, 2015). La capacité émulsifiante est définie comme le volume maximal d'huile pouvant être émulsifiée par gramme de protéine avant que se produise l'inversion de phase. La stabilité d'une émulsion fait référence à l'aptitude d'une émulsion à rester stable et inchangée au cours du temps (Pearce & Kinsella, 1978). Ces deux paramètres peuvent être mesurés par modification de la distribution granulométrique par microscopie, modification de la fraction d'huile séparée et modification de la phase aqueuse drainée au cours du temps (McClements, 2015).

4.2.1. Capacité émulsifiante (CE)

Le test de la CE établit la quantité maximale d'huile pouvant être émulsifiée par un volume donné d'une solution d'émulsifiant (potentiellement protéique) dans les conditions choisies. Pour cela, l'huile est ajoutée continuellement à la solution d'émulsifiant, agitée à vitesse constante, jusqu'au phénomène d'inversion de phase (McClements, 2015). Ce phénomène peut être détecté par méthode optique (changement d'aspect visuel), bien qu'elle ne soit pas précise. Il est plus couramment détecté par la chute brutale de la conductivité électrique, du fait que la phase continue, initialement de nature aqueuse, devient lipidique (Zorba et al., 1993). L'inversion de phase peut également être détectée par la modification de la viscosité (Zayas, 1997).

Bien que ce test soit largement utilisé pour caractériser les émulsifiants, il présente un certain nombre d'inconvénients qui limitent son application en tant que procédure standard, au vu des disparités des méthodologies et des conditions expérimentales utilisées qui induisent des résultats hétérogènes et difficilement comparables d'une étude à l'autre (Sherman, 1995).

4.2.2. Stabilité d'une émulsion

Parmi les méthodes utilisées pour étudier la stabilité des émulsions, on peut citer l'observation visuelle, la microscopie, la rhéologie, la spectroscopie à ondes diffusantes et la diffusion multiple de la lumière (McClements, 2007). Dans tous les cas, l'objectif est de suivre l'évolution de la distribution de taille des particules lipidiques. En effet, les phénomènes de déstabilisation d'une émulsion conduisent à une augmentation de taille des gouttelettes.

La mesure du diamètre d'une population de gouttelettes lipidiques dans la phase dispersée permet d'établir une distribution de taille à l'aide d'un microscope optique ou d'un granulomètre laser (par diffraction) (Dalglish, 2003). Cependant, la diffraction laser dépend de la taille des particules, avec une surestimation des grosses particules dans la distribution car elles diffusent plus la lumière que les plus petites (Dalglish, 2003). C'est pourquoi la concentration de particules, issue de l'analyse granulométrique, est généralement présentée sous forme de pourcentage en volume des gouttelettes dans

une classe de taille particulière, tandis que la taille de particules est généralement présentée sous la forme du rayon médian ou du diamètre de particule. Les valeurs granulométriques moyennes les plus couramment utilisées sont le diamètre moyen pondéré en surface ($d_{3,2}$) et le diamètre moyen pondéré en volume ($d_{4,3}$) :

$$d_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad [\text{Eq. 3}]$$

$$d_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad [\text{Eq. 4}]$$

avec n_i le nombre de particules de diamètre d_i

La mesure de la turbidité par spectrophotométrie fournit également des données sur la distribution de la taille des gouttelettes et le diamètre moyen (Pearce & Kinsella, 1978). La densité optique des émulsions diluées est en effet liée à l'aire interfaciale, c'est-à-dire à la surface de toutes les gouttelettes.

La méthode du Turbiscan, basée sur la diffusion dynamique de la lumière à l'aide de profils de transmission et de rétrodiffusion (BS), permet de suivre au cours du temps, à une température donnée, l'évolution d'une émulsion par un balayage à une longueur d'onde autour de 800 nm. Le principe de cette mesure repose sur la variation de la fraction volumique des gouttelettes (migration) ou de leur taille moyenne (coalescence) qui entraîne une variation des signaux (Mengual et al., 1999). La stabilité des émulsions opaques est mesurée par rétrodiffusion (BS). L'émulsion, déposée dans un flacon en verre, est scannée de bas en haut afin de suivre les propriétés optiques de la dispersion sur toute la hauteur de l'échantillon. La variation du signal, calculée comme la différence entre le signal au temps 0 (t_0) et à un temps donné, est visualisée par un changement de couleur des courbes au cours du temps (Figure 17). La stabilité de l'émulsion est exprimée au travers du Turbiscan Stability Index (TSI) qui agrège tous les phénomènes de déstabilisation se produisant dans l'échantillon, et mesurés par rétrodiffusion. Plus les valeurs TSI sont basses, plus l'émulsion est stable.

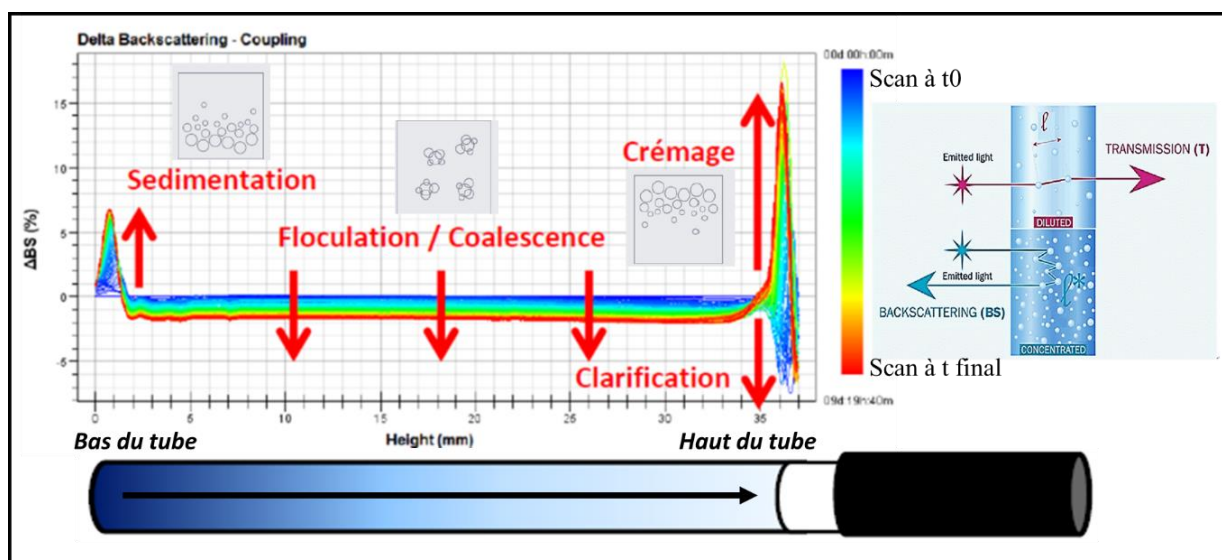


Figure 17: Profil Turbiscan mettant en évidence différentes instabilités se produisant au sein d'un même échantillon (©Turbiscan Lab, Formulation ; Lu et al., 2017)

4.3. Propriétés émulsifiantes des protéines de viande

Au sein des protéines musculaires, les MPs sont les principaux émulsifiants contrairement aux protéines sarcoplasmiques qui présentent des propriétés émulsifiantes très faibles. Les protéines stromales ont quant à elles un effet délétère sur le pouvoir émulsifiant des autres protéines (Kijowski, 2001). Quelques revues sur l'utilisation des protéines alimentaires comme émulsifiants ont été publiées (Zayas, 1997 ; Kijowski, 2001 ; McClements, 2015).

4.3.1. Cas des MPs

La myosine est la principale protéine impliquée dans la formation du film protéique entourant les gouttelettes de graisse dans les produits carnés émulsionnés. Au cours de l'émulsification, la myosine s'adsorbe rapidement à l'interface lipides-eau, suivie de l'actomyosine et de l'actine (Zayas, 1997). Les propriétés physicochimiques de la myosine expliquent ses bonnes propriétés émulsifiantes : elle est amphiphile, avec une région hydrophobe et une région hydrophile distinctes, et sa flexibilité moléculaire est suffisante pour lui permettre d'optimiser sa réorganisation structurale à l'interface pour abaisser la tension superficielle (Jones, 1984).

4.3.2. Cas des protéines sarcoplasmiques

Les propriétés émulsifiantes des protéines sarcoplasmiques sont très inférieures à celles de la myosine et de l'actomyosine, mais supérieures à celles de l'actine dans une solution de NaCl 0,3 M (Hegarty et al., 1963).

4.3.3. Cas des protéines stromales

Malgré l'effet délétère des protéines stromales sur les propriétés émulsifiantes des protéines de viande, lié à la formation de « poches de gel » (Zayas, 1997), il n'est pas rare que la fabrication de produits carnés tels que des saucisses mette en œuvre de grandes quantités de tissu conjonctif pour réduire les coûts de revient.

Contrairement au collagène dont elle est issue, la gélatine possède de bonnes propriétés émulsifiantes (Sase et al., 1987). Au-delà de son rôle tensioactif, elle contribue à la stabilisation des émulsions conservées au froid, du fait de son pouvoir gélifiant dans ces conditions.

4.4. Facteurs affectant les propriétés émulsifiantes des protéines de viande

4.4.1. Influence de la concentration en protéines

La teneur en protéines influence la stabilité des émulsions, sachant que la quantité de protéines nécessaire à la stabilisation d'une émulsion augmente lorsque le volume total de la phase dispersée augmente et que le diamètre des gouttelettes lipidiques diminue, en raison de l'augmentation de l'aire interfaciale totale. La concentration de surface des protéines à l'interface dépend de leurs caractéristiques et de leur concentration dans la phase aqueuse, ainsi que des interactions entre les différents types de protéines présentes dans le mélange (Sikorski, 2001). À faible concentration en protéines, un film mince peut être formé avec une faible résistance, diminuant la stabilité des émulsions. À l'inverse,

l'augmentation de la concentration en protéines augmente la stabilité des émulsions, reflétant la formation d'un film plus épais autour des gouttelettes émulsionnées, mais elle diminue la capacité émulsifiante (Delahaije et al., 2015). Généralement, les protéines sont mises en œuvre dans les émulsions à une concentration faible, dans la plage de 1,5 à 3 %, mais des concentrations plus élevées (5-10 %) sont également utilisées dans l'industrie (Zayas, 1997).

4.4.2. Influence du pH

Le pH du milieu peut affecter la solubilité des protéines, leur conformation et leurs propriétés de surface (hydrophobie et charge de surface), influençant indirectement leur capacité émulsifiante (Sikorski, 2001). Certaines protéines ont des propriétés émulsifiantes optimales au pI (blanc d'œuf, gélatine) (Fretheim et al., 1985), tandis que d'autres performant mieux à des valeurs de pH éloignées du pI (protéines de soja et d'arachide) (Zayas, 1997). À pH 5,8, proche du pI de l'actomyosine, la capacité émulsifiante de cette protéine diminue (Hegarty et al., 1963). Les protéines sarcoplasmiques ont quant à elles des propriétés émulsifiantes plus élevées à pH 3 qu'à pH 7,5 (pI) et pH 12 (Hemung et al., 2013). Le dépliement de ces protéines à pH acide semble augmenter leur adsorption à l'interface.

La stabilité des émulsions peut également être affectée par le pH du milieu, via la modification de la charge nette des protéines. Au pI, les répulsions entre les protéines aux interfaces sont minimales, les interactions intermoléculaires sont donc favorisées, et des films protéiques rigides se forment, ce qui améliore la stabilité de l'émulsion (Halling, 1981). Cependant dans le même temps, il y a moins de répulsions entre les gouttelettes lipidiques, et la floculation peut donc être plus grande, or, c'est un facteur de déstabilisation (McClements, 2007).

4.4.3. Influence de la force ionique

Comme le pH, la force ionique modifie l'état de charge des protéines, avec les mêmes conséquences sur les propriétés émulsifiantes que celles décrites au paragraphe précédent (Sikorski, 2001). En particulier, l'augmentation de la force ionique améliore les propriétés émulsifiantes des protéines de viande, dont notamment les MPs qui voient leur solubilité augmenter avec l'ajout de 1,5 à 3,0 % de NaCl, ce qui augmente à la fois la concentration en protéines disponibles et facilite leur diffusion vers l'interface (Zayas, 1997). L'augmentation de la capacité émulsifiante des protéines en présence de 0,5 à 1 M de NaCl a également été observée dans les viandes de type chair à saucisse (Cheftel et al., 1985). En revanche, l'augmentation de la concentration de sel au-delà de 1 M a un effet négatif sur la solubilité des protéines par effet de « salting-out ». Ainsi, la présence de NaCl diminue le potentiel de répulsion électrostatique et peut réduire la stabilité de l'émulsion (Zayas, 1997). Cependant, des protéines insolubles correctement dispersées contribuent également à l'émulsification des lipides (Sikorski, 2001).

Partie 3 - Evaluation de la qualité nutritionnelle des protéines

La qualité nutritionnelle des protéines est un critère essentiel qui se définit par leur aptitude à couvrir les besoins physiologiques en azote et en acides aminés essentiels (AAEs) (FAO, 2013). Divers facteurs contribuent à la qualité nutritionnelle d'une source de protéines alimentaires dont la teneur en protéines dans cette source, le profil en AAEs et leur digestibilité (Day et al., 2022).

1. Digestion des protéines et absorption des acides aminés (AAs)

Le processus de digestion des protéines est un phénomène complexe, regroupant des phénomènes mécaniques, chimiques et enzymatiques, se déroulant tout le long du tube digestif (bouche, estomac, intestin grêle, Singh & Gallier, 2014 ; Gawat et al., 2023). L'objectif de la digestion des protéines et de l'absorption des acides aminés (AAs) est de fournir à l'organisme les AAE et l'azote nécessaires à son bon fonctionnement, notamment pour la synthèse protéique mais également pour la synthèse d'autres composés azotés; il s'agit ainsi de couvrir les besoins de maintenance. A ces besoins de maintenance, se rajoutent des besoins supplémentaires à certains stades physiologiques, comme lors de périodes de croissance et également chez la femme en gestation ou allaitante.

1.1. Phase orale

La digestion des protéines débute lors de la mastication en bouche par la perturbation mécanique de la matrice alimentaire contenant les protéines (déstructuration et désorganisation) (Mosca & Chen, 2016). Cette étape est d'autant plus importante que l'aliment est solide et cohésif, comme par exemple la viande. La salive produite par les glandes salivaires est composée d'eau (99 %), d'ions/électrolytes, de l' α -amylase et de mucoprotéines permettant de former un bol visqueux prêt pour la déglutition. À l'issue de la phase orale, la taille des particules du bol alimentaire est généralement inférieure à 4 mm, bien que variable selon le type d'aliment ou l'individu. Cette phase favorise ainsi l'exposition de la protéine alimentaire aux protéases et peptidases digestives au cours des stades de digestion qui suivent.

1.2. Phase gastrique

Dans l'estomac, les protéines sont mélangées au suc gastrique (99 % eau, acide chlorhydrique (HCl), mucus) sécrété par les cellules pariétales, et aux enzymes digestives (pepsine, lipase), secrétées par les cellules principales, les cellules pariétales et principales étant majoritairement localisées dans le fundus. Le contenu de l'estomac (chyme) est doucement mélangé et broyé par des ondes péristaltiques causées par la contraction du muscle de la paroi de l'estomac (Gawat et al., 2023).

À jeun, le pH de l'estomac est compris entre 1,3 et 2,5 chez l'homme adulte. Après l'ingestion d'un repas, le pH augmente jusqu'à une valeur généralement comprise entre 4,5 et 6 (proche du bol alimentaire) selon la composition du repas, son pouvoir tampon, mais également selon l'individu. La valeur du pH redescend habituellement en dessous de 3, une heure après l'ingestion du bol alimentaire via la sécrétion de HCl, favorisant l'activation de la pepsinogène.

La pepsine hydrolyse les liaisons peptidiques des protéines préférentiellement en amont (côté N-terminal) des AAs aromatiques et de l'Ile, et en aval (côté C-terminal) de Leu et Phe (Suwareh et al., 2021). Cette hydrolyse est favorisée par le brassage du contenu gastrique (Singh & Gallier, 2014). Il en résulte des peptides de différentes tailles qui peuvent alors être évacués dans l'intestin grêle à une vitesse qui varie selon plusieurs facteurs, que ce soit lié à l'individu (stress, pathologie, grossesse...) ou à l'aliment. La charge calorique du bol alimentaire est un élément important, avec un ralentissement de la vidange pour des bols alimentaires plus riches en énergie et/ou en lipides. La taille des particules arrivant dans l'estomac serait également un facteur influent. Ainsi, une plus longue mastication permettrait de réduire la taille des particules et donc de diminuer le temps de vidange gastrique (entre 1h30 et 2h après ingestion, Kong & Singh, 2008). La vitesse de vidange gastrique est un élément clé déterminant la cinétique de digestion et d'absorption des AAs au niveau intestinal, et ainsi la vitesse d'apparition des AAs dans le sang (Gaudichon et al., 1994 ; Barbé et al., 2013).

1.3. Phase intestinale

Dans le duodénum, le chyme est mélangé avec le suc pancréatique, riche en bicarbonate permettant de neutraliser le pH acide du chyme entrant (valeurs comprises entre 5,9 et 6,8, Fallingborg et al., 1998) et en protéases, secrétées sous forme inactive (trypsinogène, chymotrypsinogène, pro-carboxypeptidase et pro-élastase). L'action de l'entérokinase, enzyme sécrétée par l'épithélium intestinal, est nécessaire pour activer le trypsinogène en trypsine qui peut alors activer les autres protéases pancréatiques. Le pH augmente ensuite progressivement pour atteindre 7,5 au niveau de l'iléon.

Avec les peptidases de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal, les enzymes pancréatiques hydrolysent les protéines en AAs, di-, tri- et oligopeptides. Les AAs et les di- et tripeptides libérés peuvent être absorbés à travers la muqueuse de l'intestin grêle et sont en grande partie absorbés au niveau de l'iléon terminal, avec des modulations en fonction de la nature des protéines et de la matrice, mais également en fonction de l'individu (Gawat et al., 2023). Le temps de transit moyen dans l'intestin grêle est de 3 heures chez l'homme, mais il peut varier entre 1 et 6 heures (Gropper & Smith, 2013). Les protéines, les peptides et les AAs qui n'ont pas été digérés ou absorbés dans le tractus gastro-intestinal supérieur peuvent servir de substrats pour le microbiote gastro-intestinal. Les bactéries sont plus nombreuses dans le côlon et l'iléon inférieur, mais sont présentes dans tout le tractus gastro-intestinal (Gawat et al., 2023).

2. Devenir métabolique de l'azote et des acides aminés alimentaires

Suite à la digestion des protéines, les AAs sont absorbés pour être utilisés par l'organisme pour la synthèse des protéines tissulaires (croissance et réparation), ou, en proportion moindre, pour la synthèse d'autres composés azotés, notamment hormones et neurotransmetteurs (FAO et al., 2007) Figure 18). Les AAs peuvent également être catabolisés et fournir de l'énergie via l'oxydation de leur squelette carboné.

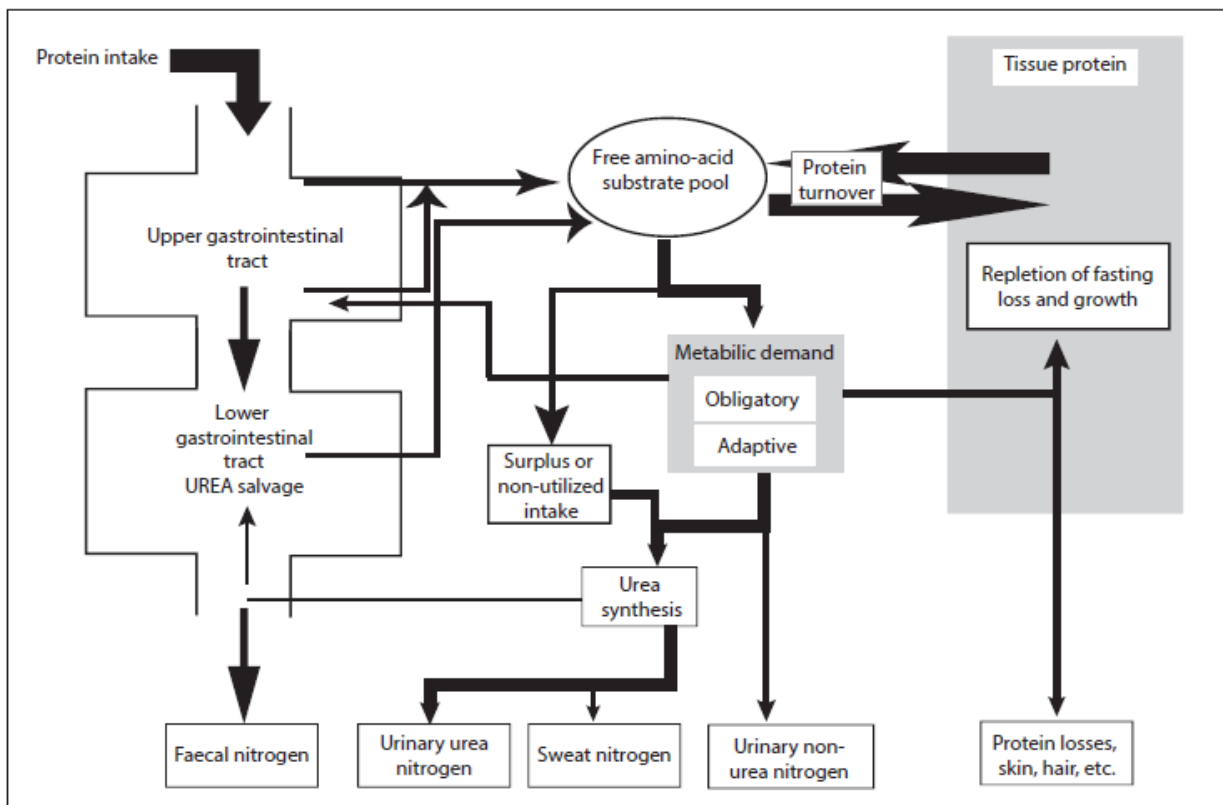


Figure 18: Modèle du métabolisme des protéines chez l'homme (FAO et al., 2007)

2.1. Voies métaboliques en phase postprandiale

Une partie importante des AAs absorbés par l'épithélium intestinal est utilisée par ces cellules épithéliales et par le foie, qu'ils rejoignent *via* la veine porte, pour leur propre métabolisme, en particulier pour le renouvellement des protéines. On distingue ainsi l'utilisation des AAs (ou extraction) au niveau de cette zone splanchnique (organes drainés par la veine porte : tube digestif, pancréas, rate et foie), qui constitue un premier prélèvement, de l'utilisation des AAs au niveau périphérique, véhiculés cette fois via le sang artériel (second prélèvement) (Trommelen et al., 2021).

Au cours de la phase postprandiale, la libération d'AAs (dont la leucine, l'isoleucine, la valine) d'origine alimentaire dans le sang induit une augmentation de la sécrétion d'insuline. En effet, l'insuline est la principale hormone anabolisante qui permet l'utilisation postprandiale des AAs pour la synthèse des protéines dans le muscle (Davis et al., 1998). Elle possède également un rôle d'inhibiteur de la dégradation protéique (Magkos et al., 2010).

2.2. Voies métaboliques en phase post-absorptive

Au cours de la période post-absorptive, afin de couvrir les besoins en AAs de l'organisme et satisfaire la demande métabolique, la voie catabolique, caractérisée par la dégradation des protéines, est favorisée. Le muscle squelettique est l'un des tissus les plus importants impliqués dans l'oxydation des protéines, en particulier celles contenant des AAs ramifiés (leucine, isoleucine et valine). Le muscle squelettique est le site majeur du catabolisme des AAs qui induit leur relargage dans la circulation sanguine afin qu'ils soient redistribués dans l'organisme (Blanco & Blanco, 2017).

La concentration plasmatique d'urée est un indicateur du niveau de catabolisme des AAs se produisant dans le foie (Brown & Cline, 1974). Ainsi, l'apparition de l'azote uréique dans le sang peut s'avérer être un indicateur fiable des carences en AAE par rapport aux besoins en protéines chez les espèces monogastriques comme le porc (Marín-García et al., 2022).

2.3. Impact de la cinétique d'absorption des acides aminés sur l'assimilation des protéines

Un critère non pris en compte à ce jour dans l'évaluation de la qualité nutritionnelle des protéines, mais ayant un rôle sur l'orientation métabolique de l'azote, est la cinétique de digestion et d'absorption des AAs. En effet, il a été montré que la cinétique de digestion, largement dépendante de la vitesse de vidange gastrique, conditionne l'efficacité d'utilisation postprandiale des protéines alimentaires dans certaines situations physiologiques. La vitesse à laquelle les AAs sont absorbés dans le sang après la prise de différentes sources de protéines peuvent affecter l'orientation métabolique et l'utilisation azotée. Boirie et al. (1997) ont ainsi établi le concept de protéines à digestion rapide et protéines à digestion lente à partir de l'observation du devenir des protéines du lait (lactosérum et caséines, respectivement). En effet, les cinétiques d'absorption des AAs en phase postprandiale sont différentes suivant la fraction protéique ingérée. Les protéines à digestion rapide induisent des taux de synthèse protéique plus élevés, mais également un taux d'oxydation plus élevé et une inhibition plus faible de la dégradation des protéines (Bos et al., 2003; Lacroix et al., 2006). Il est envisagé qu'une interaction complexe de facteurs, à savoir la cinétique de digestion/absorption, le profil des AAs alimentaires et la composition des repas, contribue aux modulations du devenir métabolique des AAs absorbés. Cependant, il est parfois difficile de classer une protéine comme « lente » ou « rapide » en ce qui concerne sa digestion par la seule évaluation de l'absorption des AAs (Nørgaard et al., 2021).

Il semblerait que la viande puisse être considérée comme une source de protéines à digestion rapide (Rémond et al., 2007). En effet, la cinétique d'apparition des AAs dans le sang suite à l'ingestion de viande est comparable à celle observée après l'ingestion de protéines du lactosérum. Toutefois, la cuisson de la viande module la cinétique d'apparition des AAs dans le sang (Santé-Lhoutellier et al., 2017). La forme de la courbe et l'aire sous la courbe indiquent en effet une augmentation de la vitesse de digestion des protéines et d'absorption des AAs lorsque la température de cuisson de la viande augmente de 60 à 75 °C, et une diminution de la vitesse de digestion lorsque la température augmente de 75 à 95 °C. Les auteurs ont supposé qu'une température de cuisson faible induit une dénaturation progressive des protéines exposant plus de sites de clivage accessibles aux enzymes digestives, alors qu'à des températures supérieures, des phénomènes d'oxydation conduisent à l'agrégation des protéines, masquant alors certains sites de clivage. Ainsi, le degré de cuisson de la viande influencerait l'efficacité de la digestion par la pepsine, conduisant à une sortie de l'estomac et une attaque des protéines par les enzymes pancréatiques plus ou moins rapides, conditionnant aussi la cinétique d'apparition AAs dans le sang.

3. Modèles d'étude de la digestion

La méthode idéale d'évaluation de la qualité nutritionnelle des protéines alimentaires est la mesure de la digestibilité iléale vraie directement chez l'Homme. Cependant, les considérations éthiques et le coût des études cliniques limitent le recours à de telles méthodes. Les études sur modèle animal, notamment chez le porc, s'avèrent le meilleur compromis à ce jour du fait de leurs similitudes de digestion avec l'Homme. Cependant, les considérations éthiques (Règles des 3R, Russell & Burch, 1960) tendent vers une diminution ou un remplacement des modèles *in vivo* par des modèles *in vitro* (Dupont et al., 2019).

3.1. Chez l'Homme

Diverses modalités d'étude de la digestion sont possibles chez l'homme. Il est ainsi possible de collecter des effluents iléaux suite à une iléostomie (Hodgkinson et al., 2022) ou grâce à une intubation naso-iléale à l'aide d'une sonde (Tessier et al., 2022). Cependant ces méthodes sont invasives, avec une tolérance variable des sujets au fait d'être intubés et de rester allongés pendant plusieurs heures.

Il est également possible de suivre l'ingestion de repas et les cinétiques de mise à disposition des AAs grâce à l'utilisation de protéines alimentaires intrinsèquement marquées (méthode double traceur), ou encore par la technique non invasive d'oxydation des acides aminés indicateurs (IAAO) (Bandyopadhyay et al., 2022; Buffière et al., 2021). Le principe de la méthode double traceur repose sur l'utilisation de plusieurs protéines marquées intrinsèquement (protéine test et protéine de référence) avec différents isotopes stables (^{13}C , ^{15}N , ^2H) permettant de mesurer la digestibilité iléale de plusieurs AAs à la fois de façon indirecte en mesurant l'apparition dans le plasma d'AAs marqués, donc après une « simple » prise de sang (FAO, 2014 ; Devi et al., 2018). La technique IAAO repose sur le principe d'oxydation d'un AA « indicateur » (IAA) administré par voie orale, utilisé pour évaluer la contribution à la synthèse des protéines d'un IAA alimentaire test non marqué. Plus l'oxydation de l'IAA est élevée, plus la synthèse protéique est faible (Elango et al., 2012). Cette méthode permet d'estimer la disponibilité métabolique (incluant la digestibilité, l'absorption et l'utilisation) d'un seul IAA sélectionné dans une protéine alimentaire uniquement par la mesure de l'enrichissement en $^{13}\text{CO}_2$ dans des échantillons d'haleine. Cependant, ces techniques encore en cours de développement restent complexes. Ainsi, il existe un nombre relativement limité d'études de la digestion des protéines réalisées chez l'homme pour des raisons éthiques, financières et pratiques.

3.2. Modèles animaux

Depuis de nombreuses années, diverses espèces d'animaux ont été utilisées afin d'évaluer la digestion des aliments, dont les plus fréquemment utilisés dans la littérature sont le rat et le porc (Baker, 2008). En effet, les éléments constitutifs du système digestif sont similaires chez les mammifères, bien que la validité des données d'extrapolation d'une espèce à une autre (par exemple, des animaux à l'homme) dépend de la similitude du métabolisme et de la physiologie intestinale.

Le rat n'est plus le modèle animal de choix étant donné qu'il a des besoins en AAs soufrés plus élevés que l'homme et les échantillons collectés sont de petite quantité (limitant pour les analyses). Cependant, il reste toujours utile et présente l'avantage d'occuper peu de place et de consommer peu d'aliments (DeSesso & Jacobson, 2001).

En raison des fortes similitudes démontrées entre le porc en croissance et l'Homme adulte du point de vue de la digestibilité iléale vraie des AAs (Deglaire et al., 2009 ; Hodgkinson et al., 2022), c'est ce modèle qui est aujourd'hui préconisé dès lors qu'une étude chez l'Homme n'est pas envisageable pour l'évaluation de la qualité des protéines alimentaires (FAO, 2014). La mesure de la digestibilité chez le modèle porc est possible après une euthanasie (Montoya et al., 2014), une anastomose iléo-rectale, ou en installant des canules en fin d'iléon (Leeuwen et al., 1991), permettant ainsi le recueil des digestas. Il est également possible d'installer des cathéters vasculaires permettant le recueil des flux sanguins (Fardet et al., 2013). La cathétérisation est réalisée le plus souvent au niveau de la veine jugulaire, et moins fréquemment car plus sensible, au niveau de la veine porte. Ceci permet d'étudier le métabolisme des nutriments (tels que les AAs), traduisant des prélèvements ou relargages par les tissus drainés (Nørgaard et al., 2021 ; Rérat et al., 1985).

L'insertion de canules et cathéters qu'il est possible de conserver en place tout au long d'une cinétique ou pour tester différents repas, permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaires au déroulement d'une étude.

3.3. Modèles de digestion *in vitro*

L'utilisation de modèles *in vitro* pour évaluer la qualité des protéines alimentaires s'est largement répandue au cours des dernières années en tant qu'alternative aux modèles *in vivo* (Bohn et al., 2018). En effet, ils possèdent de nombreux avantages, tels que d'accéder plus facilement aux échantillons aux différents stades de la digestion qu'avec les modèles *in vivo*. Il est aussi possible de cribler un grand nombre d'aliments. De plus, les conditions expérimentales standardisées augmentent la reproductibilité et répétabilité par rapport aux modèles *in vivo*. Enfin, le coût et la technicité requise sont inférieurs à ceux des modèles *in vivo* et sont sans contraintes d'ordre éthique. Cependant, ces modèles posent certaines difficultés comme l'impossibilité de mimer la complexité du tractus gastro-intestinal (régulations hormonales, neuronales...), de garantir la fiabilité des paramètres physiologiques et d'imiter diverses situations physiologiques/pathologiques (conditions de stress, pathologie...).

Afin d'étudier au mieux la digestion des aliments, une large gamme de modèles *in vitro* a été développée. Il existe des modèles mono- ou multi-compartmentaux en conditions statique, semi-dynamique ou dynamique (Guerra et al., 2012 ; Dupont et al., 2019). Les méthodes *in vitro* de mesures de digestibilité reposent sur la détermination de la concentration en azote et AAs digestibles, déterminés après simulation de la digestion et après fractionnement (centrifugation, filtration, précipitation avec un solvant ou à l'acide). Cette fraction digestible et absorbable doit ensuite être corrigée par la contribution de l'azote et des AAs provenant des enzymes digestives, à l'aide d'un blanc de digestion.

3.3.1. Conditions statiques

Un consensus de modèle de digestion *in vitro* en conditions statiques a été obtenu à l'échelle internationale au sein du réseau scientifique international INFOGEST. Ce modèle est basé sur un grand nombre de données physiologiques humaines (Minekus et al., 2014 ; Brodkorb et al., 2019).

Les modèles statiques consistent en une succession de bioréacteurs recréant l'environnement que subit l'aliment lors de son transit dans le tube digestif. Ces modèles, simples à mettre en œuvre, ne prennent en revanche pas en compte la dynamique de la digestion, les conditions de digestion étant fixées en début de réaction et n'étant pas modulées en cours de digestion. Par ailleurs, il n'y a pas de vidange en continu entre les deux compartiments de digestion (gastrique et intestinal).

3.3.2. Conditions semi-dynamiques et dynamiques

D'autres modèles, semi-dynamiques et dynamiques, ont été développés afin de complexifier la simulation de la digestion. Dans le modèle semi-dynamique, la phase gastrique est généralement réalisée à l'aide d'un dispositif nommé pH-stat qui permet de maintenir le pH à une valeur stable, sur un pas de temps fixé, et ainsi d'acidifier par palier le compartiment gastrique (Mat et al., 2016). Le modèle dynamique nécessite d'avoir un dispositif spécifique (DIDGI®, TIM®, etc..), avec un contrôle assisté par ordinateur qui permet de réguler les différents paramètres en continu, notamment pour le pH, la vidange et l'ajout progressif de sécrétions digestives (Dupont & Mackie, 2015 ; Guerra et al., 2012).

4. Indicateurs de la qualité nutritionnelle des protéines

4.1. Besoin en azote et acides aminés essentiels

Le besoin nutritionnel moyen en protéines a été établi pour un adulte en bonne santé à 0,66 g de protéines de bonne qualité par kg de poids corporel et par jour, ce qui correspond en termes de référence nutritionnelle pour la population (RNP) à 0,83 g/kg de poids corporel/jour (FAO, 2013). Ces besoins diffèrent selon l'âge. Les besoins nutritionnels moyens des personnes âgées de plus de 60 ans sont fixés à 0,8 g de protéines de bonne qualité par kg et par jour soit une RNP de 1,0 g/kg poids corporel /jour, tel que défini par l'ANSES (2019) et rapporté dans le revue de Nowson & O'Connell (2015). Les besoins en protéines des enfants (de 6 mois à 3 ans) et des nourrissons (moins de 6 mois) sont également plus élevés que ceux des adultes, en raison des besoins accrus pour la croissance (0,86 et 1,12 g/kg/jour, respectivement ; FAO, 2013).

Les protéines alimentaires sont à la fois source d'azote et AAE, c'est-à-dire qui ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme humain. Les AAE pour l'Homme sont au nombre de neuf (histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine), auxquels on ajoute deux AAs conditionnellement essentiels (cystéine et tyrosine), car synthétisés à partir de deux AAEs (méthionine et phénylalanine) qui peuvent devenir limitants pour la synthèse de ces AAs conditionnellement essentiels. Au-delà de leur rôle dans la synthèse protéique, les AAEs peuvent également être impliqués dans la synthèse de composés azotés non protéiques ou participer à diverses voies métaboliques telles que décrites dans le Tableau 3 (Wu, 2009).

Tableau 3: Fonctions des acides aminés essentiels (AAEs) et de leurs principaux métabolites dans la nutrition et le métabolisme (Wu, 2009)

AAE	Métabolites	Rôle
Cystéine	-	Liaison disulfure dans les protéines ; transport de soufre
	Taurine	Antioxydant ; régulation de l'état « cellular redox » ; osmolyte
	H ₂ S	Molécule de signalisation
Histidine	-	Méthylation des protéines ; structure et fonction de l'hémoglobine ; dipeptides antioxydants ; métabolisme «one-carbon »
	Histamine	Réaction allergique ; vasodilatateur ; sécrétion centrale d'acétylcholine ; régulation de la fonction intestinale
	Acide urocanique	Modulation de la réponse immunitaire de la peau
Isoleucine	-	Synthèse de glutamine et d'alanine ; équilibre entre les BCAA
Leucine	-	Régulation du renouvellement des protéines par la signalisation cellulaire mTOR et l'expression génique ; activation de la glutamate déshydrogénase; équilibre en BCAA ; exhausteur de goût
Lysine	-	Régulation synthèse de NO; méthylation des protéines (par exemple, triméthyllysine dans la calmoduline), acétylation, ubiquitination et O-glycosylation
	Carnitine	Transport des acides gras à longue chaîne dans les mitochondries pour oxydation ; stockage d'énergie sous forme d'acétylcarnitine ; antioxydant
Méthionine	Créatine	Antioxydant ; métabolisme énergétique dans les muscles et le cerveau ; développement et fonctionnement neurologique et musculaire
	Carnitine	Transport des acides gras à longue chaîne dans les mitochondries pour oxydation ; stockage d'énergie sous forme d'acétylcarnitine ; antioxydant
	Homocystéine	Oxydant ; inhibition de la synthèse de NO
	Bétaïne	Méthylation de l'homocystéine en méthionine, métabolisme «one-carbon »
	Choline	Synthèse de la bétaïne, de l'acétylcholine, de la phosphatidylcholine et de la sarcosine
	Taurine	Antioxydant ; osmorégulation ; développement d'organes ; fonctions vasculaires, musculaires, cardiaques et rétinienne ; lutte contre l'inflammation
Phénylalanine	-	Activation de la synthèse de BH ₄ (un cofacteur de la synthèse de NO) ; synthèse de tyrosine ; développement et fonction neurologiques
Thréonine	-	Synthèse de la mucine nécessaire au maintien de l'intégrité et de la fonction intestinale ; fonction immunitaire ; phosphorylation des protéines et O-glycosylation ; synthèse de la glycine
Tryptophane	Sérotonine	Neurotransmetteur ; inhibition de la production de cytokines inflammatoires et de superoxyde
	NAS	Inhibition de la synthèse de BH ₄ ; antioxydant ; inhibition de la production de cytokines inflammatoires et de superoxyde
	Mélatonine	Antioxydant ; inhibition de la production de cytokines inflammatoires et de superoxyde
	ANS	Inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires T-helper-1 ; prévention de la neuro-inflammation auto-immune ; amélioration de la fonction immunitaire
	Niacine	Composant du NAD et du NADP ; coenzyme pour de nombreuses oxydoréductases
Tyrosine	-	Phosphorylation, nitrosation et sulfatation des protéines
	Dopamine	Neurotransmetteur ; régulation de la réponse immunitaire
	EPN et NEPN	Neurotransmetteurs ; métabolisme cellulaire
	Mélanine	Antioxydant ; inhibition de la production de cytokines inflammatoires et de superoxyde
Valine	-	Synthèse de glutamine et d'alanine ; équilibre entre les BCAA

ANS : Acide anthranilique ; BCAA : AA à chaîne ramifiée, BH₄ : tétrahydrobioptérine ; EPN : épinéphrine (adrénaline) ; H₂S : sulfure d'hydrogène ; NAD : nicotinamide adénine dinucléotide ; NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; NAS : N-acétylsérotonine, NEPN : norépinéphrine (noradrénaline) ; NO : oxyde nitrique.

Des profils de référence en AAEs, basés sur les besoins, ont été définis selon trois tranches d'âge : « < 6 mois » ; « de 6 mois à 3 ans » ; « enfants de plus de 3 ans, adolescents et adultes » (Tableau 4, FAO, 2013). Dans les premiers stades de la vie, les AAEs sont nécessaires à la croissance et à l'entretien du corps, alors qu'aux stades ultérieurs de la vie, les besoins de croissance diminuent progressivement laissant place uniquement à des besoins de maintenance.

Tableau 4: Profils de référence en acides aminés essentiels pour les nourrissons, jeunes enfants et enfants, adolescents, adultes (en mg/g de protéine ; FAO, 2013).

Groupe	His	Ile	Leu	Lys	SAA	AAA	Thr	Trp	Val
Nourrisson (0 à 6 mois)	21	55	96	69	33	94	44	17	55
Enfant (6 mois à 3 ans)	20	32	66	57	27	52	31	8,5	43
Enfant (> 3ans), Adolescent, Adulte	16	30	61	48	23	41	25	6,6	40

Afin d'évaluer la qualité nutritionnelle d'une protéine, il est possible de comparer son profil en AAEs à celui du profil de référence, indiquant ainsi le taux de couverture des besoins en AAEs, sans tenir compte à ce stade de leur biodisponibilité. Ce calcul correspond au score chimique (SC), tel que défini par la FAO en 2007 et tel qu'indiqué dans l'équation 5.

$$SC = \frac{\text{mg AAE dans 1 g de la protéine alimentaire}}{\text{mg du même AAE dans 1 g de la protéine de référence}} \quad [\text{Eq. 5}]$$

Un manque d'un AAE affecte l'utilisation des autres AAEs par l'organisme, et plus particulièrement cet AAE devient alors limitant pour la synthèse protéique, ce qui détermine le taux d'utilisation de l'ensemble des AAEs pour la synthèse des protéines dans le corps humain (Bender, 1960).

La plupart des protéines animales présentent une composition en AAEs équilibrée par rapport aux besoins de l'Homme, mais ce n'est pas le cas d'un grand nombre de protéines végétales (Tableau 5 ; Day et al., 2022). La lysine est généralement limitante dans les céréales, alors que les légumineuses, généralement plus riches en lysine sont souvent déficientes en AA soufrés (méthionine et cystéine) ; c'est notamment le cas de la fève et du haricot noir. En revanche, soja et pois chiches ont des teneurs en AAEs proches, voire plus élevées que celles du profil de référence. Cela induit des scores chimiques (SC) qui sont souvent inférieurs à 1 pour les protéines végétales (à l'exception du soja et du pois chiche), alors qu'ils sont supérieurs à 1 pour les protéines animales (à l'exception du collagène ; Day et al., 2022).

Tableau 5: Profils en AAEs (mg/g de protéines), digestibilité iléale vraie des protéines (DIV – N) et DIAAS (%) des protéines de différentes sources suivant les profils de référence des populations « enfants de 6 mois à 3 ans » (a) et « enfants, adolescents, adultes » (b) d'après la littérature (1-24) ; en gras : score chimique le plus faible pour les populations (a) et/ou (b).

Source	SAA	His	Ileu	Leu	Lys	AAA	Thr	Trp	Val	DIV-N (%, 1)	DIAAS a (%)	DIAAS b (%)
Profil (a)	27	20	32	66	57	52	31	8,5	43			
Profil (b)	23	16	30	61	48	41	25	6,6	40			
Viande de Bœuf (2,3,4)	35	31	40	65	70	61	36	10	46	91-98	97 (Val)	112 (N/A)
H. de muscle bovin (5)	26	31	32	61	76	28	34	6	40	84	63 (Trp)	81 (Trp)
Collagène bovin (6)	9	7	15	28	36	27	15	2	23	81	nd	nd
H.de collagène bovin (5)	8	7	15	29	36	21	17	0	23	79	0 (Trp)	0 (Trp)
Poulet (7,8,13)	31	34	52	85	100	40	46	10	51	92-96	nd	108 (Trp)
Porc (9-10)	30	37	39	71	76	68	40	11	47	98	117 (Val)	125 (Val)
H. de muscle porcine (5)	22	24	26	53	67	24	27	4	35	91	42 (Trp)	54 (Trp)
H. de plasma porcine (6)	29	30	36	86	89	55	44	14	68	81	87 (SAA)	102 (SAA)
H. de cœur de porc (5)	27	18	29	67	74	29	32	7,3	45	79	76 (Trp)	87 (Ileu)
Œuf entier (10,11,12)	52	25	57	91	78	98	51	12	64	97	101 (His)	113 (His)
Lait de vache (12,13)	30	28	53	99	84	95	47	14	65	94	nd	114 (SAA)
I. de lactosérum (14,15)	52	16	74	121	109	75	88	17	69	95	100 (His)	125 (His)
Riz (10,16)	44	26	45	88	28	82	37	14	63	91	47 (Lys)	55 (Lys)
Maïs (10,16)	44	27	39	128	29	100	36	8	51	89	36 (Lys)	42 (Lys)
Blé (15,17)	36	23	26	70	24	73	13	30	44	93	45 (Lys)	54 (Lys)
Sorgho (18,19)	15	17	34	124	16	80	31	8	43	68	22 (Lys)	29 (Lys)
Millet (20)	24	17	35	12	5	87	24	1	41	83	nd	7 (Lys)
Orge (18)	34	21	33	62	33	69	29	8	45	74	43 (Lys)	51 (Lys)
Avoine (10,18)	48	24	39	75	44	93	33	8	54	84	57 (Lys)	77 (Lys)
Lupin (10, 21)	13	39	40	69	45	80	40	10	41	76	68 (SAA)	80 (SAA)
I. de soja (15)	26	25	49	56	56	94	39	13	51	94	84 (SAA)	98 (SAA)
Farine de soja (15)	31	28	54	90	73	99	47	16	55	92	89 (SAA)	105 (SAA)
C. de pois (14,15)	19	24	44	76	67	97	38	9	49	92	62 (SAA)	73 (SAA)
Pois Chiche (23)	39	26	33	90	52	50	29	9	34	87	67 (Lys)	76 (Lys)
Fève (10,22,23)	27	31	35	85	63	77	39	8	48	80	55 (SAA)	60 (Leu)
Lentilles (23)	26	29	35	71	69	71	44	5	46	85	nd	58
Haricots noirs (6,24)	2	5	8	15	13	18	8	2	9	78	nd	49 (SAA)

H : Hydrolysate; I : Isolat; C: Concentré

1. Food and Drug Administration, 1993 ; 2. Wu et al., 2016 ; 3. Hodgkinson et al., 2018; 4. Ertl et al., 2016 ; 5. Bindari et al., 2018 ; 6. Hodgkinson et al., 2022 ; 7. Dalle Zotte et al., 2020 ; 8. Marinangeli & House, 2017 ; 9. Mahan & Shields, 1998 10. Herreman et al., 2020 ; 11. Attia et al., 2020 ; 12. Phillips, 2017 ; 13. Milan et al., 2020 ; 14. Liu et al., 2019 ; 15. Mathai et al., 2017 ; 16. Hou et al., 2019 ; 17. Abdel-Aal & Hucl, 2002 ; 18. Cervantes-Pahm et al., 2014 ; 19. de Vries-ten Have et al., 2020 ; 20. Han et al., 2019 ; 21. Khalid et al., 2016 ; 22. Han et al., 2020 ; 23. Grell et al., 2017 ; 24. Nosworthy et al., 2017.

4.2. Digestibilité de l'azote et des acides aminés

Au-delà de la composition en AAEs, il est important de prendre en compte la digestibilité de la protéine voire de chaque AA, afin de prédire la quantité d'AAs qui sera réellement disponible et utilisable par l'organisme. La digestibilité est définie comme étant la proportion de protéines (ou AAs) ingérées qui a été digérée et absorbée au niveau de l'épithélium intestinal, et qui est donc disponible pour être métabolisée par l'organisme. C'est l'indicateur qui permet d'estimer la biodisponibilité en azote et AAs (FAO, 2013 ; Stein et al., 2007 ; Gaudichon & Calvez, 2021).

Différentes méthodes existent pour déterminer la digestibilité des protéines. Les différences reposent sur le lieu d'échantillonnage du digesta, soit au niveau de l'iléon terminal, soit dans les fèces. La différence entre les deux types d'échantillons est due à la fermentation colique, qui modifie le profil en AAs (Hendriks et al., 2012) et conduit à une surestimation de la digestibilité (Fuller & Tomé, 2005). La mesure de la digestibilité au niveau iléal est reconnue comme étant plus précise que la mesure de la digestibilité au niveau fécal (Moughan, 2003 ; FAO, 2014); elle permet d'estimer l'absorption nette de l'azote ou des AAs par l'organisme.

Les échantillons peuvent être collectés de différentes manières au niveau de l'iléon, en fonction du modèle utilisé. Chez l'Homme, on peut utiliser une sonde naso-iléale insérée sous supervision médicale, ou, chez un individu iléostomisé, collecter les échantillons dans une poche d'iléostomie. Chez l'animal, les digestas peuvent être collectés après euthanasie à un temps postprandial donné (rat et porc), ou en continu (uniquement chez le porc) à l'aide d'une canule insérée chirurgicalement en fin d'iléon. Un marqueur doit dans ce cas être ajouté au repas ingéré afin de permettre l'extrapolation des concentrations mesurées dans le digesta à la quantité de repas ingérée, sauf dans le cas où la totalité des effluents est collectée. Le dioxyde de titane (TiO₂) est généralement utilisé comme marqueur de la phase solide, non digestible et non absorbable, dans les études de digestibilité animale (Jagger et al., 1992), comme le préconise la FAO (2014).

Les valeurs de digestibilité peuvent être exprimées sous la forme de digestibilité « apparente » ou « vraie » (Stein et al., 2007). La digestibilité apparente est définie comme la différence entre la quantité d'azote (ou AAs) ingérée et les pertes totales d'azote (ou AAs) dans l'intestin, sans distinction de leur origine (alimentaire ou endogène). Lorsqu'une correction est faite pour soustraire les pertes endogènes basales en azote (ou AAs), on parle alors de digestibilité « standardisée » (Stein et al., 2007) aussi appelée « digestibilité vraie » (true digestibility) en nutrition humaine (FAO, 2013). Les pertes endogènes basales en azote ou AAs peuvent être déterminées après administration d'un régime sans protéines, bien que ce régime soit reconnu comme sous-estimant les pertes, car elles ne prennent pas en compte les pertes endogènes spécifiques aux protéines testées. On parle également de digestibilité réelle (real digestibility) lorsque les protéines sont marquées avec des isotopes stables (Bandyopadhyay et al., 2022), permettant ainsi de prendre en compte les pertes endogènes basales et spécifiques.

La mesure de la digestibilité repose sur le flux d'AAs, exprimé en mg/100 g de repas ingéré, déterminé grâce à la concentration du marqueur (Eq. 6) :

$$\text{Flux iléal d'AA} = \frac{\text{AA}_{\text{digesta}} \times \text{Marqueur}_{\text{repas}}}{\text{Marqueur}_{\text{digesta}}} \quad [\text{Eq. 6}]$$

où $\text{AA}_{\text{digesta}}$ et $\text{Marqueur}_{\text{digesta}}$ font référence à la concentration d'AAs ou de marqueur dans le digesta (g/100 g de digesta) et le $\text{Marqueur}_{\text{repas}}$ à sa concentration dans le repas (g/100 g de repas).

Les digestibilités iléales apparente (DIA) et vraie (DIV) sont ensuite calculées selon les équations suivantes (Eq. 7 et 8) :

$$\text{DIA (\%)} = \frac{\text{AA ou N}_{\text{ingéré}} - \text{Perte iléale AA ou N}}{\text{AA ou N}_{\text{ingéré}}} \times 100 \quad [\text{Eq. 7}]$$

$$\text{DIV (\%)} = \frac{\text{AA ou N}_{\text{ingéré}} - (\text{Flux iléal total AA ou N} - \text{Perte iléale endogène AA ou N})}{\text{AA ou N}_{\text{ingéré}}} \times 100 \quad [\text{Eq. 8}]$$

De nombreuses études ont pu déterminer la digestibilité de l'azote et des AAs de divers aliments (Tableau 5 ; Hodgkinson et al., 2022 ; Cervantes-Pahm et al., 2014 ; Han et al., 2020). Une DIV supérieure à 90 % est rapportée pour les protéines de viande bovine (Silvester & Cummings, 1995 ; Oberli et al., 2015) et autour de 80 % pour le collagène et un hydrolysate de viande bovine (Hodgkinson et al., 2022 ; Bindari et al., 2018). Concernant les protéines végétales, la DIV est généralement inférieure à celle des protéines animales (Tableau 5), en particulier lorsqu'elles sont incluses dans leur matrice d'origine. Ceci s'explique par la présence des parois cellulaires, composées en partie de fibres encapsulant les protéines de la cellule végétale, mais également par la présence de facteurs antinutritionnels (Sathe, 2012).

Cependant, la digestibilité des protéines et des AAs varie selon la source de protéine (composition, structure), mais aussi selon l'aliment (matrice, traitements technologiques, pureté) et selon les individus (état physiologique et/ou pathologique, génétique) (Levesque et al., 2010 ; Millward et al., 2008 ; Tomé, 2013). L'effet « source » des protéines est lié à la variation de la disponibilité physique et chimique des protéines pour les processus digestifs/absorptifs, et à la concurrence de substances qui peuvent inhiber la digestion et/ou l'absorption (Loveday, 2019). Le fait que plus la fraction protéique est pure, plus la digestibilité des protéines et des AAs est élevée (Tomé, 2013), peut quant à lui s'expliquer par la plus grande accessibilité des protéines aux enzymes digestives pour un ingrédient protéique que pour une matrice avec des interactions moléculaires complexes. Avec l'âge, un déclin fonctionnel du tractus gastro-intestinal et la diminution des capacités de mastication peuvent affecter la digestion (Rémond et al., 2015).

4.3. Indices de la qualité nutritionnelle des protéines (PDCAAS, DIAAS)

Afin de définir la qualité nutritionnelle des protéines, il est nécessaire de prendre en compte les deux notions définies précédemment, à savoir le taux de couverture des besoins en AAes par la protéine alimentaire d'une part et la digestibilité de la protéine ou des AAs d'autre part. Le score initialement recommandé par la FAO, à savoir le PDCAAS (Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score) était calculé en corrigeant le score chimique (SC) par la digestibilité fécale vraie des protéines déterminée

chez le rat ; ce score était enfin tronqué à 100. Depuis 2013, la FAO préconise l'utilisation du DIAAS (Digestible Indispensable Amino Acid Score, Eq. 9) afin de pallier certaines limites du PDCAAS, en utilisant la digestibilité de l'AA limitant plutôt que la digestibilité globale de la protéine, en mesurant la digestibilité par ordre de préférence (1) chez l'homme, (2) chez le porc et (3) en dernier recours chez le rat, et en ne tronquant pas le score à 100 (FAO, 2013) :

$$\text{DIAAS} = (\text{SC de l'AAE limitant} \times \text{DIV de l'AAE limitant}) \times 100 \quad [\text{Eq. 9}]$$

La FAO (2013) propose ainsi de distinguer les sources protéiques d'excellente / haute qualité (DIAAS > 100) des sources de bonne qualité (99 > DIAAS > 75) ou de faible qualité (DIAAS < 75). De nombreuses études se sont attachées à déterminer le DIAAS de diverses sources protéiques selon les besoins des populations cibles (Tableau 5 ; Day et al., 2022 ; Adhikari et al., 2022 ; Herreman et al., 2020). Pour une même source protéique, le DIAAS est en effet plus faible pour les jeunes enfants (< 3 ans) que pour la population « enfant > 3 ans, adolescents, adultes », du fait du profil de référence en AAAs qui est plus exigeant (Tableaux 4 et 5). Comme la quasi-totalité des protéines animales, les protéines de viande se distinguent par leur richesse en AAAs, aucun n'étant limitant pour l'Homme, et par leur digestibilité élevée (Pereira & Vicente, 2013). Il en résulte des valeurs de DIAAS elles aussi élevées de l'ordre de 80 à 130 pour la viande de bœuf, contre 114 pour le lait de vache (97 à 144 pour les produits laitiers), 117 à 142 pour la viande de poulet, et 122 pour les œufs (Adhikari et al., 2022). En revanche, la moindre digestibilité des protéines végétales, combinée à des scores chimiques plus faibles, aboutit à des valeurs de DIAAS parfois très faibles, de l'ordre de 1* à 77 pour les céréales (*Céréales pour petit-déjeuner à base de maïs), 43 à 105 pour les légumineuses (Adhikari et al., 2022). Une partie des DIAAS de diverses sources protéiques ont été présentés dans le Tableau 5.

5. Besoin nutritionnel : cas des populations malnutries

La malnutrition est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme un état pathologique lié à une carence, un excès ou un déséquilibre dans l'apport énergétique et/ou nutritionnel d'une personne. Elle touche particulièrement les pays en développement dont l'Afrique (20 % de la population), l'Asie (9 %) et l'Amérique latine (8,6 %). Entre 702 millions et 828 millions de personnes ont souffert de la faim en 2021, soit respectivement 8,9 % et 10,5 % de la population mondiale (FAO et al., 2022 ; Figure 19). La lutte contre la malnutrition sous toutes ses formes est l'un des défis les plus importants pour la santé mondiale, pertinente pour plusieurs des objectifs de développement durable. Elle se traduit au travers de l'objectif « Faim zéro » des Nations Unies, qui vise à « éradiquer la faim, assurer la sécurité alimentaire, améliorer la nutrition et promouvoir une agriculture durable » (FAO et al., 2022).

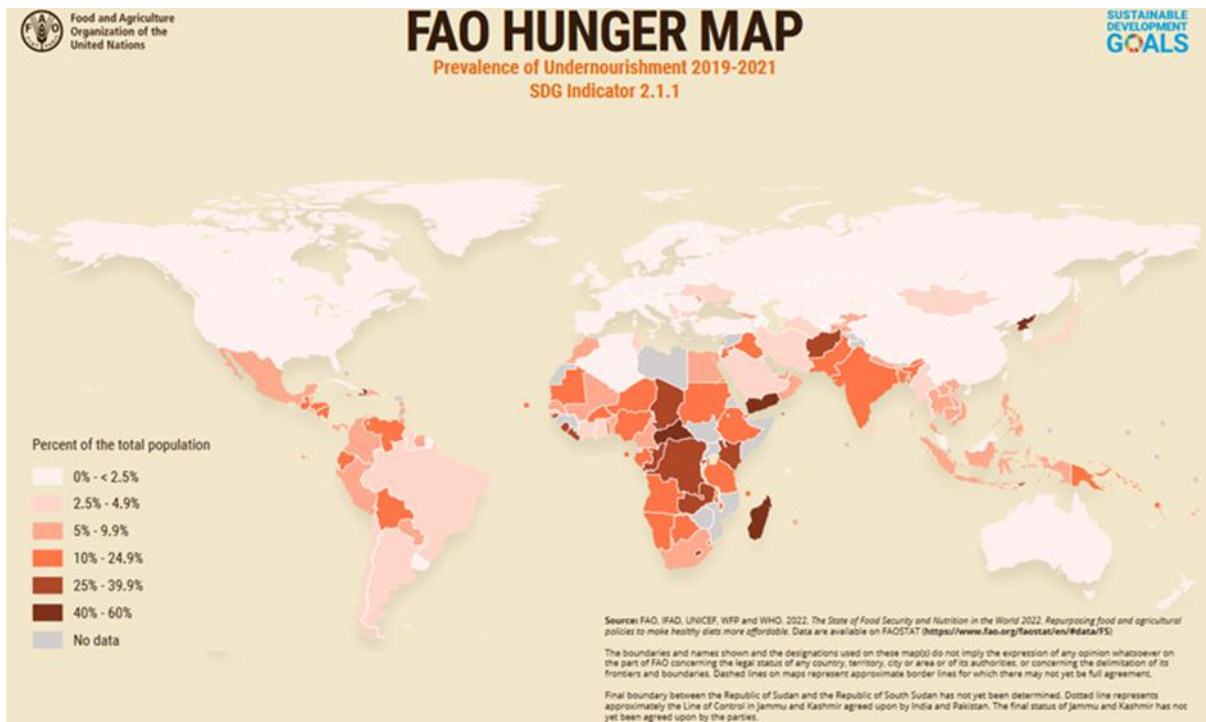


Figure 19: Prévalence de la sous-alimentation dans le monde 2019-2021 (FAO et al., 2022)

La malnutrition protéino-énergétique est définie comme étant le résultat d'un déséquilibre entre les apports et les besoins protéino-énergétiques de l'organisme. Ce déséquilibre entraîne des pertes tissulaires (perte de poids > 10 % en moins de six mois) ayant des conséquences fonctionnelles délétères (retard de croissance-rachitisme, sarcopénie). Elle peut engendrer des effets néfastes sur le développement physique, mental et la cognition des enfants (Grantham-McGregor, 1995 ; Kar et al., 2008), mais aussi chez les personnes âgées (Rémond et al., 2015).

5.1. Les enfants

De nombreux enfants dans le monde sont encore soumis à une sous-alimentation chronique en calories et/ou en protéines. Ces enfants souffrent alors de « malnutrition aiguë sévère » (MAS), terme qui a remplacé celui de « malnutrition protéino-énergétique » (Bhutta et al., 2017). Les conséquences sont une émaciation sévère et/ou la maladie de kwashiorkor. Le kwashiorkor est supposé être associé à une réponse métabolique inadaptée ; un régime riche en glucides et pauvre en protéines entraînerait une réponse glycolytique continue et un catabolisme protéique insuffisant pour répondre aux besoins en AAs nécessaires en phase post-absorptive (Bhutta et al., 2017). Le niveau de catabolisme protéique serait plus faible chez les enfants atteints de kwashiorkor que chez les enfants souffrant d'émaciation sévère et chez ceux en état de rétablissement (Jahoor et al., 2008; Jahoor et al., 2005).

La MAS touche principalement les enfants d'Afrique. En effet, leur régime alimentaire traditionnel est majoritairement basé sur les céréales (riz, blé, maïs, sorgho, millet), les racines et les tubercules (manioc) et est ainsi pauvre en énergie, protéines et autres micronutriments essentiels pour le métabolisme et la croissance (Eaton et al., 2019). La faible digestibilité des protéines de ce type de régime, comme par

exemple le millet ou le sorgho (Tableau 5), contribue à cette malnutrition (Millward, 1999). De plus, le profil en AAEs de ces protéines végétales ne permet pas de couvrir les besoins des enfants. Ainsi, le maïs, qui est la principale source énergétique dans la plupart des pays d'Afrique subsaharienne, est limitant en lysine et tryptophane (Tableau 5 ; Nuss & Tanumihardjo, 2011).

Afin de pallier ces carences nutritionnelles, des aliments thérapeutiques ont été développés afin de couvrir les besoins en énergie et en nutriments des jeunes enfants (de Pee & Bloem, 2009). Le Programme Alimentaire Mondial (PAM) fournit des aliments thérapeutiques prêts à l'emploi (RUTF-Ready-to-Use Therapeutic Foods, tels que Plumpy'nut® de la société Nutriset, à base d'arachide) et des formules lactées (F-75 et F-100, Nutriset), conçus pour la stabilisation et la réhabilitation nutritionnelle et métabolique des enfants atteints de MAS. Il est également possible de faire de la prévention en enrichissant l'alimentation traditionnelle en protéines, en se basant sur les apports recommandés en protéines (2,82 g/kg/j) et en AAEs établis par la FAO pour les enfants malnutris (FAO, 2018a)(Tableau 6).

Tableau 6: Profil de référence en acides aminés essentiels (AAEs), besoin en protéines et en AAEs des enfants malnutris de 6 mois à 5 ans (gain de poids cible de 10 g/kg/j, FAO, 2018a).

AA pattern (mg/g Protein)	His	Ile	Leu	Lys	SAA*	AAA*	Thr	Trp	Val
Maintenance	15	30	59	45	22	38	23	6	39
Tissue	27	35	75	73	35	73	42	12	49

Requirement	Protein (g/kg/d) ^a	Amino acid (mg/kg/d) ^(b)								
		His	Ile	Leu	Lys	SAA	AAA	Thr	Trp	Val
Maintenance	0.82	12	25	48	37	18	31	19	5	32
Growth	2.00	54	70	150	146	70	146	84	24	98
Total requirement	2.82	66	95	198	183	88	177	103	29	130

^a Target protein requirement to achieve a catch-up weight gain of 10 g/kg/d is calculated by considering a compositional weight gain of 73:27, lean/fat equivalent to 14% protein and 27% fat, 14% deposited tissue adjusted for a 70% efficiency of utilization, and a safe level of maintenance at 1.24x0.66 g/kg/d = 0.82, with 0.66 g/kg/d being the adult maintenance protein needs.

^b The amino acid requirement for catch-up growth was factorially derived (Table 3) from the maintenance (0.82 g/kg/d) and growth requirement (2.0 g/kg/d), related to adult maintenance amino acid pattern, and tissue amino acid pattern, respectively.

*SAA = sulphur amino acids (methionine + cysteine), AAA = aromatic amino acids (phenylalanine + tyrosine)

Il a été montré dans plusieurs études qu'une supplémentation en protéines animales pourrait combler efficacement les déficits nutritionnels dus à la consommation d'aliments de base, d'origine végétale et de faible qualité du point de vue protéique (de Vries-ten Have et al., 2020 ; Hsu et al., 2014), favorisant ainsi la croissance et le développement de ces enfants (Neumann et al., 2007 ; Eaton et al., 2019). La viande de bœuf a notamment été envisagée dans ce cadre (Neumann et al., 2014 ; An et al., 2019). Cependant, des barrières sanitaires, culturelles, financières et religieuses limitent la consommation d'aliments d'origine animale par les enfants, en particulier dans les pays à revenu faible ou intermédiaire (Balehegn et al., 2019). Ainsi, afin d'augmenter la consommation d'aliments d'origine animale par les enfants vulnérables dans ces pays, diverses stratégies doivent être mises en place (Neumann et al., 2014). Le développement de nouveaux ingrédients à base de co-produits de la viande pourrait partiellement répondre à ces exigences (Anzani et al., 2020).

5.2. Les personnes âgées

La malnutrition protéino-énergétique touche également les personnes âgées de plus de 65 ans dans les pays développés (van der Pols-Vijlbrief et al., 2014). Cette prévalence est amenée à augmenter durant les prochaines années avec l'augmentation attendue du vieillissement de la population mondiale (United Nations et al., 2019).

La malnutrition protéino-énergétique peut être en partie induite chez la population sénior par un déclin fonctionnel du tractus gastro-intestinal avec l'âge (Rémond et al., 2015). On observerait pour cette population âgée un ralentissement de la vitesse de vidange gastrique, un pH gastrique plus élevé, une quantité de sécrétions et donc des activités enzymatiques gastriques et intestinales réduites et une concentration en sels biliaires plus faible (Menard et al., 2023). Et même si l'activité des protéases dans l'intestin grêle demeure suffisante pour assurer une bonne digestion des protéines chez les personnes âgées, un ensemble de petits changements comme la diminution des capacités de mastication affecte la digestion des aliments, augmentant ainsi le risque de malnutrition lors du vieillissement (Rémond et al., 2015 ; Dardevet et al., 2021). Les troubles de la déglutition ou dysphagie rendent également pénible la prise alimentaire et peuvent entraîner une baisse d'appétit et/ou de la consommation alimentaire. La perte de dents modifie le choix des aliments, avec notamment une réduction des aliments difficiles à mâcher tels que certains morceaux de viande (Struijk et al., 2018). Il a également été établi qu'au cours du vieillissement, le muscle devient moins sensible à l'effet stimulateur de la leucine sur la synthèse protéique, ce qui pourrait en partie expliquer la fonte musculaire observée au cours du vieillissement et pouvant aboutir à la sarcopénie (Dardevet et al., 2000). Une supplémentation en leucine pourrait jouer un rôle dans la prévention de la sarcopénie (Elango et al., 2016), ce qui a conduit à réévaluer les besoins en leucine des personnes âgées (Szwiega et al., 2021).

Ainsi, une augmentation de l'apport en protéines alimentaires est nécessaire avec l'âge. Des études ont suggéré que les besoins en protéines des personnes âgées pourraient être plus élevés (1g/kg pc/j) que pour la population adulte « standard », (Nowson & O'Connell, 2015 ; Anses, 2019), bien que la FAO (2013) ne fasse pas de distinction entre les personnes âgées et les adultes (0,83g/kg pc/j). De plus, la supplémentation en plusieurs AAÉs, dont l'histidine, la lysine, la thréonine, aurait un effet bénéfique sur la santé pour retarder le vieillissement (Canfield & Bradshaw, 2019). Cependant à ce jour aucun profil de référence en AAÉs n'a été établi spécifiquement pour les personnes âgées ; le profil pour cette population reste donc le même que pour les adultes.

Afin de faciliter la prise alimentaire et de lutter contre la fonte musculaire (sarcopénie), des stratégies nutritionnelles ont été développées (Dardevet et al., 2021). Une attention particulière est apportée à la texture des aliments (Aguilera & Park, 2016), leur concentration en protéines et AAÉs, et/ou l'utilisation de protéines rapidement digérées, visant à maximiser l'augmentation de l'amino-acidémie postprandiale. La viande pourrait, dans cette stratégie nutritionnelle, constituer un aliment très intéressant en raison de sa richesse en protéines rapidement digestibles (lors d'une cuisson à 75 °C), ce qui permet d'apporter une quantité importante de protéines en un seul repas (Rémond, 2019 ;

Santé-Lhoutellier et al., 2017). De nombreuses études se sont pour cette raison intéressées aux protéines de viande (en particulier de bœuf), et aux moyens de maximiser leur efficacité nutritionnelle. Ainsi, il a été montré que la viande de bœuf sous forme émincée est plus rapidement digérée et absorbée que sous forme d'un steak, et permet une meilleure rétention protéique postprandiale chez les hommes âgés (Pennings et al., 2013). L'enrichissement en protéines de bœuf de galettes de riz et de lentilles permettrait d'améliorer les propriétés sensorielles (texture plus moelleuse) des produits (Baugreet et al., 2017). Par ailleurs, le niveau de cuisson de la viande s'avère également important pour cette classe de population spécifique : une cuisson « à point » induit une synthèse protéique postprandiale plus importante qu'une cuisson « saignante » (Buffière et al., 2017).

Chapitre 2

Caractérisation physique des poudres WRP et GGRP

1. Introduction

Il existe une grande diversité parmi les poudres entrant dans la fabrication des produits alimentaires (des ingrédients aux produits finis), toutes possédant des caractéristiques physiques qui leur sont propres, liées notamment à leur procédé de fabrication. Or, il est essentiel de connaître ces propriétés et notamment les propriétés d'écoulement et de réhydratation, afin de maîtriser la mise en œuvre des poudres dans la fabrication de divers produits alimentaires. Toutes les propriétés physiques des poudres constituent les critères d'appréciation de leur qualité et sont évaluées selon des méthodes normalisées au niveau international (ISO 13320, EN 15051-3, EN ISO 3923-1 ...). De nombreux ouvrages et revues ont répertorié les différentes méthodes analytiques applicables aux poudres alimentaires et les facteurs modulant leurs caractéristiques (Barbosa-Cánovas et al., 2005 ; Juliano & Barbosa-Cánovas, 2010; Schuck et al., 2012). Parmi les caractéristiques physiques des poudres, la taille des particules est l'une des plus importantes, car elle peut être étroitement liée à d'autres propriétés physiques et fonctionnelles (densité, fluidité, solubilité, mouillabilité).

La qualité des poudres dépend de nombreux facteurs, dont la qualité du produit avant séchage (composition et caractéristiques physicochimiques, viscosité, composants thermosensibles et activité de l'eau ...), les conditions de séchage (type de sécheur, pression, agglomération, paramètres thermodynamiques, vitesse et température de l'air de séchage...) et les conditions de stockage après séchage (température, hygrométrie...) (Juliano & Barbosa-Cánovas, 2010 ; Schuck et al., 2012).

Ce chapitre présente les propriétés physiques des deux ingrédients protéiques WRP et GGRP. Leur caractérisation à l'état déshydraté et réhydraté était une étape préalable indispensable à la formulation de recommandations pour leur mise en œuvre. Le comportement des poudres est en effet un élément déterminant pour l'expression des propriétés techno-fonctionnelles qui font l'objet du chapitre suivant.

2. Matériels et méthodes

2.1. Granulométrie, Ecoulement et Eboulement

2.1.1. Granulométrie

La distribution granulométrique des poudres a été déterminée à l'aide d'un granulomètre à diffusion laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Malvern, Royaume-Uni) avec une cellule de mesure de 300 nm (gamme de 0,5 à 880 nm) en canal sec. L'indice de réfraction des particules sèches était de 1,52 (par défaut) et une pression d'air de 30 kPa a été utilisée. Une petite quantité de poudre était introduite dans la cellule de mesure de l'appareil, afin d'obtenir un noircissement/une obscurité de 10 %.

La distribution granulométrique des poudres en solution dans de l'eau (10 %) a été déterminée à l'aide du même granulomètre à diffusion laser en canal liquide. L'indice de réfraction utilisé était de 1,52 (par défaut) pour les poudres et de 1,33 pour l'eau. Une petite quantité (0,05 à 0,1 ml) de solution était introduite dans la cellule de mesure de l'appareil contenant de l'eau ultra pure (100 ml), afin d'obtenir un noircissement/une obscurité de 10 %. Les solutions diluées étaient libérées à un débit constant et faible d'environ 1 ml.min⁻¹.

Les distributions typiques de la taille des particules ont été rapportées au travers de trois paramètres qui sont le diamètre médian $d(0,5)$, le mode et le $d_{4,3}$. Le $d(0,5)$ représente le diamètre des particules en dessous duquel on a 50 % du volume de matière. Le mode est le diamètre de particules le plus fréquent dans la distribution volumique (sommets). Le $d_{4,3}$ est le diamètre volumique moyen de la distribution (Eq. 10) :

$$d_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad [\text{Eq. 10}]$$

avec n_i le nombre de particules de diamètre d_i

Les mesures ont été réalisées en triple pour chaque échantillon (poudre et solution).

2.1.2. Indice d'écoulement (fluidité)

Les caractéristiques d'écoulement des ingrédients secs ont été mesurées à l'aide du Powder tester PT-X (Hosokawa Micron, basé sur les recherches de Carr, 1965) selon le protocole décrit par Schuck et al. (2012) (Figure 20). L'indice d'écoulement reflète l'aptitude d'une poudre à s'écouler dans des conditions données en mesurant les quatre paramètres que sont l'angle de talus, l'angle de spatule, la compressibilité, et le coefficient d'uniformité.

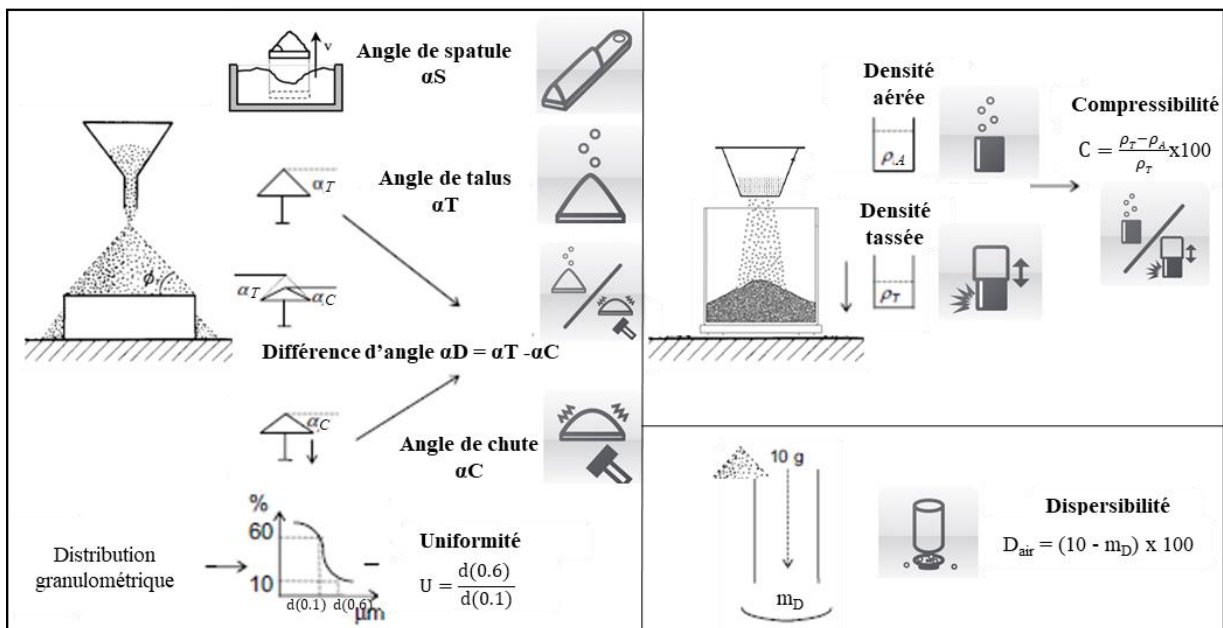


Figure 20: Principe des mesures réalisées à l'aide du Powder tester (adapté de Schuck et al., 2012)

2.1.2.1. Angle de talus

L'angle de talus (α_T) a été mesuré suite à l'accumulation de la poudre sur une plateforme en un tas de forme conique, déversé par un entonnoir. Le produit resté sur la plateforme formant un angle (entre l'horizontale et le sommet du tas) correspondait à α_T .

2.1.2.2. Compressibilité

La compressibilité d'une poudre a été déterminée en mesurant la densité aériée (apparente, ρ_A) et la densité tassée (ρ_T). Pour cela, le produit s'écoulait par un cône et tombait dans un récipient. Lorsque la poudre débordait du récipient, le surplus présent à la surface a été enlevé, puis le récipient a été pesé

avec la poudre qu'il contenait (densité aérée). La densité tassée a été mesurée après un cycle de tassement de 180 s, obtenu par des secousses successives.

$$\text{Compressibilité (\%)} = \frac{\text{densité tassée } (\rho T) - \text{densité aérée (apparente, } \rho A)}{\text{masse volumique tassée } (\rho T)} \times 100 \quad [\text{Eq. 11}]$$

Avec la densité tassée et apparente exprimé en (g/m^3)

2.1.2.3. Angle de spatule

Une spatule a été introduite dans un volume de poudre suffisant pour la recouvrir entièrement, puis a été levée. Le produit resté sur la spatule forme un angle (entre l'horizontale et le sommet du tas). L'angle a été de nouveau mesuré après avoir appliqué un impact (secousse). L'angle de spatule (α_S) correspondait à la moyenne des 2 angles, avant et après impact/secousse.

2.1.2.4. Coefficient d'uniformité

La distribution granulométrique de la poudre, telle que décrit en 2.1.1., a permis de définir le coefficient d'uniformité à partir de la granulométrie avec 60 % de passant d(0,6) et de la granulométrie avec 10 % de passant d(0,1). d(0,6) et d(0,1) correspondaient aux diamètres des particules en dessous desquels 60 et 10 % du volume de matière sont obtenues, respectivement.

$$U = \frac{\text{Granulométrie d(0.6)}}{\text{Granulométrie d(0.1)}} \quad [\text{Eq. 12}]$$

2.1.2.5. Calcul de l'indice d'écoulement

À chacune des quatre valeurs mesurées, une note comprise entre 0 et 25 points était affectée selon la répartition définie par Schuck et al. (2012) (Tableau 7). La somme des quatre notes permettait d'obtenir l'indice d'écoulement / de fluidité, compris entre 0 et 100. Les analyses ont été réalisées en triplicat.

Tableau 7: Nombre de point pour l'évaluation de l'indice d'écoulement, Schuck et al. (2012).

Angle de talus		Compressibilité		Angle de spatule		Coefficient d'uniformité		Coefficient de cohésion		Écoulement Fluidité	Appréciation	
Degrés	Points	%	Points	Degrés	Points	–	Points	%	Points	Indice		
< 25	25	5	25	25	25	1	25			90-100	Très bon	
26-29	24	6-9	23	26-30	23	2-4	23					
30	22,5	10	22,5	31	22,5	5	22,5					
31	22	11	22	32	22	6	22			80-89	Bon	
32-34	21	12-14	21	33-37	21	7	21					
35	20	15	20	38	20	8	20				70-79	Assez bon
36	19,5	16	19,5	39	19,5	9	19,5					
37-39	18	17-19	18	40-44	18	10-11	18					
40	17,5	20	17,5	45	17,5	12	17,5				60-69	Normal
41	17	21	17	46	17	13	17					
42-44	16	22-24	16	47-59	16	15-16	16				40-59	Pas bon
45	15	25	15	60	15	17	15	< 6	15			
46	14,5	26	14,5	61	14,5	18	14,5	6-9	14,5			
47-54	12	27-30	12	62-74	12	19-21	12	10-29	12		20-39	Mauvais
55	10	31	10	75	10	22	10	30	10			
56	9,5	32	9,5	76	9,5	23	9,5	31	9,5			
57-64	7	33-36	7	77-89	7	24-26	7	32-54	7		0-19	Très mauvais
65	5	37	5	90	5	27	5	55	5			
66	4,5	38	4,5	91	4,5	28	4,5	56	4,5			
67-89	2	39-45	2	92-99	2	29-35	2	57-79	2		90	0
90	0	> 45	0	> 99	0	> 35	0	> 79	0			

2.1.3. Indice d'éboulement (déferlement)

Les caractéristiques d'éboulement ont également été mesurées à l'aide du Power tester PT-X (Figure 20). L'indice d'éboulement permet d'apprécier le comportement d'un produit pulvérulent en vrac lorsque, partant d'un état initial au repos, on le met en mouvement. Cet indice est calculé en mesurant les trois paramètres que sont l'angle de chute, la différence d'angle, et la dispersibilité dans l'air.

2.1.3.1. Angle de chute

Après avoir mesuré l'angle de talus (section 2.1.2), trois impacts (secousses) ont été appliqués, modifiant l'angle de talus. Ce nouvel angle, mesuré entre l'horizontale et le sommet du tas, correspond à l'angle de chute (α_C).

2.1.3.2. Différence d'angle

La différence entre l'angle de talus et l'angle de chute est appelée différence d'angle (α_D).

2.1.3.3. Dispersibilité dans l'air

La dispersibilité dans l'air (D_{air}) a été évaluée en laissant tomber d'une hauteur de 65 cm 10 g de poudre à travers un tube cylindrique. Puis la quantité de poudre récupérée (m_D) dans la coupelle préalablement déposée en dessous a été pesée.

$$D_{\text{air}} = (10 - m_D) \times 100 \quad [\text{Eq. 13}]$$

2.1.3.4. Calcul de l'indice d'éboulement

À chacune des trois valeurs mesurées, une note comprise entre 0 et 25 points était affectée selon la répartition définie par Schuck et al. (2012) (Tableau 8), de même qu'à l'indice de fluidité défini en section 2.1.2. La somme des quatre notes permettait d'obtenir l'indice d'éboulement / de déferlement, compris entre 0 et 100. Les analyses ont été réalisées en triplicat.

Tableau 8: Nombre de points pour l'évaluation de l'indice d'éboulement, Schuck et al. (2012).

Écoulement Fluidité		Angle de chute		Angle de différence		Dispersibilité		Éboulement Déferlement	Appréciation
Indice	Points	Degrés	Points	Degrés	Points	%	Points	Indice	
> 60	25	< 10	25	> 30	25	> 50	25	80-100	Très forte tendance
59-56	24	11-19	24	29-28	24	49-44	24	60-79	
55	22,5	20	22,5	27	22,5	43	22,5		
54	22	21	22	26	22	42	22		
53-50	21	22-24	21	25	21	41-36	21		
49	20	25	20	24	20	35	20		Assez forte tendance
48	19,5	26	19,5	23	19,5	34	19,5		
47-45	18	27-29	18	22-20	18	33-29	18		
44	17,5	30	17,5	19	17,5	28	17,5		
43	17	31	17	18	17	27	17	40-59	
42-40	16	32-39	16	17-16	16	26-21	16		
39	15	40	15	15	15	20	15		
38	14,5	41	14,5	14	14,5	19	14,5		
37-34	12	42-49	12	13-11	12	18-11	12		Tendance existante
33	10	50	10	10	10	10	10		
32	9,5	51	9,5	9	9,5	9	9,5	25-39	
31-29	8	52-56	8	8	8	8	8		
28	6,25	57	6,25	7	6,25	7	6,25		
27	6	58	6	6	6	6	6		
26-23	3	59-64	3	5-1	3	5-1	3		
< 23	0	> 64	0	0	0	0	0	Tendance nulle	

2.2. Capacité de réhydratation

La capacité de réhydratation d'une poudre est définie par sa mouillabilité, sa dispersibilité et sa solubilité dans l'eau. Ces trois paramètres ont été mesurés selon des protocoles adaptés de ceux applicables aux poudres laitières (Idf, 1979 ; ISO 8156:2005), tels que décrit par Schuck et al. (2012).

2.2.1. Indice de mouillabilité

L'indice de mouillabilité correspond au temps nécessaire à une quantité donnée de poudre pour pénétrer dans l'eau à travers sa surface libre au repos. Le temps nécessaire pour déterminer le mouillage et l'immersion de 10 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée (40 ± 1 °C) a été mesuré et défini ici comme l'indice de mouillabilité. Cette mesure a été réalisée en double.

2.2.2. Indice de dispersibilité

L'indice de dispersibilité correspond à la quantité de matière sèche (en %) capable de traverser un tamis de taille d'ouverture de maille 210 μm après agitation dans l'eau pendant 15 s. Elle a été déterminée à partir de 10 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée à 40 ± 1 °C. Cette mesure a été réalisée en double..

2.2.3. Indice de solubilité

L'indice de solubilité a été déterminé en évaluant l'indice d'insolubilité de la poudre. Pour cela, 10 g de poudre ont été ajoutés à 100 g d'eau distillée (40 ± 1 °C), mélangés dans un mixeur (Waring Blender) pendant 90 s à 3800 - 4000 tr/min, puis centrifugés à 160g pendant 5 minutes à 20 °C. La masse du culot (g) a été déterminée après le passage dans une étuve pendant 24 h à 100 °C, afin de calculer l'indice d'insolubilité de la poudre (masse culot/masse initiale, exprimé en %), puis l'indice de solubilité ($100 - \text{indice d'insolubilité en \%}$). Cette mesure a été réalisée en double.

2.3. Analyses statistiques

Chacune des caractéristiques physiques des poudres WRP et GGRP a été soumise à une comparaison des moyennes (test t de Student) avec un niveau de signification fixé à $p < 0,05$, à l'aide du logiciel R (version 4.0.3). Tous les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart-type.

Une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée avec les poudres WRP et GGRP et dix autres poudres alimentaires de propriétés connues Schuck et al. (2012), pour mettre en évidence les corrélations entre les propriétés physiques des ingrédients protéiques. L'ACP a été réalisée à l'aide du package FactoMineR du logiciel R (version 4.0.3) (Lê et al., 2008). Les variables ont été standardisées automatiquement (moyenne centrée et réduite) par le logiciel pour donner à toutes la même importance. Une Analyse de Classification Hiérarchique (ACH) a été réalisée pour mettre en évidence les similitudes entre les poudres. Cette méthode d'analyse statistique crée des clusters d'individus (poudres) semblables en maximisant les différences inter-clusters et en minimisant celles intra-clusters. L'ACH a été réalisée sur les résultats de l'ACP, en appliquant la méthode de Ward pour le regroupement hiérarchique avec la distance euclidienne comme mesure de similarité.

3. Résultats et discussion

3.1. Des tailles de particules élevées et hétérogènes

Les profils des distributions granulométriques des poudres (en voie sèche) et des poudres en solution dans l'eau (voie liquide) sont présentés Figure 21. Les paramètres extraits de ces profils sont résumés Tableau 9.

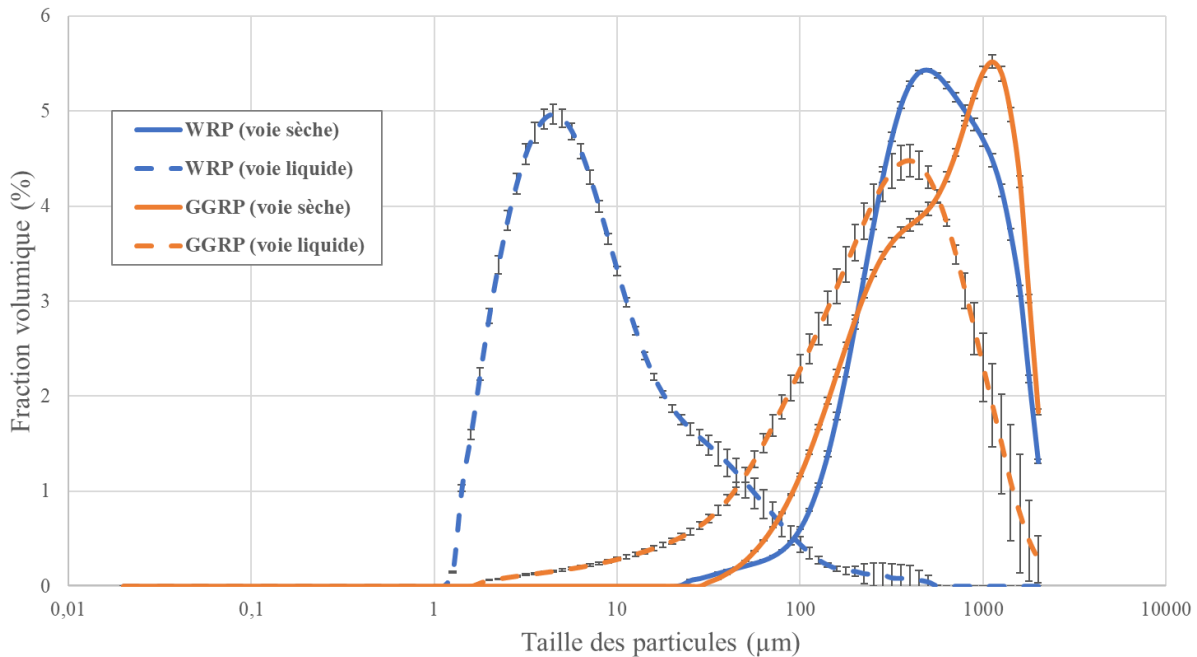


Figure 21: Distributions granulométriques des poudres WRP et GGRP en voies sèche et liquide

Tableau 9: Caractéristiques granulométriques des poudres en voies sèche et liquide

	WRP		GGRP		<i>p</i> -values	
	voie sèche	voie liquide	voie sèche	voie liquide	voie sèche	voie liquide
d(0,5) (µm)	495,03 ± 6,13	5,89 ± 0,17	553,34 ± 6,49	265,74 ± 20,37	< 0,001	< 0,001
Mode (µm)	460,68 ± 11,0	4,24 ± 0,05	1070,15 ± 6,64	370,60 ± 11,62	< 0,001	< 0,001
d _{4,3} (µm)	617,56 ± 5,05	15,60 ± 3,04	667,53 ± 4,04	364,65 ± 41,43	< 0,001	< 0,001

Les poudres WRP et GGRP présentent toutes les deux des distributions granulométriques larges (de l'ordre de 100 µm, Figure 21), comme c'est le cas pour la plupart des poudres alimentaires (Schuck et al., 2012). De plus, le diamètre médian (d(0,5)) des particules mesuré en voie sèche est élevé pour les deux poudres, même s'il est significativement plus faible pour la poudre WRP (495,03 µm) que pour la poudre GGRP (553,34 µm) (Tableau 9). Ces valeurs suggèrent la présence d'agglomérats, explicables par les procédés de séchage mis en œuvre, à savoir le séchage sur cylindre chauffant (pour WRP) et le séchage par tambour rotatif (pour GGRP) (voir § Production des ingrédients protéiques ; Mujumdar, 2014). Les profils granulométriques en voie sèche mettent même en évidence la présence de quelques particules de taille supérieure à 2 mm, qui n'ont donc pas pu être quantifiées du fait des limites techniques de la méthode. Par ailleurs, les distributions granulométriques des deux poudres s'avèrent non normales, ce qui se traduit par une valeur de mode légèrement inférieure au diamètre médian dans

le cas de la poudre WRP (460,68 vs. 495,03 μm), et très supérieure dans le cas de la poudre GGRP (1070,15 vs. 553,34 μm).

En solution dans l'eau (voie liquide), les distributions granulométriques des deux poudres se déplacent vers les valeurs basses de taille des particules, pour atteindre un diamètre médian de 264,74 μm pour GGRP, et seulement 5,89 μm pour WRP (Tableau 9). La diminution est ainsi d'un facteur 2 pour GGRP, mais d'un facteur 84 pour WRP. Les valeurs de mode et de diamètre volumique moyen ($d_{4,3}$) sont également diminuées en voie liquide par rapport à la voie sèche (Tableau 9). Ces résultats suggèrent une solubilisation bien supérieure pour la poudre WRP par rapport à la poudre GGRP.

En comparaison à d'autres poudres alimentaires (résumé dans le Tableau 12), on constate que les poudres WRP et GGRP ont des tailles de particules très élevées. A titre d'exemple, le $d(0,5)$ d'une caséine micellaire est de l'ordre de 287 μm et celui d'une poudre de gélatine de 183 μm (Schuck et al., 2012). Cette différence est très probablement due au procédé de séchage dont on sait qu'il joue un rôle déterminant sur la taille des particules des poudres. En particulier, le séchage par atomisation utilisé pour la fabrication de la plupart des poudres laitières (Barbosa-Cánovas et al., 2005), produit des particules de taille beaucoup plus faible que le séchage sur cylindre chauffant (séchage par ébullition, 157 °C) utilisé pour la poudre WRP, ou le séchage par séchoir rotatif à tambour (séchage par entraînement, 102 °C) utilisé pour la poudre GGRP (Schuck et al., 2012). De plus, la granulométrie dépend également du type de broyage effectué tel que l'écrasement-friction (meules), la compression-cisaillement (broyeur à cylindres) ou par impact (broyeur à marteaux) (Melcion, 2000).

3.2. Faible écoulement et tendance à l'éboulement des poudres WRP et GGRP

L'indice d'écoulement et l'indice d'éboulement des poudres WRP et GGRP, ainsi que les différents paramètres qui permettent de calculer ces deux indices sont présentés dans le Tableau 10 (*donnée supplémentaire*, Tableau S1).

3.2.1. Angle de talus élevée pour les poudres WRP et GGRP

L'angle de talus est un bon indicateur de la fluidité potentielle du produit : plus il est faible, plus le produit est fluide. Avec des angles de talus de respectivement 51,4 et 54,6° (Tableau 10A), les poudres WRP et GGRP se voient attribuer une note moyenne de 12 points sur 25 pour ce critère (Tableau 10B). Les deux poudres ont ainsi un angle de talus compris entre 47 et 54° qui correspond au seuil classiquement admis pour « pas bon » (Tableau 7). L'angle de talus dépend de la forme des particules, de leur distribution granulométrique, de leur porosité et de leur cohésion (Schuck et al., 2012). Une poudre est considérée comme cohésive lorsque les forces inter-particulaires attractives l'emportent sur le poids des particule, ce qui a tendance à produire une structure ouverte stable, soutenue par les forces inter-particulaires (Micha, 2011). L'angle de talus élevé des poudres WRP et GGRP pourrait être lié à des particules non sphériques ou de forme irrégulière, une porosité et une cohésivité élevées (Yamane et al., 1998 ; Juliano & Barbosa-Cánovas, 2010).

Tableau 10: Propriétés physiques des poudres WRP et GGRP. (A) Valeurs expérimentales. (B) Transposition en points et interprétation d'après les grilles des Tableaux 7 et 8.

A	WRP	GGRP	p-values
Angle de talus (°)	51,43 ± 2,18	54,60 ± 0,79	0,08
Densité aérée (apparente, kg/m ³)	283 ± 0,0	404 ± 0,0	< 0,001
Densité tassée (kg/m ³)	397 ± 0,0	765 ± 0,0	< 0,001
Compressibilité (%)	28,69 ± 0,37	47,16 ± 0,45	< 0,001
Angle de spatule (°)	72,22 ± 1,96	78,87 ± 3,07	0,03
Coefficient d'Uniformité (sans unité)	3,54 ± 0,0	5,11 ± 0,07	< 0,001
Angle de chute (°)	43,10 ± 4,00	49,23 ± 1,18	0,06
Différence d'angle/dénivelé (°)	8,33 ± 1,86	5,37 ± 0,93	0,07
Dispersibilité (%)	11,00 ± 2,19	7,83 ± 0,29	0,07

B	Score		Interprétation	
	WRP	GGRP	WRP	GGRP
Angle de talus	12	12		Pas bon
Compressibilité	12	0	Pas bon	Très Mauvais
Angle de spatule	12	7	Pas bon	Mauvais
Coefficient d'Uniformité	23	22,5		Très bon
Indice d'Écoulement	59	41,5		Pas bon
Indice d'écoulement	24	16	Très forte tendance	Assez forte tendance
Angle de chute	12	12		Tendance existante
Différence d'angle	8	3	Faible tendance	Tendance nulle
Dispersibilité	12	8	Tendance existante	Faible tendance
Indice d'Éboulement	56	39	Tendance existante	Faible tendance

3.2.2. Compressibilité de la poudre GGRP supérieure à celle de la poudre WRP

En terme de densité aérée (apparente, avant tassement), la poudre WRP affiche une valeur faible de 280 kg/m³ (Tableau 10A), similaire à celle rapportée pour le sel en poudre (Barbosa-Cánovas et al., 2005). Cette faible masse volumique résulte probablement du fait que le WRP est séché sur cylindres chauffants qui ont tendance à former des particules de forme irrégulière (Schuck et al., 2012). Le GGRP présente une densité apparente nettement plus élevée d'environ 400 kg/m³ (Tableau 10A), se rapprochant du lait en poudre. Les valeurs de densité aérée de WRP et GGRP sont toutefois dans la gamme des valeurs observées pour la majorité des poudres alimentaires, comprises entre 300 et 800 kg/m³ (Barbosa-Cánovas et al., 2005 ; Schuck et al., 2012). La densité aérée d'une poudre est déterminée par sa composition chimique et la densité réelle de chaque composant. Mais elle est également influencée par les caractéristiques de la poudre telles que la répartition granulométrique des particules et l'humidité résiduelle. En effet, la densité aérée des poudres alimentaires diminue avec une augmentation de l'humidité (Barbosa-Cánovas et al., 2005). La porosité est également directement liée à la densité aérée, puisqu'elle indique la fraction volumique de l'espace vide ou de l'espace aérien à l'intérieur d'une poudre. Ainsi, lorsque la porosité diminue, la densité apparente augmente (Barbosa-Cánovas et al., 2005).

Après tassement, la densité des poudres n'augmente que d'un facteur 1,4 pour WRP, et 1,9 pour GGRP, ce qui correspond à des taux de compressibilité inférieur à 30 % pour WRP et supérieur à 45 % pour GGRP (Tableau 10A). Les notes attribuées à ces deux poudres sur ce critère sont donc respectivement de 12 et 0 points sur 25 (Tableau 10B). En effet, plus un produit est compressible, moins il est fluide, étant généralement admis qu'une poudre fluide possède une compressibilité inférieure à 20 % (Schuck et al., 2012). Notons qu'il est possible de diminuer la compressibilité des poudres en ajoutant un agent antiagglomérant. Ces additifs constitués de particules fines, également appelés conditionneurs d'écoulement, permettent de réduire la cohésion de la poudre en enrobant les particules plus grossières du constituant principal, les empêchant de se coller entre elles. Ils augmentent également la densité apparente des poudres car les particules plus petites peuvent occuper les espaces vides pendant le compactage (Barbosa-Cánovas et al., 2005).

3.2.3. Angle de spatule élevé pour les poudres WRP et GGRP

L'angle de spatule est de 72,22° pour WRP, soit inférieur à 74°, mais il est de 78,87° pour GGRP (Tableau 10A). Les deux poudres obtiennent donc une note de respectivement 12 et 7 points sur 25 pour ce critère (Tableau 10B). Il est en effet établi qu'un produit fluide forme toujours un angle de spatule inférieur à 40°. Cependant, de nombreuses poudres alimentaires possèdent un angle de spatule supérieur à ce seuil (Schuck et al., 2012).

3.2.4. Très bonne uniformité pour les deux poudres

La distribution granulométrique des poudres WRP et GGRP a permis de calculer pour ces deux produits un coefficient d'uniformité de respectivement 3,5 et 5 (Tableau 10A), ce qui correspond à une note de 23 et 22,5 points sur 25 (Tableau 10B). Ces valeurs traduisent la largeur des distributions granulométriques, sachant que plus la distribution est resserrée (faible dispersion), plus le coefficient d'uniformité est proche de 1. Cependant, de nombreuses poudres alimentaires affichent un coefficient d'uniformité compris entre 2 et 10 (Schuck et al., 2012).

3.2.5. Faible écoulement des poudres

Au final, la somme des notes d'angle et de talus, de compressibilité, d'angle de spatule, et de coefficient d'uniformité aboutissent à des indices d'écoulement de 59 pour la poudre WRP et 41,5 pour la poudre GGRP (Tableau 10B). Ces valeurs, comprises entre 40 et 59 sur 100, correspondent à un score d'écoulement médiocre (« pas bon » ; Tableau 7) (Schuck et al., 2012). Toutefois, la poudre WRP est à la limite d'un écoulement « normal » avec un indice proche de 60. Les caractéristiques des poudres telles que la composition, mais aussi la teneur en humidité, la distribution granulométrique et la forme des particules (propriétés de surface) qui dépendent du procédé de séchage, peuvent fortement influencer leur comportement d'écoulement. De plus, l'écoulement peut être aisément amélioré par l'ajout de divers additifs, agents d'écoulement ou composés absorbant l'humidité tels que les oxydes de silicium, les silicates, les stéarates de calcium, les phosphates de calcium, ou les amidons modifiés. Le principe de

ces additifs est d'enrober la surface des particules afin de réduire l'adhérence et la possibilité de formation de ponts humides entre elles (Schuck et al., 2012).

Parmi les poudres testées par Schuck et al. (2012), l'indice d'écoulement de la poudre WRP se rapprocherait de celui d'une poudre de pomme (59 points, Tableau 12). Quant à celui de la poudre GGRP, il se rapprocherait de celui des poudres de blanc et jaune d'œuf (37 points).

3.2.6. *Tendance à l'éboulement des poudres*

L'indice d'écoulement des deux poudres a ensuite été traduit en scores selon un barème établi par Schuck et al. (2012) afin d'introduire cette caractéristique dans le calcul de l'indice d'éboulement. Ainsi, l'indice d'écoulement des poudres WRP et GGRP est de respectivement 24 et 16 points (Tableau 10B). Avec un angle de chute inférieur à 50° (Tableau 10A), les deux poudres se voient attribuer une même note de 12 points sur 25 pour ce critère (Tableau 10B). En revanche, la différence d'angle étant de 8,3 et 5,4 pour respectivement WRP et GGRP (Tableau 10A), des notes de 8 et 3 points ont été attribuées respectivement aux deux poudres pour ce critère (Tableau 10B). Enfin, la dispersibilité dans l'air des poudres WRP et GGRP a été mesurée à respectivement 11 % et 7,8 % (Tableau 10A), correspondant aux notes de respectivement 12 et 8 points sur 25 (Tableau 10B).

Finalement, la somme des notes d'angle de chute, de différence d'angle, de dispersibilité dans l'air et d'indice d'écoulement, aboutit à un indice d'éboulement de 56 pour la poudre WRP, et 39 pour GGRP (Tableau 10B). La valeur de WRP, comprise entre 40 et 59 sur 100, traduit une « tendance existante à l'éboulement » (Tableau 8). La valeur de GGRP, comprise entre 25 et 39, traduit quant à elle une « faible tendance à l'éboulement ». Toutefois, la poudre GGRP est à la limite d'une « tendance existante à l'éboulement » avec un indice proche de 40.

Parmi les poudres testées par Schuck et al., (2012), l'indice d'éboulement de la poudre WRP se rapprocherait de celui d'une poudre de pomme (56 points, Tableau 12), comme pour l'indice d'écoulement. Pour GGRP, l'indice d'éboulement se rapprocherait de celui d'une poudre de lactosérum à 40 % de matière grasse (37 points).

3.3. **Propriétés de réhydratation des poudres WRP et GGRP**

La capacité d'hydratation d'une poudre est une propriété essentielle pour les utilisateurs industriels d'ingrédients déshydratés en phase liquide. Les indices de mouillabilité, de dispersibilité et de solubilité des poudres WRP et GGRP sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11: Propriétés de réhydratation des poudres WRP et GGRP

	WRP	GGRP	p-values
Indice de mouillabilité (s)	> 120	< 20	nd
Indice de dispersibilité (% MS)	86,13 ± 0,40	28,92 ± 0,79	< 0,001
Indice de solubilité (%)	97,76 ± 0,92	33,65 ± 2,00	< 0,001

3.3.1. Une poudre GGRP plus mouillable que la poudre WRP

La mouillabilité d'une poudre est définie comme sa capacité à surmonter la tension superficielle à l'interface entre l'eau et les particules. Une bonne mouillabilité est très importante car elle est étroitement liée aux propriétés d'hydratation de la poudre (Schuck et al., 2012). Une poudre est dite « très mouillable » si son indice de mouillabilité est inférieur à 30 s, comme c'est le cas pour la poudre GGRP ; elle est dite « non mouillable » si l'indice est supérieur à 120 s, comme c'est le cas pour la poudre WRP (Tableau 11).

La « non mouillabilité » de la poudre WRP se traduit par la flottaison des particules de poudre à la surface de l'eau, avec la formation d'un voile gélatineux empêchant la poudre de couler (Figure 22). Une hypothèse serait que les particules fines libérées lors du contact avec l'eau (cf § 3.1., Figure 21) pénètrent dans les espaces entre les grosses particules et favorisent la compaction des particules qui ne permettraient pas à l'eau de pénétrer, et ce qui formerait des grumeaux flottant en surface (Barbosa-Cánovas et al., 2005). Il est également possible que le collagène soluble (présent dans le WRP) se dissolve très vite et gélifie en surface, formant un film viscoélastique empêchant les particules de poudre de couler.

Notons que de nombreuses poudres alimentaires ont un indice de mouillabilité > 120 s. On peut citer les poudres de caséinate de sodium, de jaune et de blanc d'œuf (Schuck et al., 2012).

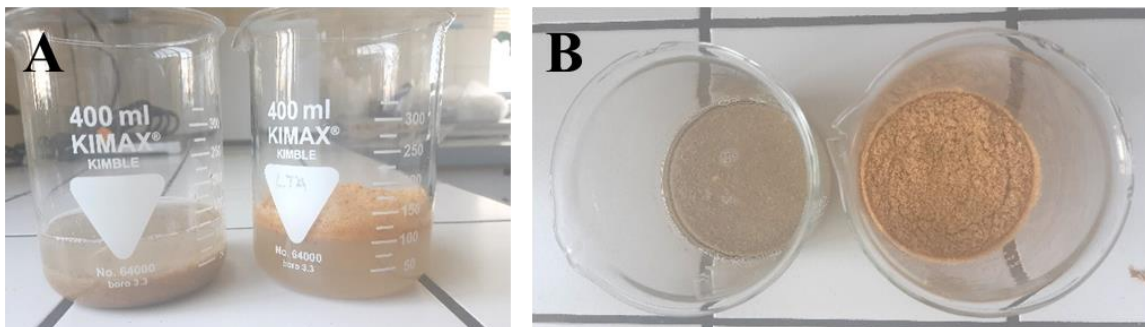


Figure 22: Observation 5 min après le versement des poudres GGRP (à gauche) et WRP (à droite) dans l'eau. (A) Vue de côté. (B) Vue du dessus.

En revanche, la très forte mouillabilité de la poudre GGRP qui se traduit par le dépôt rapide des particules au fond du récipient (Figure 22), pourrait résulter de la grande taille et de la structure poreuse des particules qui favoriserait la pénétration de l'eau dans les espaces vides des particules agglomérées (Wu et al., 2020). La mouillabilité est également associée à la capacité d'une poudre à gonfler au fur et à mesure qu'elle absorbe de l'eau, ce qui a effectivement été observé pour la poudre GGRP (Schuck et al., 2012).

3.3.2. Une poudre WRP plus dispersible que la poudre GGRP

La dispersibilité en phase liquide traduit l'aptitude d'une poudre à ne pas former d'agrégats lors de la mise en solution. Une poudre est dite « dispersible » si l'indice de dispersibilité est supérieur à 95 % de matière sèche (MS) (Schuck et al., 2012). Or, aucune des deux poudres, WRP et GGRP, n'atteint cette valeur seuil (Tableau 11). La poudre WRP possède toutefois un indice de dispersibilité relativement

élevé de 86 %, proche de celui d'une poudre de gélatine (90 % ; Schuck et al., 2012), et très supérieur à celui de la poudre GGRP qui, avec un indice de 29 %, est proche d'une poudre de caséinate de sodium (28,5 %, Schuck et al., 2012). Cette différence entre les poudres WRP et GGRP pourrait au moins en partie résulter de leur différence de composition, sachant qu'elles contiennent respectivement 62 % et 83 % de protéines (donné présenté dans le chapitre 3), et qu'il est généralement admis que plus la teneur en protéines des poudres est élevée, moins elles sont dispersibles. Mais de la même manière que pour la mouillabilité, la dispersibilité des poudres peut aussi être influencée par la granulométrie et la densité (Barbosa-Cánovas et al., 2005). Notons que la dispersibilité des poudres alimentaires varie de 24 % (caséine micellaire) à 98 % (œuf entier, Tableau 12) (Schuck et al., 2012).

3.3.3. Une poudre WRP soluble, contrairement à la poudre GGRP

La solubilité d'une poudre fait référence à la vitesse à laquelle la matière sèche se dissout dans l'eau (le protocole est réalisé en un temps court) et à l'ampleur de cette dissolution (% de matière sèche solubilisée). Une poudre est qualifiée de « soluble » si l'indice de solubilité est supérieur à 95 % (Schuck et al., 2012), ce qui est le cas de la poudre WRP (98 %), mais pas de la poudre GGRP (34 %) (Tableau 11). La solubilité dépend principalement de la composition chimique de la poudre et de son état physique (Barbosa-Cánovas et al., 2005). Cela est cohérent avec nos résultats étant donné que la poudre WRP est produite à partir de l'eau récupérée lors du processus de fonte des graisses et de dégraissage des os, contenant par définition majoritairement des molécules solubles, alors que la poudre GGRP est issue de la partie solide (creton) extraite après la fonte et la séparation des graisses (Figure 2, Introduction générale - section 1.2.).

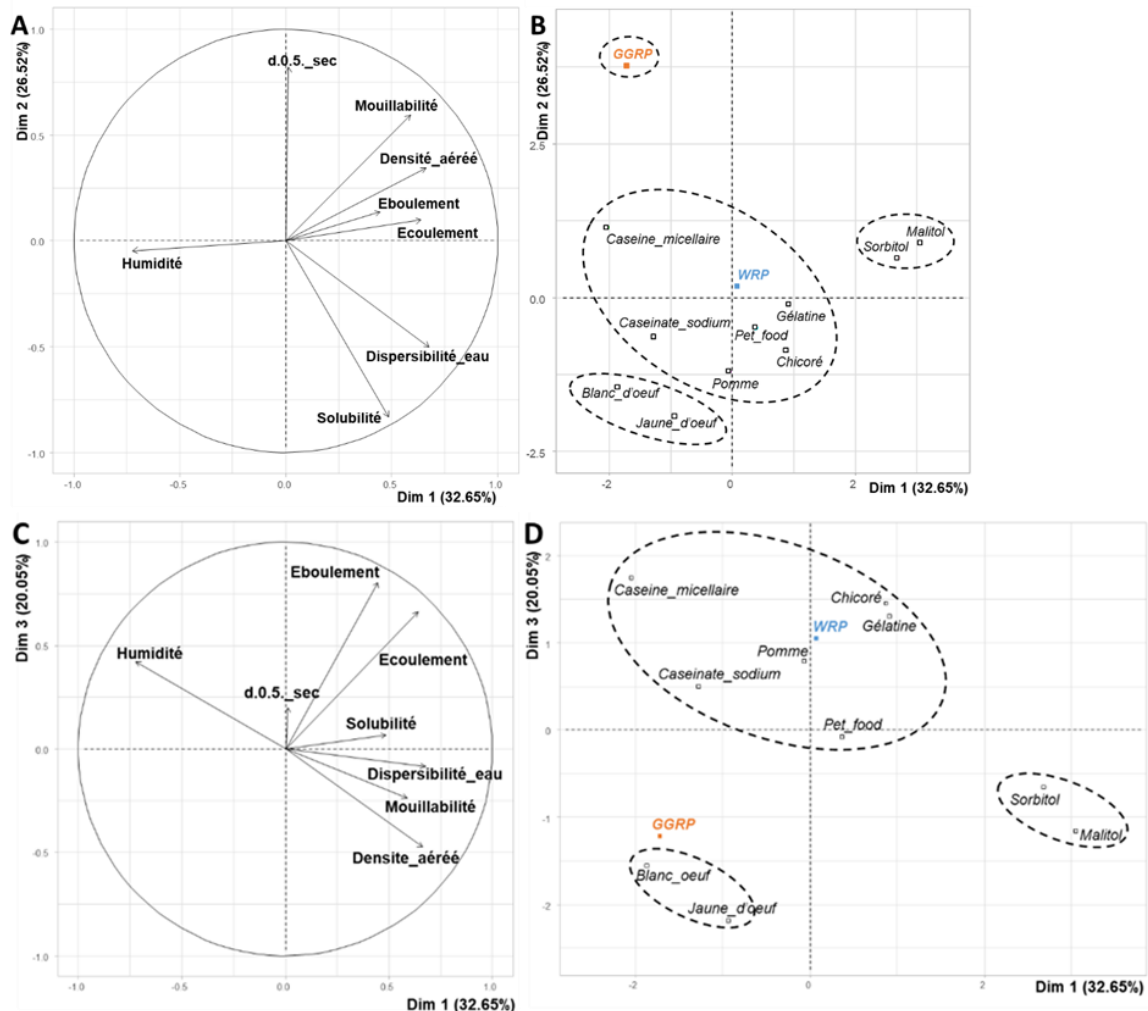
3.4. La poudre WRP a des propriétés physiques similaires à celles de nombreuses poudres alimentaires, contrairement à la poudre GGRP

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée à partir des données de caractérisation de 12 ingrédients secs (poudres WRP et GGRP, plus 10 autres poudres alimentaires décrites par Schuck et al. (2012), Tableau 12), afin d'une part de mettre en évidence les éventuelles corrélations entre les caractéristiques physiques des poudres, et d'autre part de positionner les poudres WRP et GGRP par rapport à quelques ingrédients alimentaires standards en intégrant simultanément différentes caractéristiques physiques. Les données ont été simplifiées en n'incluant que les huit paramètres principaux mesurés, à savoir le diamètre médian des particules en voie sèche ($d(0,5)$) en tant qu'indicateur de la taille des particules, les scores finaux d'écoulement et d'éboulement, la densité aérée (apparente), les propriétés de réhydratation (mouillabilité, dispersibilité et solubilité dans l'eau), auxquels a été ajoutée l'humidité des poudres (déterminée par gravimétrie). Les paramètres permettant de déterminer les indices d'écoulement et d'éboulement n'ont pas été jugés nécessaires pour la réalisation de l'ACP, n'apportant pas d'information supplémentaire.

Les résultats sont présentés Figure 23, qui correspond à la carte des variables et à la carte des individus définies par les deux premières composantes principales (CP) de l'ACP.

Tableau 12: Propriétés physiques et procédés de séchage des poudres WRP et GGRP et de poudres alimentaires tel que rapporté par Schuck et al. (2012). Mo : mouillabilité ; Disp. eau : dispersibilité dans l'eau.

Poudre	d(0,5) voie sèche	Ecoulement	Ecoulement	Densité aérée	Mo	Disp. eau	Solubilité	Humidité	Processus de séchage
WRP	495	59	56	280	-120	86	98	5	Cylindre chauffant
GGRP	553	41,5	39	400	-20	29	34	5	Tambour rotatif
Gélatine	183	72	59	310	-10	91	99,8	8	Atomisation
Caséinate de sodium	77	46	58	303	-120	28,5	99,8	6	Atomisation
Caséine micellaire	287	71	52	242	-120	24,2	64,6	9	Atomisation
Sorbitol	271	73	50	543	-3	92,3	99,5	1	Atomisation
Malitol	201	67	55	749	-2	81,3	99,5	1	Atomisation
Pomme	129	59	56	289	-120	86,9	99,5	6	Atomisation
Chicorée	216	79	57	220	-120	87,7	99,5	3	Atomisation
Jaune d'œuf	39	37	26	256	-120	91,7	98,5	3	Atomisation
Blanc d'œuf	39	37	29	365	-120	64,1	99,5	8	Atomisation
Pet food	194	66	46	433	-120	72,7	97,0	4	Atomisation

**Figure 23:** Projection des variables (A, C) et des individus (B, D) sur les trois premières dimensions (CP1 et CP2 ; CP1 et CP3) de l'analyse en composantes principales (ACP). (A, C) Les variables actives correspondent aux caractéristiques mesurées pour décrire les propriétés physiques. (B, D) Les individus correspondent à des ingrédients décrits dans la littérature (réf) (en noir) et aux poudres WRP et GGRP étudiées dans le présent projet (respectivement en bleu et en orange). Les clusters d'échantillons (cercles en pointillés) ont été déterminés par analyse de cluster hiérarchique (ACH).

Un peu plus de 79 % de la variabilité totale cumulée est représentée par les trois premières composantes principales de l'ACP (Figure 23A et Figure 23C), expliquant ainsi une partie importante de l'information fournie par le jeu de données. CP1 (32,65 % de la variabilité) est corrélée à l'humidité des poudres ($R^2 = 0,52$), à la densité aérée ($R^2 = 0,44$) et à la dispersibilité dans l'eau ($R^2 = 0,46$). CP2 (26,52 % de la variabilité) est corrélée à $d(0,5)$ ($R^2 = 0,67$), à la solubilité ($R^2 = 0,69$) (*donnée supplémentaire*, Tableau S2). La troisième composante (CP3, 20,05 %) est corrélée à l'éboulement ($R^2 = 0,65$) et à l'écoulement ($R^2 = 0,44$), ces deux variables étant par ailleurs fortement corrélées entre elles ($R^2 = 0,73$), l'indice d'écoulement intervenant dans le calcul de l'indice d'éboulement (*donnée supplémentaire*, Tableau S3). La solubilité est corrélée positivement à la dispersibilité dans l'eau et négativement au $d(0,5)$ ($R^2 = 0,69$ et $R^2 = -0,66$, respectivement, Tableau S2). La densité aérée est corrélée positivement à la mouillabilité et négativement à l'humidité ($R^2 = 0,69$ et $-0,59$, respectivement), en cohérence avec la littérature (Barbosa-Cánovas et al., 2005).

La projection des individus oppose clairement la poudre GGRP aux autres poudres alimentaires sur le plan CP1 - CP2 (Figure 23B). Sa position en haut à gauche du plan indique une granulométrie élevée et surtout une faible solubilité et dispersibilité dans l'eau par rapport aux autres poudres alimentaires intégrées dans l'analyse. Sur le plan CP1-CP3, elle se rapproche toutefois des poudres d'œufs, caractérisées par des faibles valeurs en termes d'éboulement et d'écoulement (Figure 23D).

En revanche, la poudre WRP affiche des similitudes globales avec un certain nombre d'autres poudres alimentaires (gélatine, caséine micellaire, caséinate de sodium, chicorée, pomme, pet food) qui, positionnées au centre de la carte, se caractérisent donc par des valeurs moyennes par rapport à l'ensemble des poudres considérées. La poudre WRP se caractérise néanmoins par une faible granulométrie et écoulement.

4. Conclusion

Les poudres de WRP et GGRP présentent à sec un faible indice d'écoulement et une tendance à l'éboulement. Elles se distinguent majoritairement par leur taille de particules et leur densité, la poudre de WRP étant composée de plus petites particules et ayant une densité plus faible comparée à GGRP. Le faible écoulement des poudres peut entraîner une prise en masse avec un risque de « mottage » (formation d'agglomérats compacts de grains de poudre). Ce phénomène est à éviter, car il nécessitera une intervention supplémentaire (cassage des mottes) lors de la formulation de produits à partir des poudres. Une tendance à l'agglomération peut être à l'origine du blocage des poudres en sortie de trémie ou de silo et peut également endommager certains équipements. De plus, la forte compressibilité des poudres WRP et GGRP peut représenter un inconvénient supplémentaire lors du conditionnement en usine, car il peut induire des variations de dosage ou une non-conformité du poids lors du remplissage d'un big-bag par exemple.

Une fois réhydratées, les poudres de WRP et GGRP ont des comportements très différents, mais cela n'est pas étonnant étant donné leurs procédés de fabrication : le WRP est produit à partir de l'eau

récupérée lors du processus de fonte des graisses et de dégraissage des os, alors que le GGRP est issu des cretons, c'est-à-dire de la fraction solide séparée après la fonte des graisses. Ainsi, WRP est une poudre non-mouillable contrairement à GGRP, mais largement plus soluble. Et bien qu'aucune des deux poudres ne soit soluble à 100 %, la distribution granulométrique en voie liquide indique des particules nettement plus petites pour WRP. Elles sont par ailleurs toutes les deux non-dispersibles, même si WRP l'est nettement plus que GGRP. Globalement, il en résulte que la poudre de WRP pourra être incorporée plus facilement que la poudre de GGRP dans une phase aqueuse sous agitation.

5. Données supplémentaires

Tableau S1: Mesures expérimentales des propriétés d'écoulement et d'éboulement des ingrédients Water Recovered Proteins (WRP) et Greasy Greaves Recovered Proteins (GGRP). Disp. air : dispersibilité dans l'air.

WRP	Angle de talus	Angle de chute	Différence d'angle	Compressibilité	Angle de spatule	Coeff. Uniformité	Disp. air			
Mesure 1	53,80	47,20	6,60	28,95	70,80	3,55	11,90			
Mesure 2	49,50	39,20	10,30	28,42	71,40	3,55	12,60			
Mesure 3	51,00	42,90	8,10	-	74,45	3,54	8,50			
moyenne	51,43	43,10	8,33	28,69	72,22	3,54	11,00	Ecoulement		
Nb points	12	12	8	12	12	23	12	59	24	Eboulement
GGRP	Angle de talus	Angle de chute	Différence d'angle	Compressibilité	Angle de spatule	Coeff. Uniformité	Disp. Air			
Mesure 1	54,90	48,50	6,40	47,47	79,75	5,04	7,50			
Mesure 2	53,70	48,60	5,10	46,84	81,40	5,10	8,00			
Mesure 3	55,20	50,60	4,60	-	75,45	5,18	8,00			
moyenne	54,60	49,23	5,37	47,16	78,87	5,11	7,83	Ecoulement		
Nb points	12	12	3	0	7	22,5	8	41,5	16	Eboulement

Tableau S2: Paramètre ACP de l'étude des propriétés physiques**Valeur propre**

	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4	Dim.5	Dim.6	Dim.7	Dim.8
Variance	2,612	2,121	1,604	0,712	0,461	0,267	0,18	0,043
% of var.	32,646	26,516	20,05	8,903	5,761	3,335	2,247	0,541
% cumulé de var.	32,646	59,162	79,212	88,115	93,876	97,212	99,459	100

Variables Active	Dim.1	ctr	cos2	Dim.2	ctr	cos2	Dim.3	ctr	cos2
d(0,5)_sec	0,012	0,006	0	0,821	31,77	0,674	0,199	2,479	0,04
Ecoulement	0,639	15,625	0,408	0,097	0,447	0,009	0,666	27,624	0,443
Eboulement	0,447	7,636	0,199	0,136	0,872	0,018	0,805	40,384	0,648
Densité_aéré	0,663	16,841	0,44	0,344	5,594	0,119	-0,475	14,037	0,225
Mouillabilité	0,588	13,236	0,346	0,595	16,703	0,354	0,239	3,561	0,057
Dispersibilité_eau	0,678	17,593	0,459	-0,503	11,929	0,253	-0,086	0,459	0,007
Solubilité	0,485	9,014	0,235	-0,831	32,586	0,691	0,067	0,283	0,005
Humidité	-0,724	20,05	0,524	-0,046	0,099	0,002	0,423	11,174	0,179

Supplementary categories	Dist	Dim.1	cos2	v.test	Dim.2	cos2	v.test	Dim.3	cos2	v.test
Blanc d'œuf	3,035	-1,871	0,38	-1,158	-1,448	0,228	-0,994	-1,554	0,262	-1,227
Caseinate de sodium	2,468	-1,284	0,27	-0,794	-0,626	0,064	-0,43	0,497	0,04	0,392
Caseine micellaire	3,115	-2,049	0,433	-1,268	1,147	0,136	0,788	1,745	0,314	1,378
Chicorée	2,308	0,865	0,14	0,535	-0,862	0,139	-0,592	1,45	0,395	1,145
Gelatine	3,503	0,91	0,132	0,563	-0,111	0,002	-0,076	1,302	0,271	1,028
GGRP	4,373	-1,725	0,156	-1,067	3,774	0,745	2,591	-1,216	0,077	-0,96
Jaune d'œuf	3,254	-0,936	0,083	-0,579	-1,931	0,352	-1,326	-2,183	0,45	-1,724
Malitol	3,58	3,043	0,723	1,883	0,9	0,063	0,618	-1,157	0,105	-0,914
Pet food	1,137	0,369	0,105	0,228	-0,487	0,184	-0,335	-0,075	0,004	-0,059
Pomme	1,564	-0,065	0,002	-0,04	-1,193	0,582	-0,819	0,791	0,256	0,624
Sorbitol	2,87	2,676	0,869	1,656	0,648	0,051	0,445	-0,652	0,052	-0,515
WRP	2,213	0,067	0,001	0,041	0,187	0,007	0,129	1,051	0,225	0,83

Tableau S3: Matrice des corrélations entre variables (propriétés physiques des poudres de WRP et GGRP). Disp. eau : dispersibilité dans l'eau.

	d(0,5) sec	Densité aérée	Disp. eau	Eboulement	Écoulement	Humidité	Mouillabilité	Solubilité
d(0,5) sec	1.00							
Densité aérée	0.067	1.00						
Disp. eau	-0.224	0.146	1.00					
Eboulement	0.210	0.035	0.053	1.00				
Écoulement	0.173	0.142	0.318	0.731	1.00			
Humidité	-0.074	-0.590	-0.485	0.008	-0.191	1.00		
Mouillabilité	0.319	0.689	0.143	0.161	0.252	-0.359	1.00	
Solubilité	-0.656	0.062	0.692	0.208	0.216	-0.234	-0.212	1.00

En résumé

- La poudre WRP est constituée de grosses particules dont la taille, hétérogène, est nettement réduite une fois la poudre solubilisée. Elle présente une faible aptitude à l'écoulement et une tendance à l'éboulement. Il s'agit d'une poudre non-mouillable, mais dispersible et présentant une solubilité élevée.
- La poudre GGRP est constituée de grosses particules de taille hétérogène, même après solubilisation. Elle présente également une faible aptitude à l'écoulement mais aussi une faible tendance à l'éboulement. Il s'agit d'une poudre mouillable, mais non dispersible et présentant une solubilité faible.

Chapitre 3

Caractérisation biochimique et techno- fonctionnelle des deux ingrédients WRP et GGRP

Basé sur les publications et projets de publication suivants :

- Le Foll R., Lechevalier V., Hamon P., Guérin-Dubiard C., Lambert X., Deglaire A., Nau F. (2024). Beef protein ingredients from fat rendering process are promising functional ingredients, *Food Chemistry*, 433, 137298.
- Le Foll R., Nau F., Hamon P., Guérin-Dubiard C., Lambert X., Deglaire A., Lechevalier V. (2024) Innovative beef protein co-products to substitute gelatin as gelling agents, and sodium caseinate as emulsifiers, en préparation pour soumission à *LWT-Food Science and Technology*.
- Le Foll R., Nau F., Hamon P., Guérin-Dubiard C., Lambert X., Deglaire A., Lechevalier V., The flow properties of a beef protein co-product recovered from process water, can be modulated to mimic the flow behavior of commercial gelatin solutions, en preparation pour soumission.

1. Introduction

Meat proteins can exhibit a wide range of textural properties. Yet, texture plays a key role in food quality and sensory evaluation. In particular, muscle proteins are widely used as gelling agents (Xiong, 2018) whose gelling properties have been studied (Rahman & Al-Mahrouqi, 2009). Knowledge of the thermal behavior of gels is important for the development of food products because of its influence on sensory attributes such as consistency and melting in the mouth during the consumption process (Steffe, 1996). The textural characteristic of food gels can be studied by several mechanical methods (compression, torsion, traction or shear). The Textural Profil Analysis test (TPA) makes it possible in particular to determine the hardness, cohesiveness and adhesiveness of a gel.

Among meat proteins, myofibrillar proteins have high gelling properties due to myosin and actin that coagulate upon heating (Sun & Holley, 2011). Stromal proteins such as collagen (connective tissue) are also used in industry as gelling agents (Gómez-Guillén et al., 2011). In addition, the heat treatment of collagen allows to obtain gelatin, which has amazing gelling properties with cooling (Gómez-Guillén et al., 2011). The critical concentration for gelatin gelling is between 0.5 and 1 % gelatin (w:w). Several parameters influence the gelling properties of gelatin, such as its average molecular weight and its proline and hydroxyproline content. For example, mammalian gelatins, which are richer in proline and hydroxyproline than fish gelatins, particularly cold-water fish gelatins, produce firmer gels than the latter, and have higher melting and gelling temperatures (Haug et al., 2004).

The emulsifying properties of beef proteins have also been studied. In particular, myofibrillar proteins are effective emulsifiers (Zorba & Kurt, 2006). Emulsification is an essential process in the manufacture of many formulated foods (ice cream, vinaigrette, spread, knack...). The quality of an emulsifying agent is assessed by its ability to emulsify a large quantity of product and form a stable emulsion, *i.e.* capable of slowing down destabilization phenomena such as coalescence, flocculation, and creaming.

Caseinates are widely used in the food industry for their emulsifying properties, for example in ice creams and frozen desserts, where it contributes to creaminess and texture (Zayas, 1997). Sodium caseinate (NaCas) is one of the best non-meat protein emulsifiers. It contains approximately 90 % protein and is completely soluble in water, forms viscous solutions, resists thermal denaturation and coagulation, and rapidly forms interfacial films (Crujisen, 1996).

Food thickeners are widely used to modify the rheological properties of liquid foods (Himashree et al., 2022). Polysaccharides (starch, xanthan, guar gum) are frequently used as thickeners in several foods such as soups, sauces, desserts, cake batters (Saha & Bhattacharya, 2010; Himashree et al., 2022). The main functions of food thickeners are viscosity increase and modification of flow behavior properties (Himashree et al., 2022). Flow behavior is typically represents the functionality of food formulations in terms of viscosity (Chen et al., 2018). Meat proteins are compositionally and structurally complex materials and can exhibit a wide range of rheological behaviors under different conditions (Phillips et al., 1994). According to the literature data, muscle proteins (myosin/actomyonine, collagen) in solution

have a shear-thinning behavior (Chapleau & de Lamballerie-Anton, 2003 ; Duan et al., 2013). However, by modulating the molecular structure of the proteins (by heat treatment, acid or alkali condition, salt addition), it is possible to change the flow behavior into a Newtonian one (Dara et al., 2021), as observed for gelatin (Olivares et al., 2006 ; Wulansari et al., 1998).

However, no one has characterized the gelling, emulsifying and thickening properties of the two bovine co-products studied here. Although they are currently marketed as "filler proteins" or "meat substitutes" without further specification, and largely used in pet food, these two ingredients could be interesting alternative and sustainable protein sources for human consumption. In particular, it is reasonable to assume that they can substitute texture agents, at a competitive selling price, as these ingredients are produced using a minimal and gentle process, *i.e.* without chemical reagents and without going as far as purified molecules as it is the case, for instance, in gelatin production.

Different factors can modulate the gelling, emulsifying and thickening properties including protein concentration, pH and ionic strength. In particular, these last two parameters can modify the solubility of the proteins thus modifying their properties (Zayas, 1997). It is therefore important to know how these factors influence the behavior of proteins in order to be able to precisely control the sensory properties of foods containing them, and to offer the food industry a wide variety of suitable protein ingredients for different applications.

In this context, more information on the functional properties of the two dehydrated beef proteins WRP and GGRP, derived from fat rendering process and water recovery, could be useful for food industry. Indeed, these proteins are not currently valued at the height of their quality, since they are rarely used for human consumption, although they are fully compliant with European regulations in this area (Corrigendum to Regulation (EC) No 852/2004). These animal proteins can offer interesting functional solutions, without requiring specific modifications unlike many plant proteins (Damodaran, 2006). The present study aims to characterize as completely as possible the gelling, emulsifying and thickening properties of these industrial co-products, under physicochemical conditions relevant to usual food applications. Afterwards, the question arose as to whether these two co-products could be effective substitutes for common functional ingredients. To address this question, we chose to compare them with gelatins and NaCas, chosen as references for gelation and thickening, and emulsification, respectively. Replacing gelatin with these dehydrated bovine proteins may be interesting from an economic and environmental point of view, as the production process is simpler (no collagen-to-gelatin conversion stage), and does not require the use of chemical reagents such as acid or alkali. As for NaCas, it could be interesting to replace it in pH conditions where the emulsifying properties of NaCas are impaired, *i.e.* close to the pI of caseins (pH 4.6) (Surh, 2009 ; Rasnani & Mirhosseini, 2011).

2. Materials and Methods

2.1. Origin of the samples

The dehydrated beef proteins studied, namely the Greasy Greaves Recovered Proteins (GGRP) and Water Recovered Proteins (WRP), were produced by a local plant (CORNILLE sas, France) from bovine co-products. GGRP results from greasy greaves, obtained during the beef fat rendering process. WRP is produced from water recovered during the beef fat rendering process and during the bone degreasing process (Denis, 2009). The fat rendering process of edible fats by the wet process consists of a first step of grinding and sorting before the injection of steam (140 °C) into the product, causing the melting of the fat. A knitter then separates the solid fraction (proteins called greaves) from the melted animal fats and from an aqueous fraction (recovery water). The solid fraction is then defatted (at 90 °C), dried using a rotary dryer (at 102 °C for few minutes), and finally ground to obtain the GGRP. The aqueous fraction from the fat centrifugation is partly recovered for further processing, after mixing with the aqueous fraction from the centrifugation of beef bone fats, which is also recovered. These two fractions are then filtered and pasteurized, before being concentrated by vacuum evaporation (from 5 % to 24 % at 65 °C), dried on a roller dryer (at 157 °C for few seconds) and then ground to obtain the WRP (Figure 2, general introduction section, p.23).

The powder samples were packed in vacuum bags before storage at 4 °C away from light until analysis. One production batch only was used for each protein ingredient.

The commercial ingredients regarded as functional references were two gelatins extracted from bovine skins, purchased from ROUSSELOT® (150 Bloom, 88 % protein) and GELITA® (Edible Gelatine 240 Bloom, 90 % protein), respectively, and a sodium caseinate (NaCas) from Ingredia Dairy Experts® (96 % protein).

All the ingredient solutions were prepared by dispersing the powders in water according to the experimental design (Table 13), heating to 50° C, and maintained at this temperature under magnetic stirring for 2 min.

2.2. Experimental design

Response Surface Methodology (RSM, Box & Wilson, 1951) was used to simultaneously study the effect of pH, protein concentration, and added NaCl (Table 13), which are known to have a major effect on the functional properties of protein ingredients (Zayas, 1997). A Central Composite Design (CCD) was used, with pH values ranging from pH 4 to pH 7; protein concentration ranging from 5 % to 20 % for WRP, and from 12% to 20% for GGRP; and NaCl addition ranging from 0 to 0.4 M NaCl.

Considering the NaCl content of each of the two ingredients, these quantities of NaCl added mean that the total effective NaCl content of the solutions tested varied between 0.05 and 0.60 M for WRP, and between 0.01 and 0.42 M for GGRP. The pH and NaCl ranges thus explored include conditions commonly applied in meat products, which are the most likely food applications for GGRP and WRP, and in particular the ionic strength value that favors myofibrillar protein solubilization (from 0.3 M NaCl according to Chen et al., 2017). The pH was adjusted with a few drops of NaOH (4 M) or HCl (6 M). The CCD resulted in 18 experiments that were performed randomly (Table 13), including four central points (pH 5.55, 12.5%

protein for WRP vs. 16% for GGRP, and 0.2 M NaCl). Experimental data were adjusted to a second-degree polynomial regression model that contained coefficients of linear, quadratic and interaction effects (Montgomery, 2013).

Table 13: Central Composite Design (CCD) for independent variables of protein solutions. C1: protein concentration (%) for gelling properties of WRP, emulsifying properties of WRP and GGRP, flow properties of WRP; C2: protein concentration (%) for gelling properties of GGRP; I: ionic strength (M added NaCl).

Run	Experimental variables			
	pH	C1	C2	I
1	5.55	12.5	16.0	0.20
2	4.44	7.2	13.2	0.34
3	5.55	20.0	20.0	0.20
4	4.44	17.8	18.8	0.06
5	5.55	12.5	16.0	0.40
6	5.55	12.5	16.0	0.20
7	5.55	5.0	12.0	0.20
8	4.44	7.2	13.2	0.06
9	4.00	12.5	16.0	0.20
10	5.55	12.5	16.0	0.20
11	5.55	12.5	16.0	0.00
12	6.56	7.2	13.2	0.06
13	7.00	12.5	16.0	0.20
14	4.44	17.8	18.8	0.34
15	6.56	17.8	18.8	0.06
16	6.56	7.2	13.2	0.34
17	6.56	17.8	18.8	0.34
18	5.55	12.5	16.0	0.20

2.3. Physicochemical characterization

2.3.1. Composition

The dry matter content of the powders was determined gravimetrically after drying at 102 ± 2 °C for 5 h, and the ash content was obtained after incineration at 525 ± 25 °C, and then at 820 °C for 5 h in a muffle furnace. NaCl content was determined by coulometric titration-based chloride analysis (Corning 926), where 0.5 ml sample was added to a combined acid buffer solution (Reagecon™). Total nitrogen content was measured by the Kjeldahl method, and a nitrogen-to-protein conversion factor of 6.25 (industrial standard) was applied to determine protein content. Lipid content was determined gravimetrically after extraction with a chloroform:methanol:0.8% KCl (3:48:47) mixture, followed by evaporation under nitrogen, according to Folch (1957).

The total collagen content was calculated from the hydroxyproline content, determined by an amino acid assay method, and using a conversion factor of 8, knowing that collagen contains 12.5% hydroxyproline and is in a 3:1 collagen/elastin ratio. The method for amino acid determination consisted of acid hydrolysis of the proteins in 6 M HCl for 24 h at 110 °C under nitrogen according to Davies and Thomas (1973), followed by cation-exchange chromatography. Chromatography was performed using an automatic amino acid analyzer (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) equipped with a 200 mm x 4.6 mm

sulfonated polystyrene resin (Biochrom 30+; Serlabo technologies, Trappes, France). Samples were diluted in 0.2 M lithium citrate buffer, pH 2.2. Absorbance was measured at 440 nm after post-column derivatization with ninhydrin (EZ-NIN, Biochrom) according to Moore et al. (1958). Hydroxyproline was quantified using an external calibration curve previously established with a standard (trans-4-hydroxy-L-proline, Sigma-Aldrich).

All analyses were carried out in duplicate or triplicate. All values were calculated as a percentage (w:w).

2.3.2. Protein fractionation and fraction quantification

Protein fractionation was performed using an adaptation of the method that Malva et al. (2018) proposed to separate sarcoplasmic proteins (soluble at low ionic strength), myofibrillar proteins (soluble at high ionic strength), and stromal proteins (insoluble). Four grams of powder were homogenized (3 min, Ultraturax, IKA) in 40 ml of 50 mM phosphate buffer pH 7.5, followed by centrifugation (8,000g, 20 min, 4 °C) after which the supernatant was collected. The centrifugation pellet was then diluted in 10 volumes of KCl phosphate buffer pH 7.5 (0.45 M KCl, 15.6 mM Na₂HPO₄, 3.5 mM KH₂PO₄), homogenized, and then centrifuged (8,000g, 20 min, 4 °C), to recover the supernatant. The remaining pellet was recovered to quantify the insoluble proteins. Finally, each protein fraction was quantified by nitrogen determination using the Kjeldahl method, as described above. The analyses were performed in duplicate.

2.3.3. Protein analysis

Soluble proteins, the most likely involved in functional properties (Zayas, 1997), were analyzed by SDS-PAGE on acrylamide gels (4-20 %) using a Mini-Protean TGX electrophoresis system® (Bio-Rad Laboratories Inc), and following protocols adapted from Parés et al., (2020) and Toldrà et al., (2019) in order to visualize myofibrillar and sarcoplasmic proteins. Protein extracts were previously diluted (1:4 ratio) in a reducing and denaturing solution-2x Laemmli Sample Buffer (2.1 % SDS, BioRad) and 1 M dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich) (95:5, w:w), then heated at 95 °C for 3 min before loading. Electrophoresis was performed at 200 V for 30 min. After migration, the gels were fixed (ethanol:acetic acid, 40:60) for 30 min, and then stained with Coomassie blue overnight, after which decoloring was performed in 20% ethanol solution. Protein molecular weights were estimated using molecular weight markers ranging from 10 to 250 kDa (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards, Biorad).

2.3.4. Protein solubility index

Ten grams of powder were added into 100 ml water at 40 °C, mixed in a blender (Waring blender) for 90 sec at 3,800-4,000 rpm, and then centrifuged at 160g for 5 min at 20 °C. The protein solubility index (expressed as %) was calculated by the ratio of the protein concentration (Kjeldahl method) in the supernatant to that in the initial solution (before centrifugation). The analyses were performed in duplicate.

2.4. Gelling properties

2.4.1. Gelling temperature

The gelling temperature of the protein ingredients was determined by monitoring the viscoelastic properties of the solutions under a temperature gradient, following a protocol adapted from Xiao et al. (2020). The viscoelastic properties were evaluated using a MCR 301 rheometer (Anton Paar) equipped with a cone-plate system (diameter 49.96 mm, angle 1.996°, truncation 209 μm). The sample solution (1.5 ml) was deposited on the plate surface previously heated to 50 °C, and a fixed deformation rate of 1% and a constant frequency of 1 Hz were applied. The storage modulus (G') and the loss modulus (G'') were then recorded during cooling from 50 to 1 °C at 1 °C.min⁻¹. The gelling temperature was determined as the temperature at which G' and G'' cross or, if they do not cross, when G' becomes greater than 1 Pa. Only the WRP samples were analyzed, each in triplicate, because of insoluble solid particles present in GGRP samples.

2.4.2. Preparation of the gels

The gels were prepared by stirring (speed 3) the ingredient solutions in a Thermomix® food processor for 30 min at 50 °C for WRP, and 90 °C for GGRP. The gels made from gelatin powder (150 bloom and 240 bloom) were made in the same way at the two cooking times (50 °C and 90 °C). Then, the mixtures were cooled to 20 °C under stirring for about 30 min, before pouring the solutions into 2 cm-diameter plastic tubes (Krehalon, Deventer, Netherlands); pre-cooling was performed to avoid phase shift of the GGRP solutions during gel formation. The filled plastic tubes were then stored at 4 °C for 72 h before analysis.

2.4.3. Rupture strength and deformation

A uniaxial compression test was performed on gel cylinders of 1.5 cm height and 2 cm diameter until the gels broke, using a TA-plus texture analyzer (Lloyd Instruments, Elancourt, France), equipped with a flat cylindrical probe (4 cm diameter) and a 100 N load cell. The probe compression speed was 1 mm.s⁻¹. Data were recorded throughout the compression and analyzed using the Nexygen plus software (Lloyd Instruments, Elancourt, France). Force (N) and distance (cm) were measured at the time of the breakage; the distance measurement was used to calculate the deformation (expressed in %), dividing this value by the initial height of the gel sample. All experiments were triplicated.

2.4.4. Texture Profile Analysis (TPA test)

TPA-type tests were performed on gel cylinders 1.5 cm height and 2 cm diameter to access hardness, cohesiveness and adhesiveness (stickiness) parameters. The tests were performed using the aforementioned TA-plus texture analyzer, equipped with a 1.2 cm-diameter cylindrical probe and a 100 N load cell. A double compression cycle test was performed up to 33% deformation (5 mm) at a compression rate of 1 mm.s⁻¹. A rest period (5 sec) was applied between the two compressions. The

previously mentioned Nexygen plus software was used to record compression strength and distance throughout the test.

The hardness value was determined as the maximum force (N) required to apply a 33% deformation during the first compression. Cohesiveness (dimensionless), corresponding to the ability of the gel sample to recover its original shape after the deformation stops (deformation memory) was calculated by dividing the area under the curve (AUC) of the second compression by the AUC of the first compression. Adhesiveness (J) was defined as the work required to lift the gel off the probe as its ascent after the first compression (negative area between the curve and the x-axis after the first compression) (Bourne et al., 1978). Three replicates were performed for each sample.

2.4.5. *Water Holding capacity*

A uniaxial compression test was performed to measure the water holding capacity (WHC) of the gels. A 33% deformation (5 mm) of the gel cylinders (1.5 cm height and 2 cm diameter) was maintained for 3 min using the TA-plus texture analyzer equipped with a 4 cm-diameter plate and a 100 N load cell; the compression speed was 1 mm.s⁻¹. Each gel cylinder was previously placed on a filter paper that was weighed before and after compression. The WHC was calculated, according to a method adapted from Lechevalier et al., (2007), as the percentage of water retained in the gels, normalized by the initial weight of the gel cylinders, *i.e.* before compression:

$$\text{WHC (\%)} = \frac{M_0 - M_1}{M_0} \times 100 \quad [\text{Eq. 14}]$$

with M_0 the weight of the gel cylinder (g) before compression, and M_1 the amount of water released during compression (g). Three replicates were performed for each sample.

2.5. *Emulsifying properties*

2.5.1. *Emulsion preparation*

The oil/water emulsions were prepared by homogenizing the ingredient solutions and sunflower oil to a constant volume fraction (O:W 30:70, vol:w), using an Ultraturax rotor-stator system (IKA) at a speed of 20,000 rpm for 3 min at 50 °C.

2.5.2. *Droplet Size Distribution*

Lipid droplet size distribution was measured using a liquid laser scattering particle size analyzer (MasterSizer 2000, Malvern). The analyses were performed at room temperature immediately after the emulsions were prepared. A small amount (0.05–0.1 ml) of emulsion was introduced into the measuring cell of the apparatus containing ultrapure water (100 ml), in order to achieve 10% obscuration. The diluted emulsions were released at a constant, low flow rate of approximately 1 ml.min⁻¹. Typical droplet size distributions were related to three parameters, namely the mean droplet volume-surface diameter ($d_{3,2}$) (Eq. 15), the droplet volume ($d_{4,3}$) (Eq. 16), and the width of the droplet size distribution, *i.e.* the span (droplet polydispersity index) (Eq. 17). The $d_{3,2}$ parameter is more sensitive to the presence of fine particles, in contrast to $d_{4,3}$, which is more sensitive to the presence of large particles.

$$d_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad [\text{Eq. 15}]$$

$$d_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad [\text{Eq. 16}]$$

$$\text{Span} = \frac{(D_{90} - D_{10})}{D_{50}} \quad [\text{Eq. 17}]$$

with n_i the number of droplets of diameter d_i ; D_{10} , D_{50} and D_{90} the diameters at 10, 50 and 90 % of the cumulative volume, respectively.

2.5.3. Emulsion stability

The stability of the emulsions was estimated using the TURBISCAN Lab Expert apparatus (Formulation Company, France), based on dynamic light scattering using transmission and backscatter profiles. The emulsions were transferred into cylindrical flat-bottomed glass cells that were inserted into the device, and the measurement started immediately with a scan at 880 nm, at 50 °C, and at different times during 24 h (1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h). The principle of this measurement is based on the variation of the volume fraction of droplets (migration) or of their average size (coalescence), which leads to a variation of the signals (Mengual et al., 1999). Since the emulsions are opaque, their stability was measured by backscattering (BS). The signal variation was calculated as the difference between the signal at time 0 and at a given time. The stability of the emulsions was determined by the Turbiscan Stability Index (TSI) (Eq. 18), using the Turbiscan software:

$$\text{TSI} = \sum_i \frac{\sum_h |scan_i(h) - scan_{i-1}(h)|}{H} \quad [\text{Eq. 18}]$$

with $scan_i(h)$ the light intensity of the sample height at the scan time i ; $scan_{i-1}(h)$ the light intensity of the sample height at the previous scan time; and H the total sample height.

The TSI aggregates all destabilization phenomena occurring in the sample during backscattering. The lower the TSI values, the higher the stability of the emulsion.

2.6. Rheological properties

Steady flow tests were performed on the protein ingredient solutions by plotting the flow curves (shear rate vs. shear stress) using a rheometer with controlled stress (Rheometer, AR2000), and equipped with a stainless-steel cone plate geometry (60 mm diameter, 2° angle) and a solvent trap. Temperature was controlled with a Peltier device set at 50 °C ± 0.1 °C. The shear rate was set from 0.1 to 500 s⁻¹. The rheological parameters (shear stress and shear rate) were obtained from the software (TA Rheology Advantage Instrument Control). Since it offered the best fit for all samples, the Herschel-Bulkley flow model was selected:

$$\tau = \tau_0 + K(\dot{\gamma})^n \quad [\text{Eq. 19}]$$

with τ the shear stress (Pa); τ_0 the yield stress (Pa); K the consistency coefficient (Pa.s ^{n}); $\dot{\gamma}$ the shear rate (s⁻¹); and n the flow index (dimensionless).

This analysis was only performed on WRP as insoluble particles in GGRP samples could damage the device.

2.7. Statistical analyses

The data set for physicochemical characteristics and protein solubility index was subjected to multiple comparison of means (lsmeans adjust Tukey Contrast) with significance level set at $p < 0.05$, using R software (version 4.0.3). All results were expressed as mean \pm SD.

2.7.1. Modeling from CCD results

Experimental design and statistical analyses were performed using Statgraphics software (Statgraphics Technologies, Inc.), including performing regression analysis on the experimental data and plotting response surfaces. For each experimental factor, the variance was divided into components (linear, quadratic, and interaction) to assess the relative importance of these components and the suitability of the following second-order polynomial function:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i,j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad [\text{Eq. 20}]$$

with Y the estimated response; β_0 , a constant, β_i , β_{ii} , β_{ij} regression coefficients of the model; X_i , X_j , two independent variables among pH, protein concentration and added NaCl (ionic strength).

The significant effect of the equation parameters for each response variable was assessed by Fisher's test, with significance level set at $p < 0.05$ for all tests. Error was assessed from replication of treatment conditions at the central point.

After modeling each functional property studied for each protein ingredient as a function of pH, protein concentration and added NaCl, the optimum conditions to mimic the performances of the reference ingredients were determined. The reference ingredients were tested at pH 5.55, 0.2 M added NaCl (central values of the CCD), and 5% protein concentration for the gelatins, and 12.5% for the NaCas. Next, a multi-response optimization was performed, initially by sub-category (gel rupture properties, gel texture properties, size distribution of the lipid droplets, flow properties). Then, in a second stage, an optimization was carried out, grouping all the experimental results by functionality category (gelling or emulsifying properties, or flow behavior). In order to combine the various responses into a single function that can be optimized, a desirability function has been defined for each response (Derringer & Suich, 1980; Polhemus, 2005). The function $d(y)$ expresses the desirability of a response value equal to y on a scale of 0 to 1. For a response to be maintained at a given value, the desirability function is defined as follows:

$$d = \begin{cases} 0 & \hat{y} > \text{low} \\ \left(\frac{\hat{y} - \text{low}}{\text{target} - \text{low}} \right)^S & \text{low} \leq \hat{y} \leq \text{target} \\ \left(\frac{\hat{y} - \text{high}}{\text{target} - \text{high}} \right)^S & \text{target} \leq \hat{y} \leq \text{high} \\ 0 & \hat{y} < \text{high} \end{cases} \quad [\text{Eq. 21}]$$

where \hat{y} is the expected value of the response; low is a value below which the response is not acceptable; and high is a value above which desirability is at its maximum. The parameter S defines the form of the function; $S =$ sensitivity of the response, defined as 1 for "medium". The desirability rises linearly from 0 at the low value to 1 at the high value.

To combine the desirability of *the m* responses, a single function *D* was created. Since all responses were considered to have the same importance, the composite function was defined as the geometric mean of separate desirability values:

$$D = \{d_1 d_2 \dots d_m\}^{1/m} \quad [\text{Eq. 22}]$$

2.7.2. *Principal Component Analyses (PCA)*

Principal Component Analyses (PCA) were carried out on gelling properties data (except gelling temperature that was not measured for GGRP) on one hand, and emulsifying properties data on the other hand, to highlight the correlations between the variables, and to characterize the two protein ingredients with regard to these variables. Parameters describing gelling and emulsifying properties were used as active variables, while pH, protein concentration, ionic strength and protein solubility index were used as supplementary variables. The commercial beef gelatins and NaCas were included as supplementary individuals. The PCA analyses were performed using the FactoMineR package of the R software (version 4.0.3) (Lê et al., 2008). The variables were automatically standardized (centered mean and scaled) by the software to give them all the same importance.

3. Beef protein ingredients from fat rendering process are promising functional ingredients

Rozenn Le Foll^a, Valérie Lechevalier^a, Pascaline Hamon^a, Catherine Guérin-Dubiard^a, Xavier Lambert^b, Amélie Deglaire^a, Françoise Nau^{a,*}

^aINRAE, Institut Agro, STLO, 35042 Rennes, France

^bCORNILLE sas, 35500 Cornillé, France

Keyword : Animal co-product; Beef protein; Collagen; Solubility; Gelation; Emulsification

Article published in *Food Chemistry* as an Original Research article

[10.1016/j.foodchem.2023.137298](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137298)

Food Chemistry 433 (2024) 137298



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

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



Beef protein ingredients from fat rendering process are promising functional ingredients

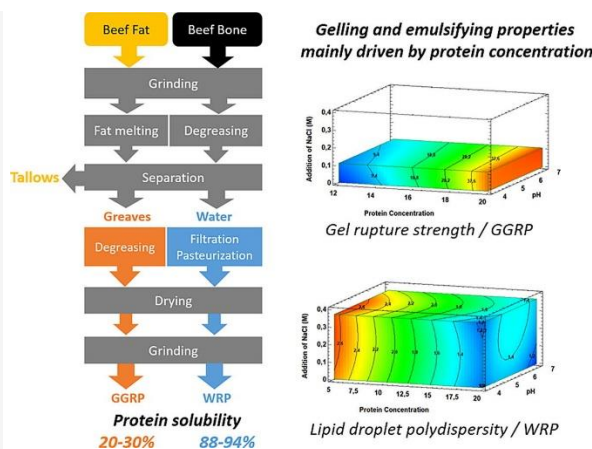
Rozenn Le Foll^a, Valérie Lechevalier^a, Pascaline Hamon^a, Catherine Guérin-Dubiard^a, Xavier Lambert^b, Amélie Deglaire^a, Françoise Nau^{a,*}

^aINRAE, Institut Agro, STLO, 35042 Rennes, France

^bCORNILLE sas, 35500 Cornillé, France

Highlights

- Two innovative protein coproducts from beef fat rendering process have been studied.
- The coproduct derived from water recovery has the highest protein solubility.
- The protein solubility of the two coproducts is very little affected by pH and NaCl.
- Both coproducts can express their functionalities regardless of pH and NaCl.
- Both coproducts can be used in a variety of foods as gelling agents and emulsifiers.



3.1. Abstract

The valorization of co-products may be a promising way to meet the dual challenge of increasing global food resources and sustainability of food systems. In particular, meat co-products may be nutritionally interesting protein resources, if they offer functional properties in accordance with food applications. In that aim, two bovine co-products, resulting from the fat rendering process, have been characterized, regarding the protein solubility, gelling, and emulsifying properties. The effect of protein concentration, pH variation and NaCl addition on these properties was tested. Despite an effect of the ionic strength on the protein solubility of the two ingredients, a little or no significant impact was observed on the functionalities. Similarly, the functional properties were scarcely affected by pH. In the end, the protein concentration has proven to be the only important parameter, which points to an easy utilization of these ingredients in many food conditions.

3.2. Results and Discussion

3.2.1. Composition of the two dehydrated beef protein ingredients

The composition of the two protein ingredients is given in Table 14. The dry matter content is close to 95 % for the two ingredients of which protein is the main component. The protein content (62.32 % in WRP vs. 83.71 % in GGRP) is high as compared with other meat co-products or processing streams, such as water recovered after freeze drying (30/40%)(Mullen & Álvarez, 2016).

Table 14: Physicochemical characteristics of dehydrated Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) ingredients (mean \pm SD, n = 3). On a given lane, different letters and grey intensity indicate significant difference obtained from multiple comparison of means (Tukey test, p < 0.05).

	WRP	GGRP
Dry matter (%)	94.90 _a \pm 0.06	95.38 _a \pm 0.32
Protein (%) among which	62.32 _a \pm 0.00	83.71 _b \pm 1.17
% Soluble in 0.05 M phosphate buffer pH 7.5	80.27 _a \pm 0.11	12.43 _b \pm 0.04
% Soluble in 0.45 M KCl phosphate buffer pH 7.5	2.37 _a \pm 0.01	3.50 _b \pm 0.22
% Insoluble	4.36 _a \pm 0.03	70.46 _b \pm 1.73
Collagen (%)	40.03 _a \pm 1.69	36.83 _a \pm 0.18
Fat (%)	13.23 _a \pm 0.25	9.07 _b \pm 0.38
Ash (%) among which	9.17 _a \pm 0.04	2.48 _b \pm 0.63
NaCl (%)	5.96 _a \pm 0.00	0.60 _b \pm 0.02
pH	5.55	6.00

Between the two ingredients, GGRP has the highest protein content, and the lowest fat (9.07 %) and ash content (2.48 %) in comparison with WRP (13.23 % fat; 9.17 % ash). Moreover, GGRP pH is slightly higher (6.00 vs. 5.55). Actually, GGRP has a composition similar to beef greaves: 95.8 % dry matter; 92.1 % protein; 34 % collagen; 9.6 % fat; 1.7 % ash; pH 6.75, as reported by Jobling, (1994). However, GGRP and WRP are difficult to compare with other co-products described in literature, as the composition depends on each particular type of co-product and the animal species from which they originate (Toldrá et al., 2016).

Protein separation showed that 80.27 % of total proteins in WRP are soluble at low ionic strength (hereafter named as “soluble”), while 2.37 % were soluble at high salt concentration, and 4.36 % were insoluble (Table 14). On the contrary, only 12.43 % of total GGRP proteins were soluble, 3.50 % were soluble at high ionic strength, and 70.46 % were insoluble. Hence, very few proteins are soluble in GGRP unlike WRP, consistently with the processes applied to obtain these two ingredients. Indeed, as a reminder, WRP is obtained from water recovered during the fat rendering process of beef meat and during the bone degreasing process, whereas GGRP is derived from greasy greaves, which are solid protein products. Thus, it is assumed that the collagen present in WRP (40.03 %) is mainly soluble collagen, unlike that contained in GGRP (36.83 %). However, because of high temperatures and extreme conditions to which proteins have been subjected during the extraction process, it is not possible to identify with certainty the nature of the constituent proteins of each of the fractions separated based on solubility. It is therefore likely that the soluble fraction does not correspond solely to sarcoplasmic proteins. This fraction could also contain hydrolysis products of other proteins and, as mentioned above, soluble collagen. Similarly, the fraction soluble at high ionic strength probably contains more than just myofibrillar proteins.

These hypotheses are supported by the SDS-PAGE profiles of GGRP and WRP (Figure 24), which did not allow for a clear separation of proteins or profiles characteristic of muscle proteins, except a band at 15 kDa that could correspond to myoglobin (17 kDa) and/or hemoglobin (16–18 kDa) (Grujić et al., 2018). However, SDS-PAGE mainly reveals smears that suggest the presence of hydrolysis products in large quantities and of very variable size. In particular, low molecular weight components (8–12 kDa) may be small proteins and/or peptides of collagen, as suggested by Álvarez et al. (2018). Consistently with the overall composition (Table 14) and the production processes, it should be noted that the SDS-PAGE profiles of WRP proteins that are soluble at low or high ionic strength, and that of GGRP are not exactly the same. Such differences in the protein profiles may induce different functional properties.

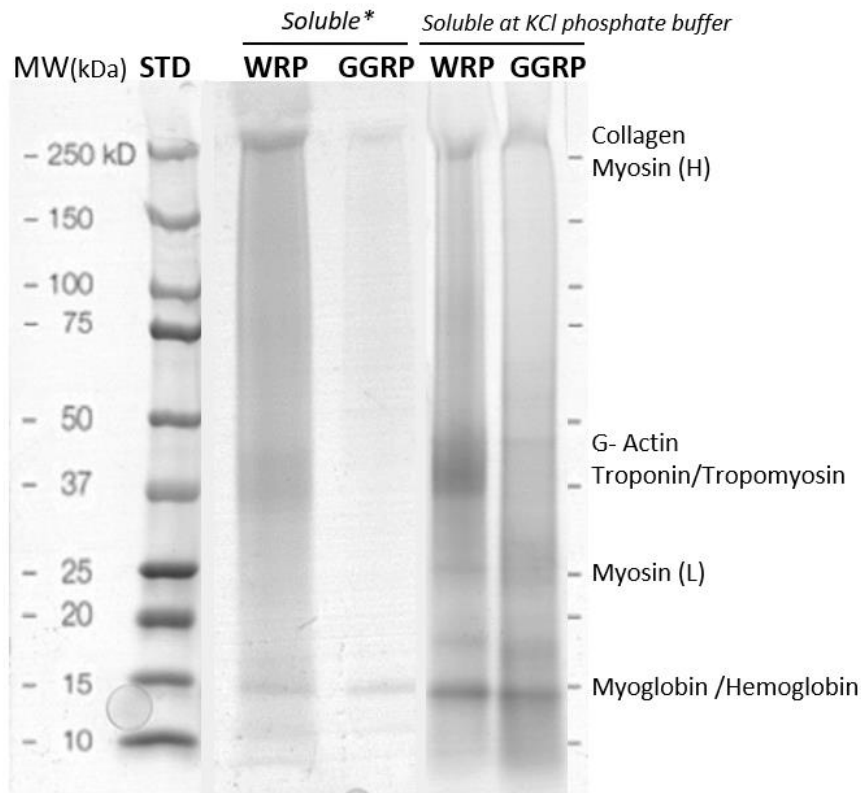


Figure 24: SDS-PAGE profiles (4-20 % acrylamide) of the soluble proteins contained in Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) ingredients. Extraction was performed either at low ionic strength (*soluble in 50 mM phosphate buffer pH 7.5), or at high ionic strength (soluble in 0.45 M KCl phosphate buffer pH 7.5). MW = molecular weight; STD: molecular weight standards.

3.2.2. Protein solubility is more sensitive to ionic strength than to pH

The protein solubility index of WRP varies between 88 % and 94 % regardless of the pH and the ionic strength (Figure 25A). Such high values are reported in the literature for sarcoplasmic proteins, which are described as highly soluble in water and low ionic strength solutions (Xiong, 2018). In contrast, the protein solubility index of GGRP is much lower, ranging from 20 to 30 % depending on the conditions (Figure 25B). These low values are characteristic of stromal proteins, *i.e.* proteins that are substantially insoluble in neutral saline solutions of low or high ionic strength (< 0.5 M) (Kijowski, 2001).

It is widely accepted that the solubility of a protein highly depends on pH and/or ionic strength. However, the effect of pH on protein solubility appears very limited for the two ingredients studied here, except at low ionic strength. In this condition (0 M NaCl added), the protein solubility significantly decreases at pH 4 for WRP (Figure 25A), while that of GGRP increases at pH 4 (Figure 25B). In contrast, the ionic strength has a significant impact on the protein solubility regardless of the pH, and that for the two ingredients.

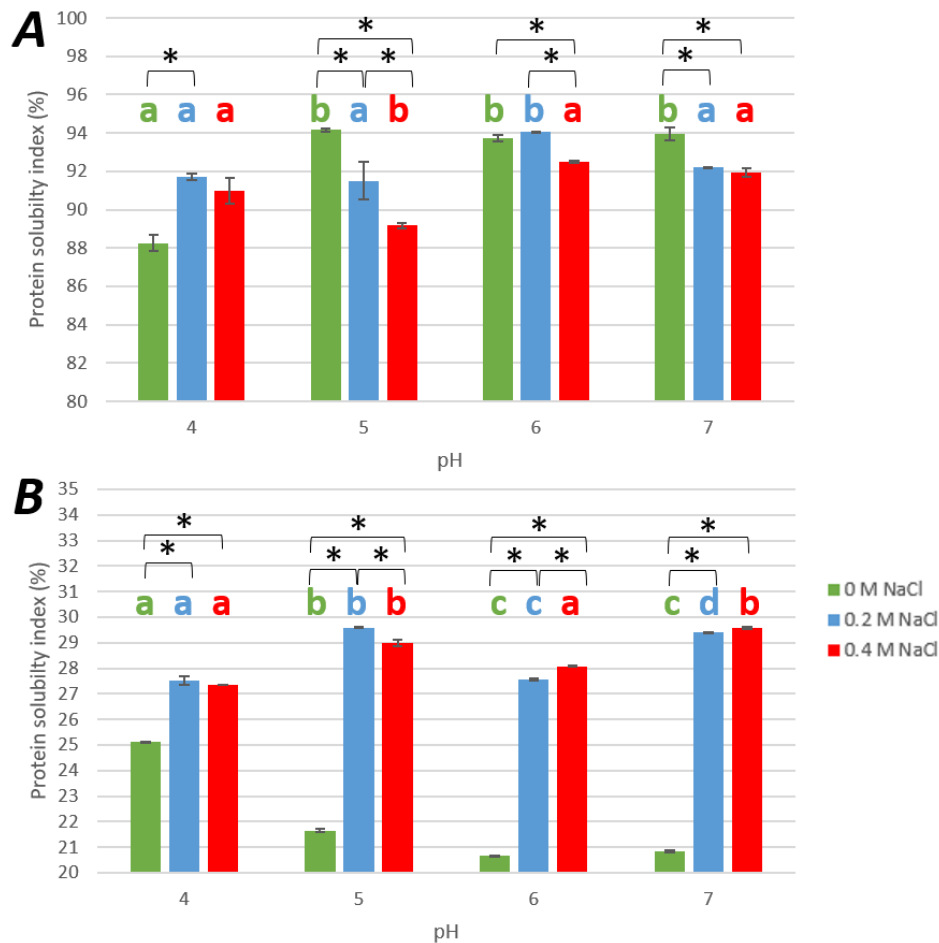


Figure 25: Protein solubility index of Water Recovered Protein (WRP, A) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP, B) depending on pH and concentration of added NaCl (mean \pm SD, $n = 2$). For a given concentration of added NaCl (green bars, 0 M; blue bars, 0.2 M; red bars, 0.4 M), different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) between pH. For a given pH, * indicates a significant difference ($p < 0.05$) between added NaCl concentrations. The multiple comparisons of means were performed using the post-hoc Tukey test.

Except at pH 4, WRP solubility tends to decrease when the ionic strength increases. The decrease is significant after adding 0.2 M and 0.4 M NaCl at pH 5 and pH 7, and only after adding 0.4 M NaCl at pH 6. Considering the NaCl content naturally present in WRP ingredient (5.96 %; Table 14), the 10 % solutions prepared for protein solubility measurement (see section 2.3.4.) contained initially about 0.6 % NaCl, and up to 1.8 % to 2.9 % NaCl after 0.2 or 0.4 M addition, respectively. Yet, WRP ingredient mainly consists of soluble collagen (64.2 % of total proteins; Table 14), the solubility of which decreases above 1 % NaCl (Jeevithan et al., 2014). Thus, it is likely that after addition of 0.2 M NaCl, and even more 0.4 M NaCl, the WRP solution was in ionic strength conditions of lower protein solubility as compared with the solutions without NaCl addition.

On the opposite, whatever the pH, the protein solubility of GGRP increases with the ionic strength (Figure 25B). The ten percentage points increase or approximately, measured from pH 5 to pH 7 after adding 0.2 M or 0.4 M NaCl could be related to sarcoplasmic and myofibrillar proteins (about 16 % of GGRP proteins; Table 14), since these proteins are more soluble in salty conditions (Song et al., 2020).

At pH 4, the protein solubility increase due to salt addition is lower (about 2.5 percentage points), but still significant, due to a much higher solubility at low ionic strength at this pH than at other pH values. This could be due to the presence of collagen, since beef collagen can be dissolved up to a few percent in a solution of neutral salts, or in acidic solutions (0.6 % soluble with salt, 2.6 % soluble with acid) (Kijowski, 2001).

3.2.3. *Protein concentration is by far the most decisive factor in gelling properties, far more the pH or ionic strength*

The formation of gel confers functional attributes (texture) important for the manufacture of many foods. A large number of proteins exhibit gelling capacity, which is influenced by pH, ionic strength, temperature, protein concentration, and of course by the nature of the proteins (Zayas, 1997). The ability to gelation is a key functional property of muscle proteins (Xiong, 2018), and in particular, bovine co-product proteins are considered as potential food ingredients when a gel-like texture is desired.

In the present study, the gelation is assumed to result from myofibrillar proteins and from gelatin. Myofibrillar proteins, namely myosin, coagulate with heat, and are widely known for their gelling properties (Sun & Holley, 2011). Gelatin, which is obtained by the heat treatment of collagen, is extensively used in food industry (Gómez-Guillén et al., 2011) as a gelling agent in the cold state. In addition, sarcoplasmic proteins may contribute to gelation when the ionic strength is low (< 0.4 M), and after thermal coagulation (greater than 40 °C) (Zayas, 1997).

Gels can be defined by different characteristics, which require different analyses to study their rheological and textural properties, and their ability to immobilize a liquid (water retention). In the present study, gelling properties, *i.e.* gelling temperature, gel rupture strength and deformation, gel hardness, cohesiveness, adhesiveness and WHC, have been measured (*Supplementary data*, Table S1) on all samples from the experimental design described in Table 13. As a reminder, the experimental design carried out for GGRP is different from that of WRP, in that the protein concentrations tested were higher for GGRP (Table 13). Indeed, the two ingredients have different critical concentrations, *i.e.* minimum protein concentrations for gelation. Only 5 % protein of WRP is enough to form a gel, while it is necessary to increase protein concentration up to 12 % for GGRP. This difference may be related to their different protein composition (Table 14), leading to different protein networks.

In order to assess the relative impact of pH, protein concentration, and ionic strength on the gelling properties of WRP and GGRP, regression analyses of all experimental data have been carried out for all gel properties. Except the cohesiveness model for WRP, the resulting quadratic models (Table 15) reveal high R² values: 79.20 % to 96.95 % of the variation in the experimental data are explained by the estimated equations. However, it should be noted that the quality of the models is the poorest for gel cohesiveness and adhesiveness, with R² values ranging from 74.53 to 80.10 %, and from 79.20 to 79.76 %, respectively.

Table 15: Regression coefficients and analysis of variance of the regression models for the gelling properties of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) ingredients. C: protein concentration; I: ionic strength; ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 (exact p-values are given in Supplementary Table S2) . SEE : standard error of estimation; MAE: mean absolute error.

Coefficients	Gelling T° (°C)	Rupture strength (N)		Deformation at the rupture (%)		Hardness (N)		Cohesiveness		Adhesiveness (J)		Water holding capacity (%)	
	WRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP
Constant	27.45	34.29	21.53	56.40	41.46	1.34	3.55	0.92	0.70	1.29	1.96	99.81	99.71
<i>Linear</i>													
pH	-0.15	-0.07	1.69	0.31	0.28	-0.04	0.24	0.002	0.016	-0.01	-0.07	0.02	0.02***
C	7.63 ***	25.92 ***	12.03 ***	2.88 ***	1.24 **	0.99 ***	1.81 ***	-0.01 *	0.03 **	-0.02 *	-0.19 **	0.15 ***	0.06 **
I	-0.49	-3.07	-0.31	0.4	1.39***	-0.13	-0.13	-0.01	0.01	-0.01	-0.03	0.01	0.03*
<i>Interaction</i>													
pH x C	0.23	-1.59	-0.35	-0.27	-0.23	-0.1	-0.06	0.01	-0.01	-0.01	0.02	-0.01	-0.01
pH x I	-1.21	2.1	0.54	0.11	0.07	0.05	0.08	-0.01 *	-0.01	0.01	0.02	0.01	0.01
C x I	-0.26	-2.47	-1.54	-0.05	-0.45	-0.12	-0.19	-0.01	0.01	0.01	-0.02	-0.01	0.01
<i>Quadratic</i>													
pH x pH	-3.13*	-0.9	-0.01	0.8	0.08	-0.07	-0.10	-0.01	0.01	0.01	-0.05	0.01	0.01
C x C	-3.61 *	1.83	2.79	-0.14	0.1	0.09	0.45	-0.01	-0.01	0.03 **	0.30	-0.1 **	-0.01
I x I	-2.63	1.15	-1.71	0.3	-0.72	0.01	-0.27	0.01	-0.01	0.01	0.08	0.013	-0.02
R²	90.95	96.95	94.52	92.76	88.20	96.62	93.80	74.53	80.10	79.20	79.76	92.28	89.89
R² adj	80.76	93.52	88.36	84.63	74.93	92.81	88.83	45.88	61.06	55.80	60.18	83.59	78.53
SEE	3.44	5.72	3.69	1.03	0.90	0.23	0.59	0.01	0.02	0.02	0.14	0.06	0.03
MAE	1.66	3.26	2.23	0.54	0.49	0.13	0.36	0.01	0.01	0.01	0.07	0.03	0.01
P-values	0.003	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.018	0.021	0.022	0.023	0.00	0.003

The most striking finding is the predominant effect of protein concentration that affects significantly all the gelling properties measured (Table 15). In particular, the WRP gelling temperature increases from 12.96 to 28.86 °C with protein concentration increase from 5 to 20 % (while pH and added NaCl are 5.55 and 0.2 M, respectively), as well as the gel rupture strength (from 4.59 to 76.79 N) and deformation (from 51.99 to 59.69 %), hardness (from 0.20 to 3.11 N), and WHC (from 99.29 to 99.89 %) (*Supplementary data*, Table S1). Similarly, for GGRP, protein concentration increase from 12 to 20 %, at pH 5.55 and 0.2 M added NaCl, results in an increase of the gel rupture strength (from 7.43 to 45.51 N) and deformation (from 39.57 to 44.04 %), hardness (from 1.37 to 7.47 N) and WHC (from 99.58 to 99.76 %) (*Supplementary data*, Table S1). Regarding the gelling temperature, it is quite difficult to compare our results to literature data, since the cooling rate of the protein solutions, which was 1 °C.min⁻¹ in the present study, can influence the value of the gelling point (Zayas, 1997). However, it seems reasonable to assume that the gelation occurs earlier during the cooling of the solutions when the protein concentration increases, because it enhances the probability of encountering between protein molecules, and consequently it favors protein–protein interactions. Likewise, since protein–protein and protein–solvent interactions are promoted when protein concentration increases, leading to a denser protein network able to retain water inside the gel (Zayas, 1997), it is therefore logical to see an increase in the gel rupture strength and deformation, hardness, and WHC with protein concentration.

On the opposite, gel cohesiveness and adhesiveness either increase or decrease as protein concentration increases, as indicated by the positive (gel cohesiveness of GGRP) vs. negative (gel adhesiveness of WRP and GGRP, and gel cohesiveness of WRP) coefficients (Table 15). The texture of the gels prepared with WRP and GGRP ingredients is thus different. These differences could be due either to the composition and solubility of the proteins these ingredients are made of, and/or to a different organization of the proteins during gelation. Indeed, gelation is reported highly dependent on the type of meat proteins and the method by which these proteins are extracted (Zayas, 1997). Nonetheless, these results are overall consistent with the literature data dedicated to the gel texture of beef gelatin (Rahman & Al-Mahrouqi, 2009), which suggests that gelatin (or soluble collagen) plays a major role in the gelling properties of the two ingredients studied here, even if it is not the main protein component, in particular in GGRP. Thus, it was reported that the hardness of beef gelatin increases significantly as protein concentration increases (Rahman & Al-Mahrouqi, 2009), as it is observed in the present study for the two ingredients. A significant decrease of the adhesiveness of beef gelatin gels as the protein concentration increases has been also reported, as it is observed here for GGRP and WRP. In terms of cohesiveness, WRP exhibits a different behavior than GGRP, with a cohesiveness value that decreases with increasing protein concentration. This could result from the quite high fat content in WRP (13.23 %), as compared to GGRP (9.07 %), by analogy with the negative effect of lipids on gel cohesiveness of beef ground patties, likely due to the weakening of the internal bonds of the protein matrix (Troutt et al., 1992).

Moreover, a quadratic effect of protein concentration is observed on the one hand on gelling temperature, gel adhesiveness and WHC of WRP (Table 15), which means there is a protein concentration from which the effect on these properties is reversed (Figure 26). Thus, in the experimental range of protein concentration, maximum values are measured for WRP for gelling temperature (31.5 °C at 18.1 % protein, pH 5.53 and 0.17 M added NaCl), and WHC (99.91 % at 16.4 % protein, pH 7, 0.33 M added NaCl), whereas a minimum value is measured for adhesiveness (1.27 J at 12.7 % protein, pH 5.46, 0.4 M added NaCl).

On the opposite, the effect of pH and ionic strength on the gelling properties of WRP and GGRP is much more marginal. Table 15 indicates a significant impact of pH on the WHC of GGRP gels, which increases with pH, and a quadratic effect of pH on the gelling temperature of WRP, with a maximum (31.54 °C) at pH 5.53 (and 18.1% protein, 0.17 M added NaCl) (Figure 26). The marginal role of pH can be explained by the fact that pH mainly modifies the solubility of myofibrillar proteins (Zayas, 1997) that can be assumed very minor proteins in the two ingredients (2.37 to 3.50 % proteins soluble at high ionic strength; Table 14), compared to soluble (in WRP) or insoluble (in GGRP) proteins.

GGRP is the ingredient for which gelling properties are the most sensitive to ionic strength, as the WHC and the gel deformation at the rupture increase with ionic strength (Table 15). The positive effect of NaCl addition on the deformation at the rupture of the gels suggest that, despite their low concentration in GGRP, the proteins soluble at high ionic strength play a certain role in this property of the gels. These proteins may be myofibrillar proteins, the solubility of which is known to be increased in salty conditions (Song et al., 2020). Furthermore, the conformation of meat proteins is influenced by ionic strength, which is determining for gelling properties since gelation results from protein-protein and protein-solvent interactions (Zayas, 1997). Similarly, the WHC of the GGRP gels significantly increases with ionic strength (Table 15; Figure 26) probably because of the increase in protein solubility (Figure 25B), since the literature mentioned that the WHC of muscle proteins highly depends on the NaCl concentration (Zayas, 1997). In addition, WHC of the GGRP gels also significantly increases with pH, consistently with the literature that reported a higher pH combined with the presence of collagen and other connective tissue proteins may be responsible for higher WHC (Devatkal et al., 2004).

It is interesting to note that the low impact of ionic strength and pH on the texture of the gels prepared with WRP and GGRP should be regarded as a positive point, as these ingredients can therefore be considered in many food applications, without constraint related to these two key physicochemical parameters in food science and food technology.

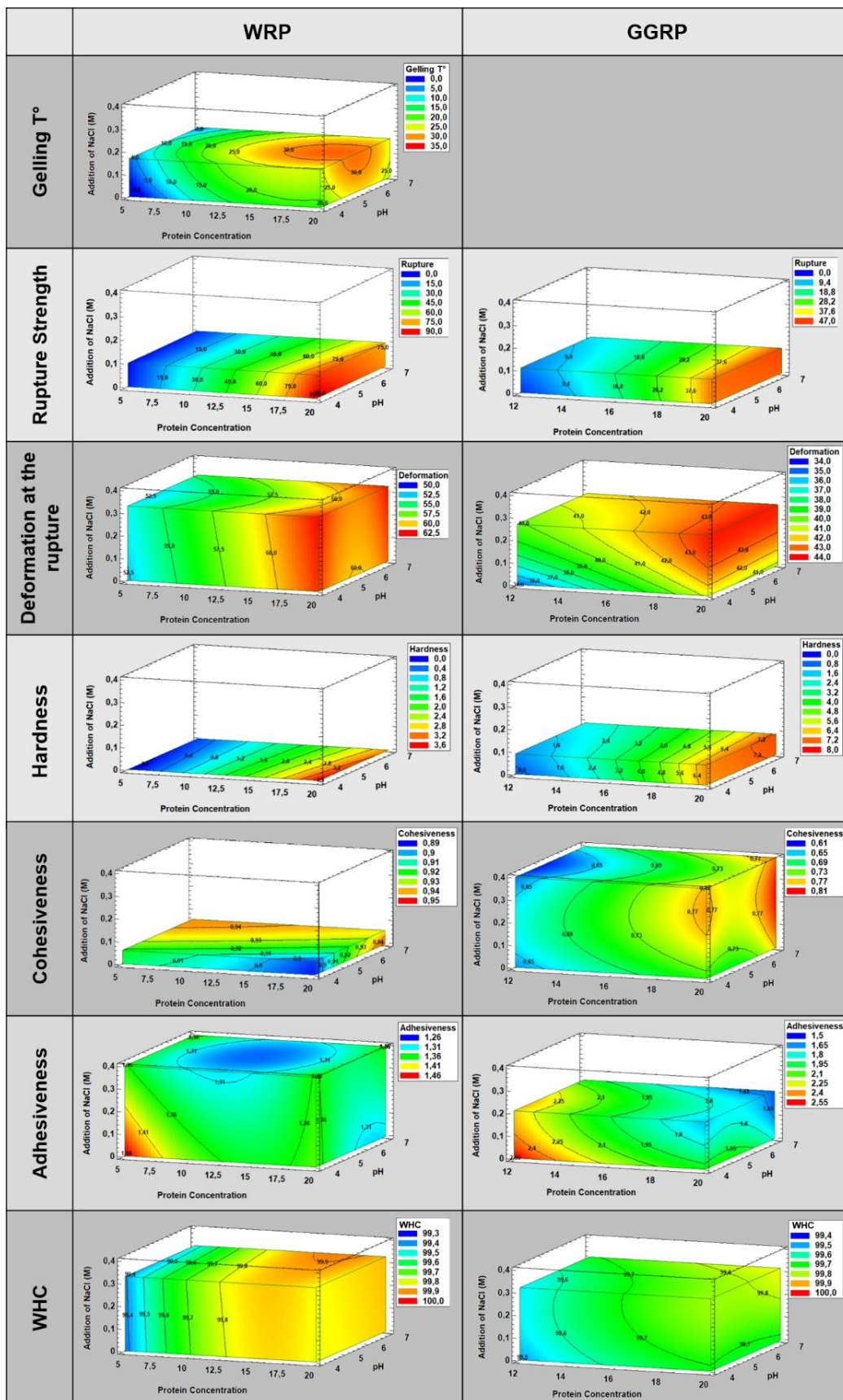


Figure 26: Gelling properties of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) depending on protein concentration, pH, and ionic strength. The added NaCl level set for the cross-section of response surfaces is that corresponding to the optimum for each characteristic (maximum value, except for adhesiveness, for which the optimum is the minimum value).

3.2.4. *Emulsifying properties are mainly driven by protein concentration and pH*

Many foods are oil/water emulsions, the sensory qualities of which (creaminess, smoothness...) are very appreciated by consumers. Unfortunately, these food systems are thermodynamically unstable, and therefore require emulsifying agents to help emulsion formation, but more importantly, to stabilize the emulsions created. Emulsifying properties highly depend on the type and concentration of the emulsifier, pH, ionic strength and temperature, especially as the emulsifier is a protein (McClements, 2004). The emulsifying properties of WRP and GGRP may be due to the presence of collagen that is a good emulsifier (Gómez-Guillén et al., 2011). In addition, the presence of myofibrillar proteins (myosin) may also contribute to this functionality (Xiong, 2018).

In the present study, the emulsifying properties have been evaluated by measuring the size ($d_{3,2}$ and $d_{4,3}$ parameters) and polydispersity index (span) of the lipid droplets, and the destabilization phenomena during storage at 50 °C for 24 h (TSI index); the lower the TSI value, the more stable the emulsion. The temperature was chosen in order to avoid any gelation of the emulsions, which may bias the measurement of their stability. Moreover, emulsion stability was measured over a 24-hour period only, on the understanding that GGRP and WRP are mainly intended as emulsifying agents whose role would be to facilitate emulsion formation in meat products (such as sausages, liver mousse, etc.), while the subsequent cooking step sets the structure.

A regression analysis of all the experimental data, which are available in Supplementary Table S3, has been carried out in order to assess the relative impact of pH, protein concentration, and ionic strength on the emulsifying properties of WRP and GGRP (Table 16). In order to make the reading of Table 16 easier, the emulsion stability model is presented for TSI measurement after 1 h storage only; the TSI models corresponding to all storage durations are presented in supplementary data (Table S5 and Figure S1).

Except the $d_{3,2}$ model for WRP, and the $d_{4,3}$ and span models for GGRP, the quadratic models determined from the experimental results were all highly significant, with R^2 values ranging from 84.80 % to 97.56 % (Table 16), meaning that the variation in the experimental data is explained satisfactorily by the estimated models.

Table 16: Regression coefficients and analysis of variance of the regression models for the emulsifying properties of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP ingredients). C: protein concentration; I: ionic strength; TSI : Turbiscan Stability Index; the shaded columns indicate not significant models; ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 (exact p-values are given in Supplementary Table S4). SEE : standard error of estimation; MAE: mean absolute error.

	d _{3,2} (µm)		d _{4,3} (µm)		Span		TSI 1h	
	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP
Constant	9.15	41.93	24.80	239.13	1.91	3.88	22.98	7.42
<i>Linear</i>								
pH	-0.11	-3.91	-1.73	-2.08	-0.08*	-0.17	1.25	-2.13**
C	-0.47	16.49 ***	-4.56 ***	27.17	-0.41 ***	-0.34	-10.57 ***	-4.14 ***
I	-0.28	4.76	0.18	25.03	0.06	-0.40	-0.25	-1.66*
<i>Interaction</i>								
pH x C	0.64	-7.54	4.46**	0.86	0.07	0.14	-0.86	1.31
pH x I	0.29	3.58	0.87	-0.90	0.04	0.24	-0.48	0.41
C x I	-0.28	-4.50	-0.30	-35.06	-0.02	0.31	0.26	1.56*
<i>Quadratic</i>								
pH x pH	0.28	5.37	-2.78*	29.24	-0.09*	-0.23	-2.87**	2.74**
C x C	-0.21	11.93*	-2.73*	13.98	0.04	-0.12	-5.04***	-0.079
I x I	0.35	1.71	0.73	3.68	-0.03	0.28	-1.34	0.42
R²	55.89	84.80	90.93	63.65	96.24	64.31	97.56	93.53
R² adj	6.26	73.03	81.61	22.75	92.3	24.17	94.82	86.25
SEE	1.01	11.42	2.68	49.82	0.10	0.66	2.27	1.83
MAE	0.53	6.03	1.34	29.03	0.05	0.35	1.25	0.94
p-values	0.44	0.01	0.003	0.27	0.00	0.26	0.000	0.0007

As for gelling properties, protein concentration appears as the main variable that significantly influences the emulsifying properties of the WRP and GGRP ingredients. Among the five significant regression models, protein concentration significantly affects all the parameters measured for the two ingredients (Table 16). For WRP, the coefficients of protein concentration in the droplet size and span models are negative, indicating that the increase in protein concentration induces smaller droplets with a lower polydispersity index. Specifically, as protein concentration increases from 5 to 20 % (while pH and added NaCl are 5.55 and 0.2 M, respectively), d_{4,3} decreases from 23.96 to 10.56 µm, and span index decreases from 2.66 to 1.41 (*Supplementary data*, Table S3). This can be explained by more proteins available to cover the surface of the droplets, consistently with Tcholakova et al. (2003). At the same time, the emulsion stability increases, as indicated by the negative coefficient of TSI, which is actually an instability index (Table 16). Thus, TSI-1 h decreases from 25.80 to 1.90 (*Supplementary data*, Table S3). This is in agreement with the known relationship between an increased protein concentration and a limited destabilization by coalescence (Delahaije et al., 2015). On the opposite, the droplet size (d_{3,2}) of GGRP emulsions increases (from 40.72 to 76.28 µm) with protein concentration increase from 5 to 20 % (*Supplementary data*, Table S3). However, this may be an artefact due to the low solubility of GGRP proteins (from 20 % to 30 %; Figure 25B), making that particle size analysis could include indiscriminately both lipid droplets and insoluble particles. Furthermore, as for WRP and as expected,

the stability of GGRP emulsions increases (TSI-1 h decreases from 11.10 to 4.60) with protein concentration (from 5 to 20 %) (Table 16; *Supplementary data*, Table S3). Indeed, in spite of the low protein solubility of GGRP, as the protein concentration increases, the quantity of soluble proteins also increases, thus likely contributing to the formation of a more viscoelastic interface (Bos & van Vliet, 2001). In addition, quadratic effects of protein concentration are significant (Table 16), indicating the existence of maximum or minimum values (Figure 27). Hence, for GGRP, $d_{3,2}$ is minimum (27.36 μm) when protein concentration is 7.74 % (and pH 5.73, 0 M added NaCl), and for WRP, $d_{4,3}$ is maximum (33.08 μm) when protein concentration is 5 % (and pH 4.25, 0 M added NaCl), while emulsion stability is minimum (maximum TSI-1 h of 28.94) when protein concentration is 6.74 % (and pH 5.92, 0.16 M added NaCl).

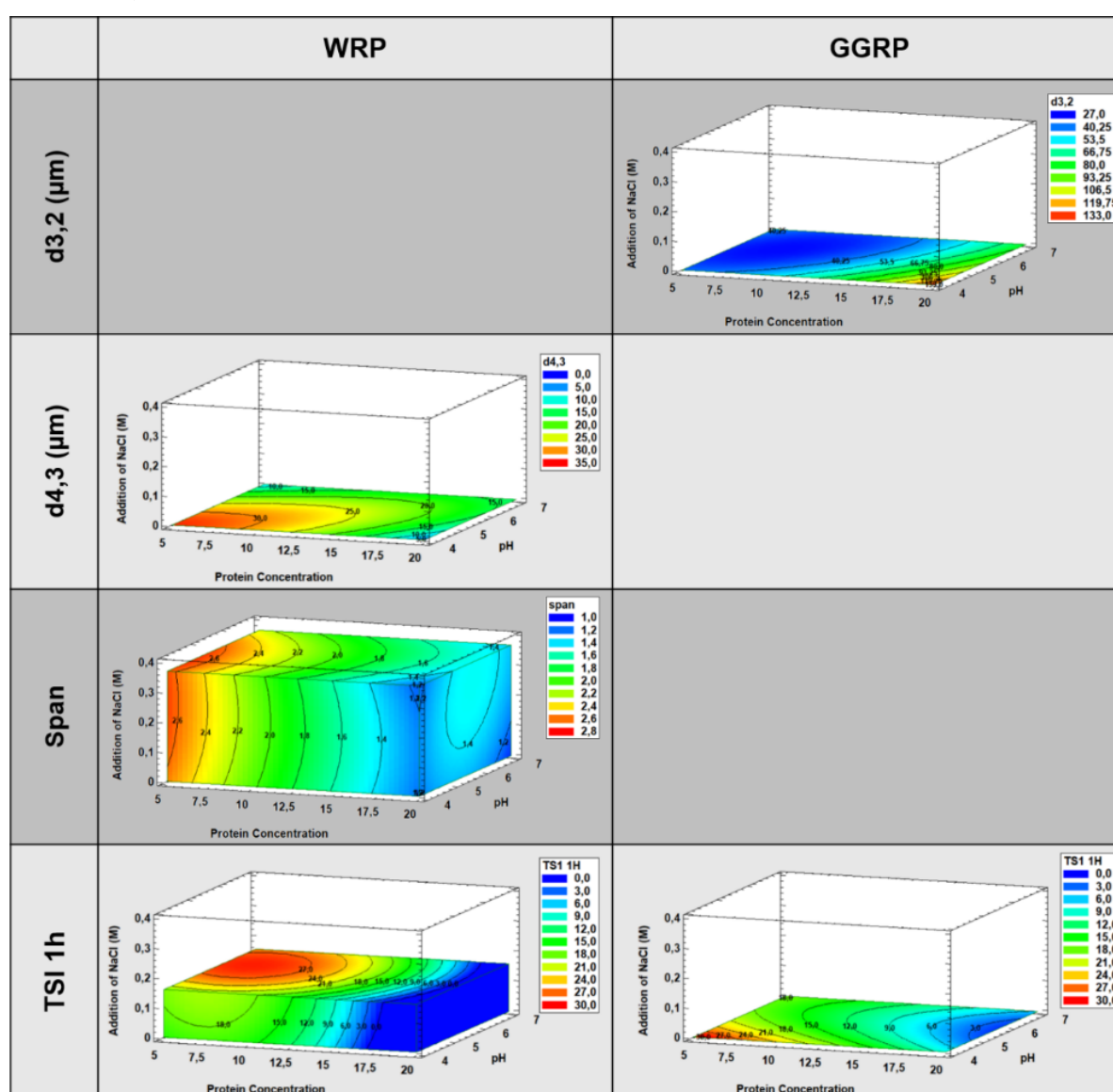


Figure 27: Emulsifying properties of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) depending on protein concentration, pH, and ionic strength. TSI : Turbiscan Stability Index. Response surfaces are presented only when the quadratic regression models were significant. The added NaCl level set for the cross-section of response surfaces is that corresponding to the optimum for each characteristic (minimum value).

In addition to the main influence of protein concentration presented above, it turns out that pH has also a significant effect on several characteristics of the emulsions (Table 16). Thus, the polydispersity index (span) of the WRP emulsions decreases (from 1.82 to 1.71) as pH increases (from pH 4 to pH 7, while protein concentration and added NaCl are 12.5 % and 0.2 M, respectively) (Table 16; *Supplementary data*, Table S3). This is likely because of the trend towards an increased protein solubility at higher pH (Figure 25A), since the more soluble proteins in solution, the more proteins available to emulsify the lipid fraction. Moreover, a decreased emulsifying capacity of proteins has been suggested at pH close to the isoelectric point (pI) (Cheftel et al., 1985). Yet, WRP is mainly composed of soluble proteins (Table 14), potentially including sarcoplasmic proteins, the pIs of which are close to pH 4. Then, in the experimental domain of the present study, pH increase could mean pH farther from pI. In addition, at a pH far away from pI, electrostatic repulsions between the lipid droplets increase, due to an increased net charge of the proteins surrounding the droplets, thus preventing flocculation (Delahaije et al., 2017). The pH also affects the stability of GGRP emulsions that increases with pH, as indicated by the TSI-1 h decrease from 16.70 to 10.30 when pH increases from 4 to 7 (*Supplementary data*, Table S3), but it does not affect that of WRP emulsions (Table 16). These contrasting behaviors could be related to the protein composition that differs between WRP and GGRP (Table 14), with in particular different pI ranges. As mentioned above, pH has been reported as a key factor for protein emulsion stability, with typically a lower stability at a pH close to the pI (Delahaije et al., 2017), despite some counter-examples such as gelatin and egg white proteins that have optimal emulsifying properties at their pI (Cheftel et al., 1985). Moreover, several quadratic effects of pH are also significant (Table 16), indicating minimum or maximum values in the experimental domain investigated here (Figure 27). In WRP emulsions, a maximum value of $d_{4,3}$ (33.08 μm) is observed at pH 4.25 (and 5 % protein, 0 M added NaCl), a maximum value of span (2.7) at pH 5.01 (and 5 % protein, 0.37 M added NaCl), but a minimum stability of emulsion (maximum TSI-1 h of 28.94) at pH 5.92 (and 6.74 % protein, 0.16 M added NaCl). In GGRP emulsions, stability is maximum (minimum TSI-1 h of 1.24) at pH 5.59 (and 20 % protein, 0.01 M added NaCl).

Interestingly, the ionic strength only affects the stability of GGRP emulsions (Table 16). The increased stability of GGRP emulsions as ionic strength increases may be a direct consequence of the much higher protein solubility at high ionic strength, especially at pH 5 to 7 (Figure 25B). Therefore, more proteins are soluble and thus available to cover the surface of the droplets, promoting the stability of the emulsions. This hypothesis has already been raised to explain the behavior of emulsions of sausage meat type (pH 4 to pH 8, in the presence of 0.5 to 1 M NaCl), in which myofibrillar proteins solubilized better in moderate salty conditions (< 1 M) by a “salting-in” effect (Cheftel et al., 1985).

3.3. Supplementary data

Table S1. Experimental measurements of the gelling properties of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) ingredients. C: protein concentration; I: ionic strength; RS: rupture strength; DR: deformation at the rupture. Each value is the mean of three measurements \pm SD. Values in bold are those mentioned in the text. nd: not determined.

Trial	Sample	pH	C	I	Gelling T° (°C)	RS (N)	DR (%)	Hardness (N)	Cohesiveness	Adhesiveness (J)	WHC (%)
1	WRP	5.55	12.5	0.2	29.86	28.68 \pm 0.93	56.64 \pm 1.02	1.08 \pm 0.01	0.94 \pm 0.01	1.28 \pm 0.02	99.83 \pm 0.02
2	WRP	4.44	7.2	0.34	11	9.25 \pm 0.47	55.03 \pm 0.36	0.37 \pm 0.01	0.95 \pm 0.02	1.32 \pm 0.06	99.61 \pm 0.04
3	WRP	5.55	20	0.2	28.86	76.79 \pm 4.37	59.69 \pm 0.84	3.11 \pm 0.18	0.92 \pm 0.01	1.30 \pm 0.01	99.89 \pm 0.01
4	WRP	4.44	17.8	0.06	26.86	74.15 \pm 2.56	60.04 \pm 0.83	2.91 \pm 0.20	0.91 \pm 0.02	1.33 \pm 0.04	99.84 \pm 0.01
5	WRP	5.55	12.5	0.4	22.87	33.70 \pm 1.46	56.06 \pm 1.24	1.32 \pm 0.05	0.93 \pm 0.01	1.27 \pm 0.02	99.83 \pm 0.01
6	WRP	5.55	12.5	0.2	30.86	35.01 \pm 2.59	57.24 \pm 2.13	1.38 \pm 0.05	0.93 \pm 0.01	1.27 \pm 0.03	99.83 \pm 0.01
7	WRP	5.55	5	0.2	12.96	4.59 \pm 0.50	51.99 \pm 2.69	0.20 \pm 0.01	0.93 \pm 0.02	1.39 \pm 0.05	99.29 \pm 0.14
8	WRP	4.44	7.2	0.06	8.09	9.12 \pm 0.26	52.68 \pm 1.62	0.39 \pm 0.02	0.92 \pm 0.01	1.40 \pm 0.03	99.60 \pm 0.01
9	WRP	4	12.5	0.2	21.87	30.14 \pm 1.14	57.53 \pm 1.13	1.15 \pm 0.03	0.92 \pm 0.00	1.32 \pm 0.03	99.78 \pm 0.01
10	WRP	5.55	12.5	0.2	26.86	38.51 \pm 5.43	55.49 \pm 2.03	1.54 \pm 0.05	0.92 \pm 0.02	1.31 \pm 0.06	99.82 \pm 0.01
11	WRP	5.55	12.5	0	22.87	44.98 \pm 3.48	57.42 \pm 1.91	1.66 \pm 0.04	0.93 \pm 0.01	1.30 \pm 0.01	99.80 \pm 0.00
12	WRP	6.56	7.2	0.06	11.01	8.92 \pm 0.88	54.57 \pm 1.35	0.36 \pm 0.01	0.95 \pm 0.01	1.33 \pm 0.02	99.65 \pm 0.05
13	WRP	7	12.5	0.2	21.87	40.28 \pm 3.00	57.94 \pm 0.93	1.49 \pm 0.03	0.92 \pm 0.01	1.30 \pm 0.04	99.84 \pm 0.02
14	WRP	4.44	17.8	0.34	25.87	55.12 \pm 4.13	60.66 \pm 1.63	2.17 \pm 0.06	0.91 \pm 0.01	1.35 \pm 0.03	99.85 \pm 0.01
15	WRP	6.56	17.8	0.06	27.86	58.32 \pm 0.72	59.32 \pm 2.00	2.24 \pm 0.04	0.93 \pm 0.00	1.31 \pm 0.02	99.88 \pm 0.01
16	WRP	6.56	7.2	0.34	6.2	8.20 \pm 0.47	55.84 \pm 1.75	0.33 \pm 0.00	0.92 \pm 0.01	1.34 \pm 0.02	99.66 \pm 0.04
17	WRP	6.56	17.8	0.34	24.86	56.94 \pm 4.00	61.89 \pm 0.82	1.91 \pm 0.03	0.91 \pm 0.01	1.31 \pm 0.04	99.88 \pm 0.02
18	WRP	5.55	12.5	0.2	20.86	29.50 \pm 1.26	56.82 \pm 1.12	1.17 \pm 0.02	0.92 \pm 0.01	1.31 \pm 0.02	99.81 \pm 0.01
1	GGRP	5.55	16	0.2	nd	26.22 \pm 1.61	41.26 \pm 1.04	4.35 \pm 0.10	0.70 \pm 0.02	1.96 \pm 0.06	99.71 \pm 0.03
2	GGRP	4.44	13.2	0.34	nd	11.87 \pm 0.53	40.57 \pm 0.15	1.97 \pm 0.04	0.64 \pm 0.03	2.33 \pm 0.27	99.58 \pm 0.06
3	GGRP	5.55	20	0.2	nd	45.51 \pm 1.46	44.04 \pm 0.55	7.47 \pm 0.27	0.74 \pm 0.05	1.81 \pm 0.16	99.76 0.02
4	GGRP	4.44	18.8	0.06	nd	38.75 \pm 1.40	41.41 \pm 0.84	6.02 \pm 0.15	0.73 \pm 0.03	1.86 \pm 0.12	99.72 \pm 0.03
5	GGRP	5.55	16	0.4	nd	19.56 \pm 0.98	43.37 \pm 0.81	3.08 \pm 0.05	0.71 \pm 0.04	1.93 \pm 0.14	99.75 \pm 0.01
6	GGRP	5.55	16	0.2	nd	21.64 \pm 0.88	42.21 \pm 1.47	3.55 \pm 0.07	0.67 \pm 0.03	2.15 \pm 0.13	99.73 \pm 0.02
7	GGRP	5.55	12	0.2	nd	7.43 \pm 0.21	39.57 \pm 1.49	1.37 \pm 0.08	0.67 \pm 0.06	2.25 \pm 0.27	99.58 \pm 0.07
8	GGRP	4.44	13.2	0.06	nd	9.42 \pm 0.43	37.91 \pm 1.38	1.70 \pm 0.03	0.66 \pm 0.07	2.33 \pm 0.43	99.59 \pm 0.04
9	GGRP	4	16	0.2	nd	15.41 \pm 0.46	41.47 \pm 1.32	2.59 \pm 0.06	0.72 \pm 0.04	1.96 \pm 0.17	99.67 \pm 0.01
10	GGRP	5.55	16	0.2	nd	20.44 \pm 0.67	41.38 \pm 2.66	3.24 \pm 0.05	0.74 \pm 0.02	1.81 \pm 0.08	99.71 \pm 0.01
11	GGRP	5.55	16	0	nd	15.33 \pm 0.50	36.92 \pm 1.36	2.85 \pm 0.04	0.65 \pm 0.02	2.35 \pm 0.20	99.56 \pm 0.02
12	GGRP	6.56	13.2	0.06	nd	13.17 \pm 0.21	38.85 \pm 1.76	2.40 \pm 0.08	0.71 \pm 0.05	2.02 \pm 0.24	99.65 \pm 0.01
13	GGRP	7	16	0.2	nd	26.34 \pm 0.80	42.07 \pm 0.79	4.03 \pm 0.17	0.76 \pm 0.03	1.75 \pm 0.13	99.76 \pm 0.02
14	GGRP	4.44	18.8	0.34	nd	29.26 \pm 0.73	42.30 \pm 1.57	4.46 \pm 0.12	0.74 \pm 0.02	1.87 \pm 0.10	99.76 \pm 0.01
15	GGRP	6.56	18.8	0.06	nd	35.29 \pm 1.05	41.45 \pm 0.73	5.43 \pm 0.23	0.77 \pm 0.02	1.74 \pm 0.10	99.74 \pm 0.00
16	GGRP	6.56	13.2	0.34	nd	12.01 \pm 0.42	41.83 \pm 0.65	1.97 \pm 0.01	0.67 \pm 0.06	2.23 \pm 0.28	99.68 \pm 0.04
17	GGRP	6.56	18.8	0.34	nd	33.74 \pm 1.42	42.59 \pm 2.95	5.25 \pm 0.05	0.76 \pm 0.02	1.77 \pm 0.06	99.80 \pm 0.01
18	GGRP	5.55	16	0.2	nd	19.15 \pm 0.57	40.76 \pm 1.88	3.16 \pm 0.04	0.72 \pm 0.05	1.92 \pm 0.20	99.72 \pm 2.51

Table S2. P-values of the individual factors and their interactions for the gelling properties of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) ingredients. C: protein concentration; I: ionic strength.

	Gelling T° (°C)	Rupture strength (N)		Deformation at the rupture (%)		Hardness (N)		Cohesiveness (dimensionless)		Adhesiveness (J)		Water holding capacity (%)	
	WRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP
<i>Linear</i>													
pH	0.8782	0.9641	0.1499	0.3218	0.3147	0.5376	0.1929	0.5311	0.0629	0.1258	0.0941	0.2593	0.0002
C	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0151	0.0018	0.0277	0.0015	0.0000	0.0018
I	0.6351	0.0992	0.7758	0.2104	0.0007	0.0823	0.4676	0.5312	0.7918	0.2863	0.5010	0.7390	0.0105
<i>Interaction</i>													
pH x C	0.8527	0.4531	0.7904	0.4762	0.4878	0.2276	0.7744	0.4460	0.7947	0.8834	0.6466	0.8654	0.3254
pH x I	0.3475	0.3295	0.6893	0.7741	0.8301	0.5602	0.6973	0.0125	0.6052	0.3202	0.5797	0.9549	0.5471
C x I	0.8356	0.2554	0.2716	0.8870	0.1980	0.1598	0.3762	0.4460	0.4429	0.2102	0.6809	0.9549	0.4262
<i>Quadratic</i>													
pH x pH	0.0329	0.6650	0.9988	0.0604	0.7972	0.4196	0.6398	0.3164	0.1106	0.1564	0.2849	0.6399	0.5046
C x C	0.0179	0.3918	0.0646	0.6985	0.7570	0.2700	0.0641	0.7961	0.9307	0.0062	0.5584	0.0016	0.2691
I x I	0.0624	0.5834	0.2248	0.4322	0.0536	0.8599	0.2283	0.6076	0.1892	0.9610	0.1247	0.5632	0.1069

Table S3. Experimental measurements of the emulsifying properties of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) ingredients. C: protein concentration; I: ionic strength; TSI: Turbiscan Stability Index. Each value is the mean of three measurements \pm SD, except for TSI (1 measurement per scan time). Values in bold are those mentioned in the text.

Trial	Sample	pH	C	I	d _{3,2} (μ m)	d _{4,3} (μ m)	Span	TSI 1h	TSI 2h	TSI 4h	TSI 6h	TSI 8h	TSI 24h
1	WRP	5.55	12.5	0.2	9.41 \pm 0.12	24.88 \pm 0.22	1.87 \pm 0.02	24.00	28.40	30.60	31.70	32.50	34.90
2	WRP	4.44	7.2	0.34	9.75 \pm 0.02	29.61 \pm 0.12	2.48 \pm 0.01	22.00	26.20	29.50	31.50	32.40	38.00
3	WRP	5.55	20	0.2	6.99 \pm 0.10	10.56 \pm 0.08	1.41 \pm 0.02	1.90	2.00	2.10	2.20	2.50	4.30
4	WRP	4.44	17.8	0.06	9.68 \pm 0.39	14.19 \pm 0.33	1.41 \pm 0.03	0.20	0.50	1.00	1.50	1.90	6.10
5	WRP	5.55	12.5	0.4	9.81 \pm 0.01	25.98 \pm 0.04	1.84 \pm 0.00	21.20	26.50	30.20	30.90	31.20	33.30
6	WRP	5.55	12.5	0.2	9.01 \pm 0.09	23.35 \pm 0.19	1.97 \pm 0.02	21.80	26.20	29.30	30.20	30.50	40.30
7	WRP	5.55	5	0.2	9.79 \pm 0.07	23.96 \pm 0.30	2.66 \pm 0.07	25.80	30.70	32.90	34.80	36.10	39.50
8	WRP	4.44	7.2	0.06	10.94 \pm 0.08	31.71 \pm 0.36	2.37 \pm 0.03	23.20	27.60	31.90	32.90	33.70	30.80
9	WRP	4	12.5	0.2	10.64 \pm 0.33	20.55 \pm 0.08	1.82 \pm 0.03	16.90	21.30	26.40	29.70	30.30	33.60
10	WRP	5.55	12.5	0.2	9.13 \pm 0.13	22.90 \pm 0.22	1.94 \pm 0.02	22.40	27.30	29.20	29.90	30.30	32.90
11	WRP	5.55	12.5	0	9.20 \pm 0.06	22.41 \pm 0.11	1.94 \pm 0.01	21.30	26.40	29.70	30.30	30.80	33.60
12	WRP	6.56	7.2	0.06	9.50 \pm 0.07	17.98 \pm 0.19	1.86 \pm 0.03	27.80	32.20	35.40	36.60	37.70	42.70
13	WRP	7	12.5	0.2	8.11 \pm 0.10	13.79 \pm 0.19	1.71 \pm 0.00	19.50	29.80	32.80	34.30	35.40	39.70
14	WRP	4.44	17.8	0.34	7.58 \pm 0.22	11.38 \pm 0.28	1.57 \pm 0.02	1.90	3.60	5.00	5.90	6.40	8.70
15	WRP	6.56	17.8	0.06	11.05 \pm 0.10	18.79 \pm 0.09	1.31 \pm 0.00	3.20	6.40	14.60	22.80	28.30	46.30
16	WRP	6.56	7.2	0.34	9.70 \pm 0.03	19.84 \pm 0.21	2.27 \pm 0.03	26.50	31.50	34.70	36.10	37.20	43.30
17	WRP	6.56	17.8	0.34	9.89 \pm 0.08	18.99 \pm 0.07	1.52 \pm 0.00	1.10	2.20	4.40	7.60	12.80	38.00
18	WRP	5.55	12.5	0.2	9.79 \pm 0.08	29.28 \pm 0.20	1.95 \pm 0.01	21.80	27.00	29.80	30.40	31.00	33.70
1	GGRP	5.55	12.5	0.2	48.54 \pm 1.10	283.96 \pm 17.58	4.15 \pm 0.35	7.50	8.70	9.70	10.30	11.00	16.00
2	GGRP	4.44	7.2	0.34	54.90 \pm 14.77	373.56 \pm 151.87	3.29 \pm 1.27	15.00	18.20	21.10	22.80	24.10	29.50
3	GGRP	5.55	20	0.2	76.28 \pm 3.13	303.75 \pm 42.37	3.38 \pm 0.19	4.60	5.30	5.60	5.90	6.10	6.65
4	GGRP	4.44	17.8	0.06	107.07 \pm 2.28	358.15 \pm 12.02	3.24 \pm 0.47	5.90	6.60	7.00	7.10	7.20	7.90
5	GGRP	5.55	12.5	0.4	48.44 \pm 0.45	257.26 \pm 7.04	3.59 \pm 0.11	5.80	7.00	7.80	8.30	8.70	11.51
6	GGRP	5.55	12.5	0.2	46.33 \pm 0.13	239.85 \pm 15.80	2.71 \pm 0.18	6.20	7.40	8.20	8.70	9.10	12.70
7	GGRP	5.55	5	0.2	40.72 \pm 1.75	191.87 \pm 7.18	4.05 \pm 0.29	11.10	12.70	14.50	15.40	16.00	18.89
8	GGRP	4.44	7.2	0.06	35.26 \pm 1.47	184.21 \pm 26.69	5.70 \pm 0.55	22.30	27.70	30.80	31.70	32.20	34.90
9	GGRP	4	12.5	0.2	43.67 \pm 6.72	277.77 \pm 56.63	3.74 \pm 0.86	16.70	20.60	23.00	23.90	25.60	29.60
10	GGRP	5.55	12.5	0.2	47.38 \pm 0.51	289.14 \pm 4.32	4.52 \pm 0.03	7.70	9.30	10.00	10.70	11.10	14.10
11	GGRP	5.55	12.5	0	27.70 \pm 0.32	197.17 \pm 6.45	5.49 \pm 0.40	11.90	13.70	15.90	17.30	18.20	22.40
12	GGRP	6.56	7.2	0.06	41.06 \pm 2.13	241.23 \pm 17.36	3.82 \pm 0.24	14.20	15.60	17.20	17.80	18.00	22.90
13	GGRP	7	12.5	0.2	47.09 \pm 2.67	278.88 \pm 11.30	3.24 \pm 0.09	10.30	11.50	13.00	13.50	13.60	17.20
14	GGRP	4.44	17.8	0.34	87.02 \pm 13.91	280.08 \pm 26.37	3.60 \pm 0.32	5.90	6.60	7.20	7.40	7.50	8.40
15	GGRP	6.56	17.8	0.06	61.05 \pm 1.35	291.43 \pm 25.92	3.44 \pm 0.42	4.10	5.00	5.80	6.20	6.30	9.30
16	GGRP	6.56	7.2	0.34	53.37 \pm 5.29	299.79 \pm 54.12	3.89 \pm 0.18	9.60	11.10	11.90	12.90	14.10	24.20
17	GGRP	6.56	17.8	0.34	77.02 \pm 6.66	336.92 \pm 40.73	3.27 \pm 0.23	4.70	5.90	6.60	6.80	7.00	9.10
18	GGRP	5.55	12.5	0.2	40.08 \pm 0.59	182.15 \pm 4.99	4.03 \pm 0.09	7.10	8.50	9.20	10.00	10.70	14.60

Table S4. P-values of the individual factors and their interactions for the emulsifying properties of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) ingredients. C: protein concentration; I: ionic strength; TSI: Turbiscan Stability Index.

	d _{3,2} (µm)		d _{4,3} (µm)		Span		TSI 1h	
	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP
<i>Linear</i>								
pH	0.7042	0.2701	0.0553	0.8882	0.0249	0.3858	0.0935	0.0039
C	0.1467	0.0011	0.0004	0.0956	0.0000	0.1137	0.0000	0.0001
I	0.3605	0.1866	0.8198	0.1201	0.0708	0.0694	0.7092	0.0139
<i>Interaction</i>								
pH x C	0.1088	0.0992	0.0015	0.9623	0.0945	0.5586	0.3142	0.0778
pH x I	0.4417	0.4007	0.3850	0.9603	0.2834	0.3310	0.5607	0.5428
C x I	0.4535	0.2974	0.7623	0.0817	0.6418	0.2162	0.7522	0.0427
<i>Quadratic</i>								
pH x pH	0.4497	0.2206	0.0189	0.1356	0.0343	0.3452	0.0073	0.0029
C x C	0.5789	0.0184	0.0204	0.4504	0.3038	0.6135	0.0002	0.9059
I x I	0.3560	0.6827	0.4641	0.8397	0.4318	0.2551	0.1324	0.5349

Table S5. Regression coefficients and analysis of variance of regression models for the Turbiscan Stability Index (TSI) of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) ingredients. C: protein concentration; I: ionic strength; * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (exact p -values are given in Table S6); SEE: standard error of estimation; MAE: mean absolute error.**

	1h		2h		4h		6h		8h		24h	
	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP
Constant	22.98	7.42	28.18	8.78	30.64	9.69	31.31	10.37	31.05	10.98	34.78	15.21
<i>Linear</i>												
pH	1.25	-2.13**	2.20*	-2.86**	2.56*	-3.23**	3.15*	-3.33**	4.06**	-3.54**	7.94**	-2.72*
C	-10.57 ***	-4.14 ***	-12.11 ***	-4.91 ***	-12.50 ***	-5.58 ***	-12.11 ***	-5.92 ***	-11.59 ***	-6.20 ***	-8.79 **	-7.85 ***
I	-0.25	-1.66*	-0.25	-1.88*	-0.71	-2.12*	-0.98	-2.13*	-1.02	-2.03*	0.14	-1.60
<i>Interaction</i>												
pH x C	-0.86	1.31	-0.67	2.11*	0.53	2.62*	1.83	2.78*	3.00*	2.85*	6.53*	2.42
pH x I	-0.48	0.41	-0.82	0.73	-1.56	0.62	-2.33	0.53	-2.4	0.57	-2.18	0.75
C x I	0.26	1.56*	0.12	1.86*	-0.38	2.00	-1.11	1.83	-1.15	1.62	-1.68	0.55
<i>Quadratic</i>												
pH x pH	-2.87**	2.74**	-2.26	3.32**	-1.43	3.74**	-0.41	3.71**	0.14	3.80**	1.75	4.15*
C x C	-5.04 ***	-0.08	-6.86 ***	-0.19	-7.48 ***	-0.23	-7.16 ***	-0.31	-6.63 ***	-0.46	-5.62 *	-1.16
I x I	-1.34	0.42	-1.81	0.47	-1.25	0.66	-1.11	0.76	-0.78	0.73	0.15	0.93
R²	97.56	93.53	96.98	93.46	96.71	93.90	96.00	93.35	95.64	92.51	87.48	88.79
R² adj	94.82	86.25	93.58	86.11	93.01	87.04	91.50	85.88	90.73	84.09	73.39	76.18
SEE	2.27	1.83	2.27	2.26	2.48	2.48	2.69	2.69	3.62	2.97	6.05	4.10
MAE	1.25	0.94	1.14	1.14	1.26	1.26	1.37	1.37	2.02	1.47	3.45	2.15
p-value	0.000	0.0007	00.000	0.0008	0.0001	0.0006	0.0001	0.0008	0.000	0.0013	0.003	0.002

Table S6. P-values of the individual factors and their interactions for the Turbiscan Stability Index (TSI) of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) ingredients C: protein concentration; I: ionic strength.

	1h		2h		4h		6h		8h		24h	
	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP	WRP	GGRP
<i>Linear</i>												
pH	0.0935	0.0039	0.0334	0.0024	0.0253	0.0020	0.0149	0.0027	0.0046	0.0033	0.0029	0.0504
C	0.0000	0.0001	0.0000	0.0001	0.0000	0.0001	0.0000	0.0001	0.0000	0.0001	0.0016	0.0002
I	0.7092	0.0139	0.7742	0.0208	0.4651	0.0181	0.3611	0.0253	0.3588	0.045	0.9425	0.2139
<i>Interaction</i>												
pH x C	0.3142	0.0778	0.5390	0.0300	0.6509	0.0173	0.1794	0.0191	0.0475	0.0265	0.0217	0.1335
pH x I	0.5607	0.5428	0.4554	0.3848	0.2090	0.4967	0.0981	0.5882	0.0982	0.5991	0.3694	0.6195
C x I	0.7522	0.0427	0.9083	0.0488	0.7434	0.0522	0.3990	0.0900	0.3961	0.1605	0.4840	0.7148
<i>Quadratic</i>												
pH x pH	0.0073	0.0029	0.0633	0.0032	0.2467	0.0028	0.7496	0.0046	0.9148	0.0067	0.4675	0.0210
C x C	0.0002	0.9059	0.0002	0.8133	0.0002	0.7971	0.0004	0.7514	0.0009	0.6687	0.0403	0.4450
I x I	0.1324	0.5349	0.1224	0.5669	0.3047	0.4693	0.3990	0.4468	0.5584	0.5050	0.9482	0.5384

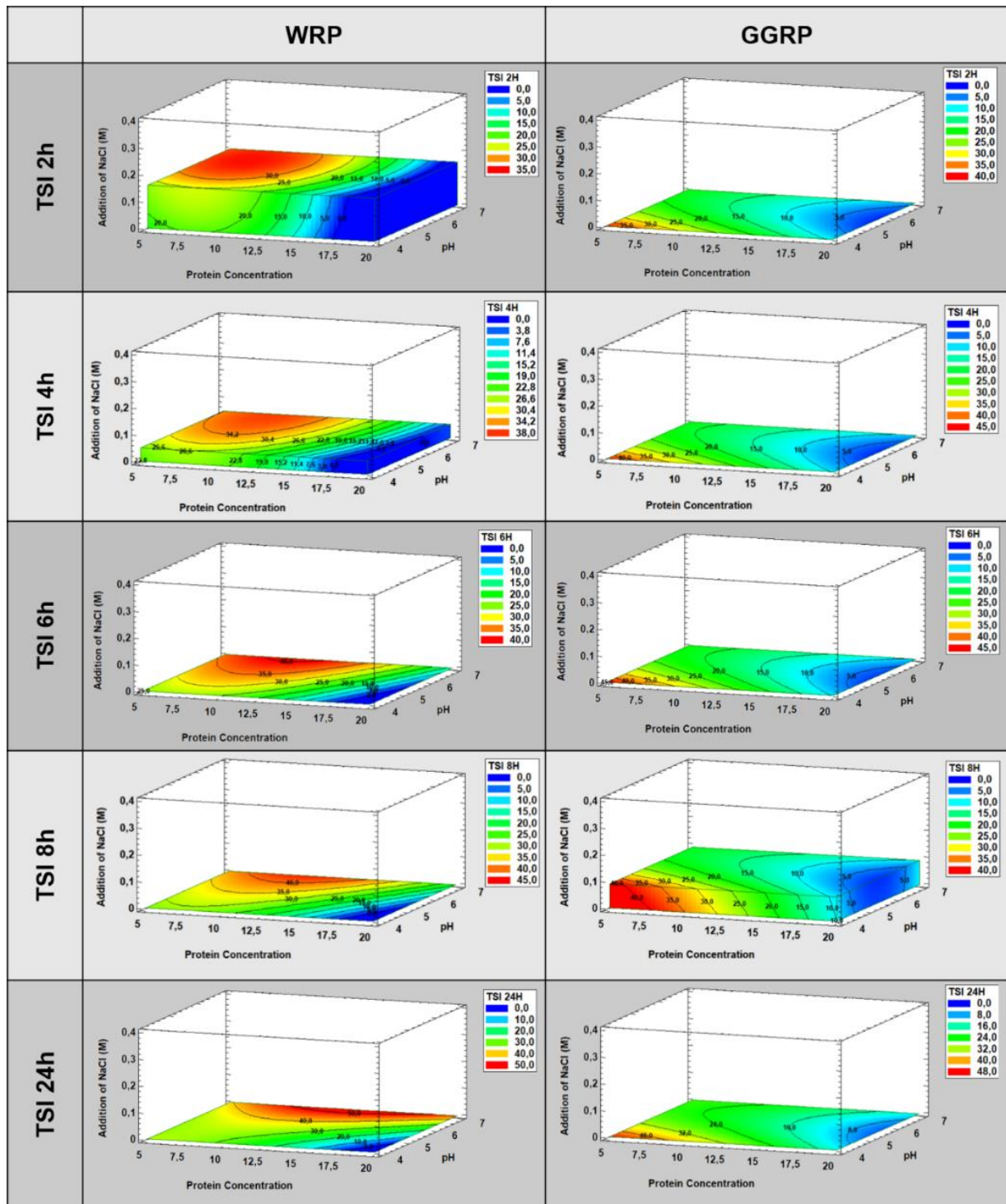


Figure S1: Turbiscan Stability Index (TSI) of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) emulsions during storage at 50 °C for 24 h, depending on protein concentration, pH, and ionic strength. TSI is actually indicative of instability (TSI decreases as stability increases). The added NaCl level set for the cross-section of response surfaces is that corresponding to the optimum for each characteristic (minimum value).

En résumé

- L'augmentation de la force ionique tend à diminuer la solubilité des protéines WRP, alors que l'inverse est observé pour les protéines GGRP. Il faut cependant noter que la force ionique n'a pas ou peu d'impact sur les propriétés fonctionnelles étudiées.
- L'impact du pH sur la solubilité des protéines et les propriétés fonctionnelles est très limité, sauf pour certains paramètres des propriétés émulsifiantes, avec là encore des comportements différents selon l'ingrédient. Les différences de composition protéique, et donc de point isoélectrique moyen, expliquent vraisemblablement les différences de comportements entre WRP et GGRP.
- Le paramètre le plus influent sur toutes les propriétés fonctionnelles des deux ingrédients est la concentration en protéines. Le faible impact du pH et de la force ionique sur leurs propriétés est finalement un résultat positif pour l'utilisation des deux ingrédients en tant qu'agents fonctionnels, puisqu'il suggère qu'ils peuvent exprimer leurs fonctionnalités indépendamment des conditions de pH et de force ionique. Le seul paramètre à contrôler serait leur taux d'incorporation dans les aliments.

4. Innovative beef protein co-products to substitute gelatin as gelling agents, and sodium caseinate as emulsifiers

Rozenn Le Foll¹, Françoise Nau^{1*}, Pascaline Hamon¹, Catherine Guérin-Dubiard¹, Xavier Lambert², Amélie Deglaire¹, Valérie Lechevalier¹

¹INRAE, Institut Agro, STLO, 35042 Rennes, France

²CORNILLE sas, 35500 Cornillé, France

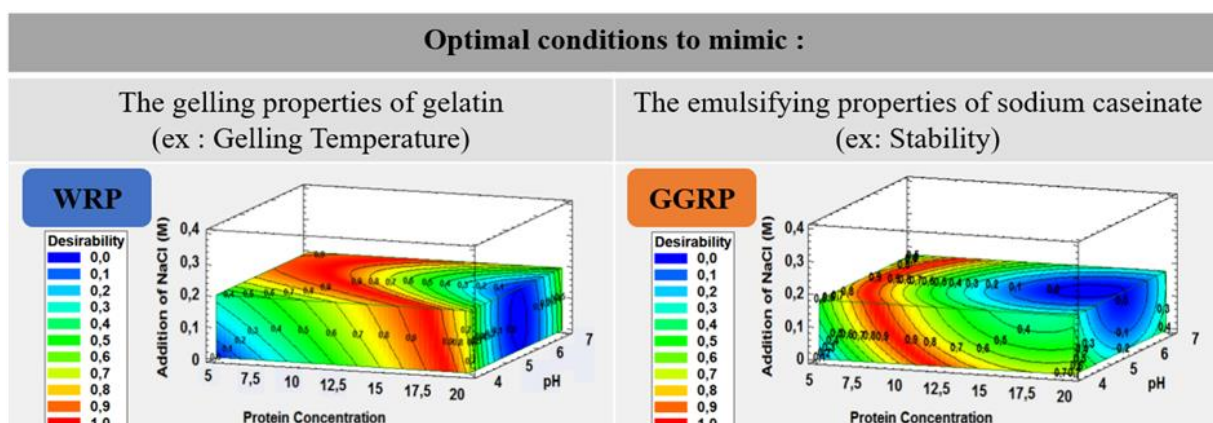
Keyword : Animal co-product; Beef protein; Collagen; Optimization; Functionality.

Article in preparation for submission to *LWT-Food Science and Technology* as an Original Research article

Highlights:

- The coproduct derived from water recovery is able to form gel similar to beef gelatin
- The greaves coproduct is more effective than sodium caseinate at stabilizing emulsions
- Both coproducts are efficient alternatives to sodium caseinate as emulsifiers

Graphic for table of contents:



4.1. Abstract

Meat co-products are a promising alternative for meeting the increasing demand for protein, especially for the formulation of meat products. The present study aims to determine the optimal conditions under which two innovative bovine co-products, resulting from the fat rendering process, can mimic the gelling and emulsifying properties of commercial gelatins and sodium caseinate (NaCas), respectively. The desirability function was used to determine the values for protein concentration, pH and NaCl content that enable the two co-products to effectively mimic gelatin and sodium caseinate. The co-product from water recovery proved to be the most suitable to mimic commercial gelatins. Very high desirability scores were obtained with this ingredient on 4 criteria out of 7, and a high overall score as well, provided 9 % protein was used to mimic a 5 % gelatin 150 Bloom. Both co-products appeared as effective alternatives to NaCas as emulsifiers, especially regarding their capacity in stabilizing emulsions. The co-product from greaves can be even regarded as more effective than NaCas, as less proteins are needed to obtain the same performances (11.0 % vs. 12.5 %).

4.2. Results and Discussion

4.2.1. *WRP are able to form gels broadly similar to beef gelatin gels, unlike GGRP*

As meat protein ingredients rich in collagen, WRP and GGRP may be potential candidates for substituting commercial beef gelatins as gelling agents. To assess this assumption, the gelling properties of WRP and GGRP ingredients were compared with those of the two commercial beef gelatins mentioned above, for which the difference in gel strength (240 and 150 Bloom, respectively) was probably related to the extraction process, since gelatin strength decreases as extraction temperature increases (Sha et al., 2019). The commercial gelatins have been tested in the same conditions as described above (pH 5.55, 5 % protein, and 0.2 M added NaCl), while WRP and GGRP have been evaluated under all conditions of the CCD (see section 3.2.2. Table 13). Six parameters were measured, *i.e.* gel rupture strength and deformation, gel hardness, cohesiveness, adhesiveness, and water holding capacity (WHC).

For an overview of all the gelling properties considered simultaneously, a principal component analysis (PCA) was first performed with all the properties as active variables, and physicochemical parameters (pH, ionic strength, protein concentration, and protein solubility) as supplementary variables (Figure 28A). The first two principal components (PC) explain a cumulative variability of 91.08 %, thus explaining a major part of the information provided by the dataset. PC1 (61.30 % of the variability) is negatively correlated with gel adhesiveness ($R^2 = -0.96$), and positively correlated with cohesiveness (0.94) and deformation at the gel rupture (0.98). Adhesiveness, cohesiveness and deformation at the gel rupture are strongly correlated with protein solubility (-0.92, 0.97, and 0.96, respectively) (*Supplementary data*, Table S1). PC2 (29.78 % of the variability) is positively correlated with gel hardness ($R^2 = 0.85$), strength at the gel rupture (0.70) and WHC (0.67), which are all variables positively correlated with protein concentration (0.82, 0.63, and 0.57, respectively). However, pH and ionic

strength are not properly represented in the PC1-PC2 plan, indicating the absence of correlation with the variables described above (*Supplementary data*, Table S1). The ionic strength and pH are neither correlated with PC3 and PC4 (data not shown).

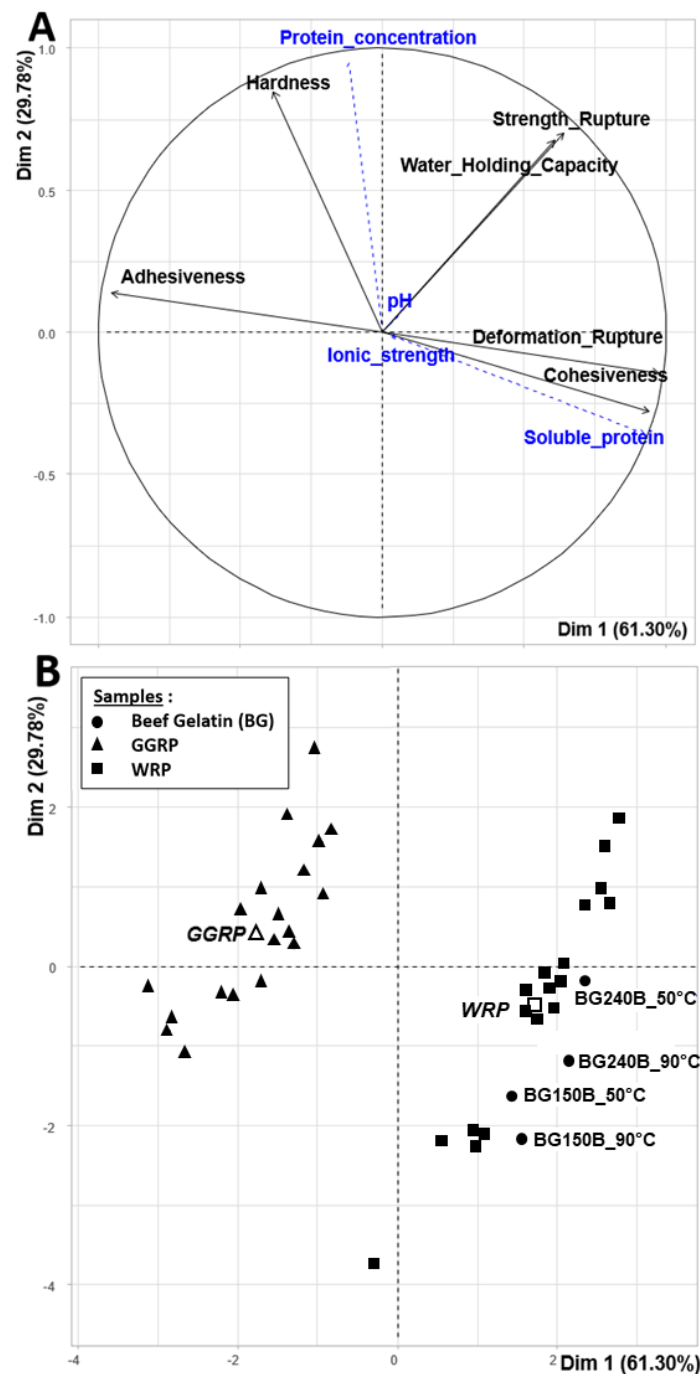


Figure 28: Gelling properties: projection of the variables (A) and of the individuals (B) on the first two dimensions (PC1 and PC2) of the principal component analysis (PCA). (A) Active variables (black solid lines) correspond to the characteristics measured to describe gelling properties; pH, protein concentration, ionic strength and protein solubility were added as supplementary variables (blue dashed lines). (B) Individuals are represented by symbols according to the ingredients (triangles, Greasy Greaves Recovered Proteins (GGRP); squares, Water Recovered Proteins (WRP); circles, commercial beef gelatins (BG)). Empty symbols correspond to the barycenter of each of the two protein ingredients. The gels of commercial bovine gelatins, 150 Bloom (BG150B) and 240 Bloom (BG240B), have been prepared at 5 % protein, pH 5.55 and 0.2 M NaCl, after dissolution at 50 °C or 90 °C; these samples have been added as supplementary individuals in the PCA.

The graph of individuals clearly opposes the WRP gels to the GGRP gels along PC1 (Figure 28B). The position of GGRP gels on the left side of the graph indicates higher adhesiveness, but lower cohesiveness and deformation at the gel rupture as compared with WRP gels. Moreover, it underlines the lower protein solubility of GGRP, previously reported (Le Foll et al., 2024). In addition, PC2 separates the gels according to protein concentration, with the more concentrated gels (upper part of the graph) having the highest hardness, strength at the rupture and WHC, regardless of the ingredient. Lastly, Figure 28B highlights the overall similarities between WRP and the two commercial beef gelatins used as references, indicating that WRP can form gels broadly similar to that of the two commercial beef gelatins, at least under some conditions of the experimental domain investigated in the present study. As expected, the 240 Bloom gelatin is placed above the 150 Bloom gelatin on the graph, indicating higher gel hardness and strength at the gel rupture, but also higher WHC for the 240 Bloom gelatin. However, both gelatins do not differ in adhesiveness, cohesiveness and deformation at the gel rupture. Moreover, for each of both commercial gelatins, it should be noted that dissolution and heating at 90 °C for 30 min before gelation, decreases gel hardness, strength at the gel rupture and WHC, as compared to dissolution at 50 °C. This suggests some gelatin hydrolysis during heat treatment at 90 °C, consistently with literature (Correa de Moraes & Lopes Cunha, 2013). As a reminder, two different processing temperatures were applied for GGRP (90 °C) and WRP (50 °C), in order to melt the insoluble collagen present in GGRP, unlike WRP where the collagen is already soluble (Le Foll et al., 2024). For this reason, commercial gelatins were evaluated according to the both gel preparation methods, so as not bias comparisons with WRP on the one hand, and GGRP on the other.

4.2.2. *Multi-response optimizations confirm the potentialities of WRP as an efficient substitute for beef gelatin*

In order to investigate in more details, the potentialities of the two protein ingredients as beef gelatin substitutes for gelling properties, optimum conditions have been determined for each ingredient to mimic as close as possible the functionalities of the two commercial beef gelatins, and the corresponding desirability values have been calculated. In a first step, optimization has been carried out considering separately four subcategories of gelling properties, *i.e.* gelling temperature (for WRP only), gel rupture properties (strength and deformation together), gel texture (hardness, cohesiveness, and adhesiveness together), and WHC. The optimum pH, protein concentration and ionic strength values thus determined for WRP and GGRP to mimic 150 Bloom gelatin are summarized in Table 17. The corresponding maps of desirability in the experimental domain are presented in Figure 29A. Similarly, comparisons with the 240 Bloom gelatin are given in Table 18, Figure 29B. The small differences obtained between the two commercial gelatins were in agreement with literature data, such as for the gelation temperature that increases with the Bloom degree (12.96 and 17.89 °C for 150 Bloom and 240 Bloom gelatins, respectively) (Osorio et al., 2007).

Table 17: Optimal conditions for Water Recovered Proteins (WRP) and Greasy Greaves Recovered Proteins (GGRP) gels to mimic a commercial beef gelatin, considering four categories of gelling properties (A), or all properties taken together (B). Protein concentration (C), pH, and ionic strength (I) are given to mimic a **150 Bloom** gelatin, tested at 5 % protein, pH 5.55, and 0.2 M added NaCl, after heating for 30 min at 50 °C (when compared with WRP) or 90 °C (when compared with GGRP). d: desirability function of a response value equal to y on a scale of 0 to 1. D: all responses were combined for a single desirability score.

A	WRP	Reference 150GB	d	D	GGRP	Reference 150GB	d	D
C (%)	6.10	5.00						
pH	5.43	5.55						
I (M NaCl added)	0.18	0.20						
Gelling temperature (°C)	12.96	12.96	1	1				
C (%)	9.79	5.00			12.00	5.00		
pH	6.04	5.55			6.99	5.55		
I (M NaCl added)	0.016	0.20			0.39	0.20		
Gel rupture strength (N)	23.12	23.12	1		13.47	9.18	0.88	
Deformation at the gel rupture (%)	54.91	54.91	1	1	42.44	56.83	0.34	0.55
C (%)	11.31	5.00			15.7	5.00		
pH	4.00	5.55			7.00	5.55		
I (M NaCl added)	0.39	0.20			0.18	0.20		
Gel hardness (N)	0.97	0.97	0.99		3.65	0.77	0.56	
Gel cohesiveness	0.94	0.96	0.77	0.77	0.76	0.97	0.38	0.49
Gel adhesiveness (J)	1.30	1.20	0.60		1.75	1.13	0.56	
C (%)	7.52	5.00			13.43	5.00		
pH	6.57	5.55			5.65	5.55		
I (M NaCl added)	0.33	0.20			0.24	0.20		
WHC (%)	99.63	99.63	1	1	99.65	99.65	1	1

B	WRP	Reference 150GB	d	D	GGRP	Reference 150GB	d	D
C (%)	9.10	5.00			12.87	5.00		
pH	6.49	5.55			7.00	5.55		
I (M NaCl added)	0.00	0.20			0.15	0.20		
Gelling temperature (°C)	14.79	12.96	0.89		nd	nd		
Gel rupture strength (N)	18.90	23.12	0.85		13.60	9.18	0.87	
Deformation at the gel rupture (%)	55.12	54.91	0.97		40.32	56.83	0.24	
Gel hardness (N)	0.81	0.97	0.85	0.79	2.40	0.77	0.75	0.50
Gel cohesiveness	0.94	0.96	0.79		0.73	0.97	0.29	
Gel adhesiveness (J)	1.32	1.20	0.52		1.94	1.13	0.42	
WHC (%)	99.7	99.63	0.73		99.68	99.65	0.81	

Table 18: Optimal conditions for Water Recovered Proteins (WRP) and Greasy Greaves Recovered Proteins (GGRP) gels to mimic a commercial beef gelatin, considering four categories of gelling properties (A), or all properties taken together (B). Protein concentration (C), pH, and ionic strength (I) are given to mimic a **240 Bloom** gelatin, tested at 5 % protein, pH 5.55, and 0.2 M added NaCl, after heating for 30 min at 50 °C (when compared with WRP) or 90 °C (when compared with GGRP). d: desirability function of a response value equal to y on a scale of 0 to 1. D: all responses were combined for a single desirability score.

A	WRP	Reference 240GB	d	D	GGRP	Reference 240GB	d	D
C (%)	7.94	5.00						
pH	5.22	5.55						
I (M NaCl added)	0.16	0.20						
Gelling temperature (°C)	17.89	17.89	1	1				
C (%)	14.6	5.00			18.51	5.00		
pH	5.23	5.55			6.99	5.55		
I (M NaCl added)	0.00	0.20			0.33	0.20		
Gel rupture strength (N)	51.79	68.76	0.77		34.12	34.12	1	
Deformation at the gel rupture (%)	57.21	56.86	0.93	0.85	43.24	61.1	0.31	0.56
C (%)	12.93	5.00			15.7	5.00		
pH	7.00	5.55			7.00	5.55		
I (M NaCl added)	0.00	0.20			0.18	0.20		
Gel hardness (N)	1.53	1.53	0.99		3.65	1.16	0.60	
Gel cohesiveness	0.95	0.96	0.82	0.82	0.76	0.96	0.39	0.51
Gel adhesiveness (J)	1.29	1.19	0.63		1.75	1.17	0.58	
C (%)	7.52	5.00			14.17	5.00		
pH	6.57	5.55			5.60	5.55		
I (M NaCl added)	0.33	0.20			0.22	0.20		
WHC (%)	99.63	99.63	1	1	99.67	99.67	1	1

B	WRP	Reference 240GB	d	D	GGRP	Reference 240GB	d	D
C (%)	11.27	5.00			17.41	5.00		
pH	6.80	5.55			6.99	5.55		
I (M NaCl added)	0.00	0.20			0.08	0.20		
Gelling temperature (°C)	17.89	17.89	0.99		ns	ns		
Gel rupture strength (N)	28.92	68.76	0.46		29.5	34.12	0.85	
Deformation at the gel rupture (%)	56.86	56.86	0.99	0.67	40.85	61.10	0.22	
Gel hardness (N)	1.21	1.53	0.80		4.82	1.16	0.41	0.48
Gel cohesiveness	0.94	0.96	0.81		0.77	0.96	0.42	
Gel adhesiveness (J)	1.30	1.19	0.59		1.72	1.17	0.59	
WHC (%)	99.8	99.63	0.35		99.73	99.67	0.63	

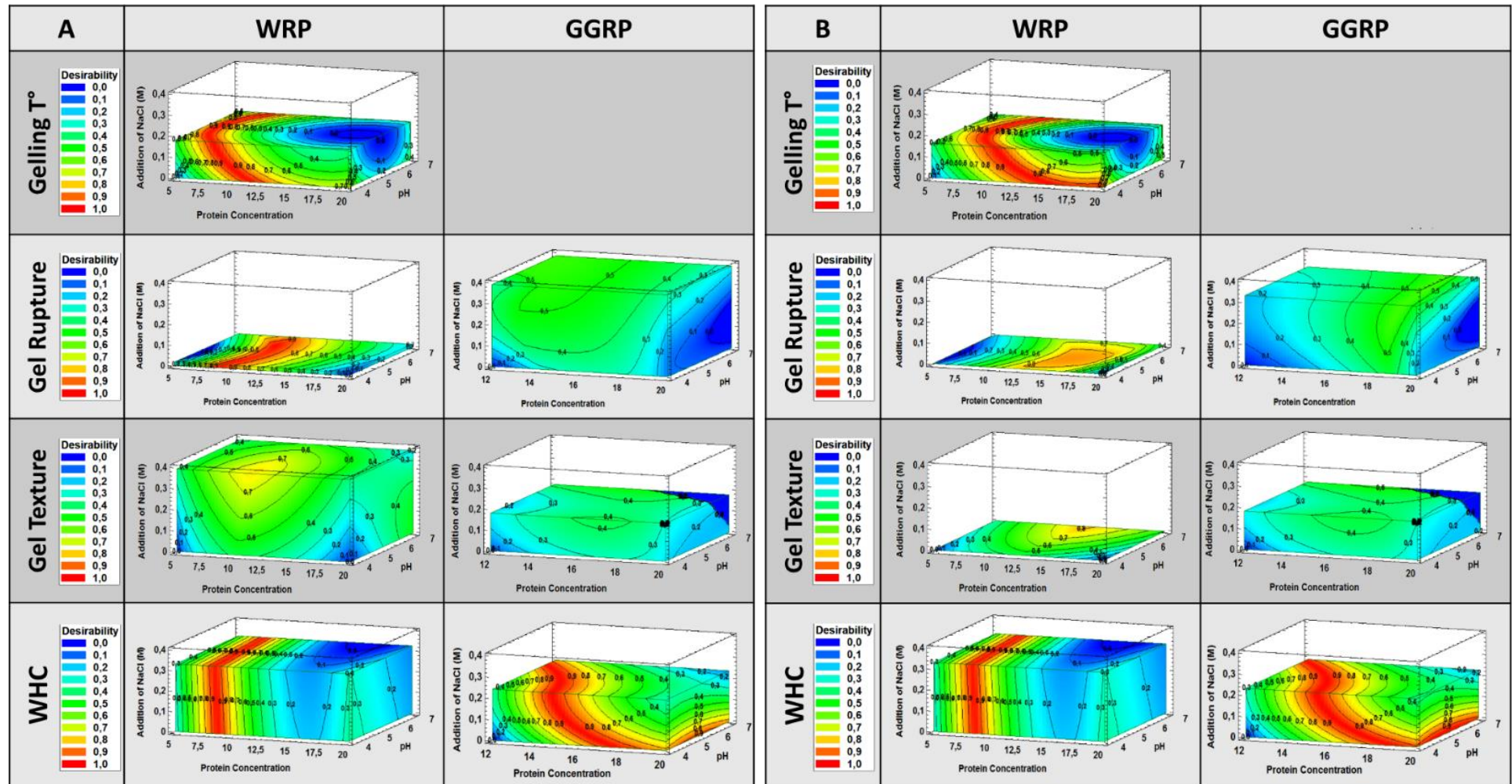


Figure 29: Desirability mapping for the four categories of gelling properties of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP). Desirability values indicate the capability of each ingredient to reproduce separately the gelling temperature, gel rupture, gel texture, or WHC of a 150 Bloom (A) and a 240 Bloom (B) commercial beef gelatins. Gel rupture optimization considers strength and deformation at the rupture of the gel simultaneously; gel texture optimization considers the gel hardness, cohesiveness, and adhesiveness simultaneously.

As expected given the PCA results presented above, GGRP did not really enable to form gels similar to gelatin gels, as indicated by the optimum desirability scores of 0.55 for gel rupture properties, and 0.49 for gel texture properties (Table 17A, Figure 29A). Even considering separately each characteristic constitutive of gel rupture and gel texture properties, the desirability scores are all lower than 0.60, except for gel rupture strength, for which a score of 0.88 was calculated. However, the maximum score of desirability (1.00) could be obtained for WHC, indicating that GGRP gels can perfectly mimic beef gelatin gels with respect to this property. This implies similar pH (5.65 vs. 5.55) and ionic strength (0.24 M added NaCl vs. 0.2 M) than those applied for the commercial 150 Bloom gelatin, but much higher protein concentrations (13.43 % vs. 5 %) (Table 17A). In the end, multi-criteria optimization of all gelling properties failed to identify experimental conditions for GGRP that perfectly met all the objectives at the same time, with a desirability score of 0.50 (Table 17B, Figure 30).

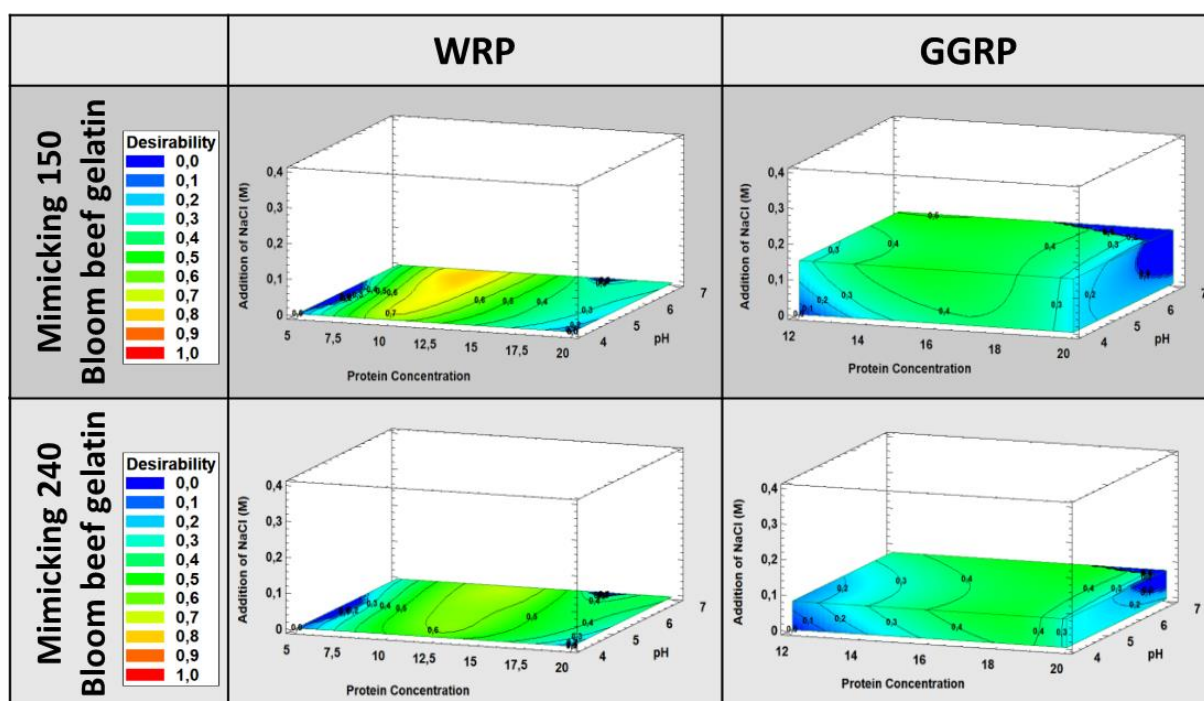


Figure 30: Desirability mapping for all gelling properties of Water Recovered Protein (WRP) and Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) taken together. Desirability values indicate the capability of each ingredient to mimic a 150 Bloom and 240 Bloom beef gelatins in all dimensions of gelling properties (gelling temperature, gel rupture strength and deformation, gel hardness, cohesiveness, adhesiveness, and WHC). Desirability is presented as a function of protein concentration and pH, the ionic strength (M added NaCl) being set in each case for the maximum desirability.

Concerning WRP, Table 17A shows that the maximum score of desirability could be obtained for gelling temperature, gel rupture properties and WHC. Hence, with some adjustments to pH (5.43 vs. 5.55), and to ionic strength (0.18 M added NaCl vs. 0.2 M), the same gelling temperature as that of the 150 Bloom gelatin (12.96 °C) could be obtained with 6.10 % WRP protein, vs. 5 % gelatin. With respect to WHC, strictly identical performance (99.63 % WHC) could be obtained with WRP and the 150 Bloom gelatin, albeit with a higher protein concentration for WRP (7.52 % vs. 5 %), slightly higher pH (6.57 vs. 5.55) and higher added NaCl content (0.33 vs. 0.2 M). However, there is actually a number of conditions in

the experimental domain, which enable to obtain exactly the same gelling temperatures and WHC (desirability ~ 1.00) as reference gelatin (Figure 29A). As for gel rupture properties, the maximum score of desirability could be obtained so that the WRP mimicked the 150 Bloom gelatin with respect to the deformation at the gel rupture, as well as the gel rupture strength. This implies similar pH conditions to that applied for the gelatin (pH 6.04 *vs.* 5.55), lower ionic strength (0.016 M added NaCl *vs.* 0.2 M), but a higher protein concentration (9.79 % *vs.* 5%). This latter result could be expected given that WRP does not consist of gelatin only (Table 14)(Le Foll et al., 2024). Lastly, it should be noted that optimal conditions for WRP to mimic 150 Bloom gelatin in terms of gelling temperature, WHC and gel rupture, exist throughout the pH range tested in the present study, *i.e.* from pH 4.0 to pH 7.0 (Figure 29A).

However, with respect to gel texture properties, only gel hardness of the 150 Bloom gelatin could be properly imitated with WRP, with a desirability score of 0.99, provided that much higher protein concentration is used (11.31 % *vs.* 5 %; Table 17A), similarly to the optimization of the gel rupture properties mentioned above. Finally, multi-response optimization led to sub-optimal results, as indicated by a desirability score of 0.77 for the WRP ingredient. Therefore, WRP ingredient cannot strictly mimic the commercial 150 Bloom gelatin in that all the gel texture properties cannot be fully and simultaneously mimicked (Figure 29A).

Once, the optimizations for the four subcategories of gelling properties had been completed, they were supplemented by further multi-response optimizations for all the gelling properties taken together. The optimum pH, protein concentration and ionic strength values thus determined for WRP, and the corresponding desirability scores are summarized in Table 17B; the corresponding maps of desirability are presented in Figure 30. This challenging multi-criteria optimization underlines that, although some very high desirability scores were calculated when gelling properties were considered separately (see above), it is quite impossible to determine experimental conditions that met perfectly all objectives at the same time. However, a quite high desirability score (0.79) was calculated for WRP, when mimicking the 150 Bloom gelatin, indicating that this protein ingredient might efficiently replace this commercial gelatin as a gelling agent. For this, the protein concentration must be increased (9.10 % *vs.* 5 %), the pH increased (6.49 *vs.* 5.55) and the addition of NaCl decreased (0 *vs.* 0.2M).

The results of research into optimizing conditions to mimic the 240 Bloom gelatin are presented Table 18, Figure 29B and Figure 30.

A number of co-products of animal origin have already been reported to have gel-forming properties comparable to those of gelatin. These include beef lungs, mechanically separated chicken meat and fish skin (Roy et al., 2017; Mokrejš et al., 2021; Amiza et al., 2015), albeit with different performances depending on the protein content and type (origin). It has been established, for example, that fish gelatin differs from pork or beef gelatins in terms of gelling temperature and gel strength (Rahman & Al-Mahrouqi, 2009). However, it is difficult to position the two ingredients studied here (WRP and GGRP) in relation to these other co-products. Indeed, the way in which gels are formed has a major impact on

their properties, and this varies systematically from one study to another. This is why we chose to compare WRP and GGRP with commercial gelatins, tested under the same conditions as the two co-products of interest. In this way, equivalences, particularly in terms of protein concentration, could be established to best mimic each of the gelling characteristics or groups of characteristics, depending on the objectives targeted during a food formulation stage, for example.

4.2.3. *WRP can produce emulsions broadly similar to a sodium caseinate emulsion*

Like many proteins, beef proteins have already been reported as efficient emulsifiers (Kurt & Zorba, 2007; Zorba & Kurt, 2006; Selmane et al., 2010), and we could previously confirm that the two beef protein ingredients studied here actually offer this feature (Le Foll et al., 2024). With a view to proposing WRP and GGRP as new food emulsifiers, especially for meat products such as sausages or meatballs, these two ingredients were compared with sodium caseinate (NaCas), widely used by the food industry to stabilize emulsions (Huck-Iriart et al., 2011; Ma & Chatterton, 2021). A commercial NaCas was tested as a reference at pH 5.55, 12.5 % protein, and 0.2 M added NaCl, *i.e.* the middle of the experimental design used to test WRP and GGRP. The emulsifying properties were evaluated through the lipid droplet size ($d_{3,2}$ and $d_{4,3}$) and polydispersity (span), and the emulsion instability (TSI, Turbiscan index).

For a first overview of the emulsifying properties considered in a holistic way, a PCA was performed with all properties as active variables, and physicochemical parameters (pH, protein concentration, ionic strength, and soluble-protein content) as supplementary variables (Figure 31A). The first two PCs explain most of the information provided by the dataset, with a cumulative variability of 90.85 %. PC1 (68.45 % of the variability) is positively correlated with the characteristics of the droplet size distribution ($R^2 = 0.93, 0.97,$ and 0.78 for $d_{3,2}, d_{4,3}$ and span, respectively). These variables are inversely correlated to protein solubility ($-0.86, -0.95$ and -0.86 , respectively). PC2 (22.40 % of the variability) is positively correlated with TSI 1h (emulsion instability after 1 hour; $R^2 = 0.80$), which is negatively correlated to protein concentration (-0.71). However, pH and ionic strength are not properly represented in the PC1-PC2 plan, indicating the absence of correlation with the variables described above (*Supplementary data, Table S2*). These two variables are neither correlated with PC3 and PC4 (data not shown).

As with the gelling properties, the graph of individuals clearly contrasts the WRP-based emulsions with the GGRP-based ones along PC1 (Figure 31B), indicating a broader lipid droplet size distribution and also a larger mean diameter in the GGRP emulsions, in relation to the lower solubility of GGRP proteins. However, as previously established, in the case of the GGRP-based emulsions, there may be confusion between the lipid droplet size and the insoluble particle size due to the low solubility of this ingredient (Le Foll et al., 2024). No real difference seems to separate the WRP emulsions from the GGRP emulsions along PC2. Moreover, the WRP barycenter is close to the NaCas individual, suggesting that certain conditions may exist for a high degree of similarity between the two ingredients in terms of emulsifying properties.

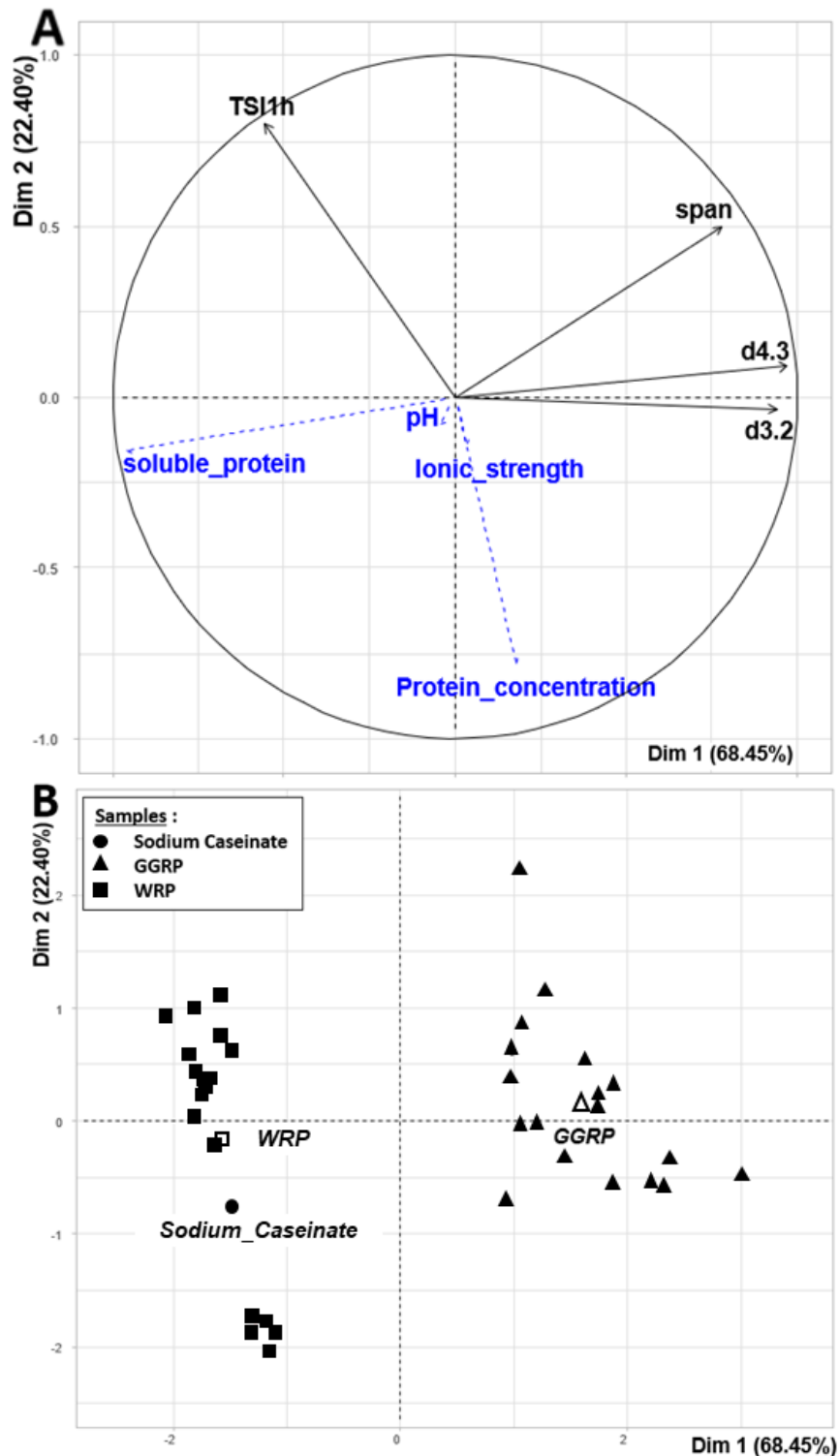


Figure 31: Emulsifying properties: projection of the variables (A) and of the individuals (B) on the first two dimensions (PC1 and PC2) of the principal component analysis (PCA). (A) Active variables (black solid lines) correspond to the characteristics measured to describe emulsifying properties; pH, protein concentration, ionic strength, and protein solubility were added as supplementary variables (blue dashed lines). (B) Individuals are represented by symbols according to the ingredients (triangles, Greasy Greaves Recovered Proteins (GGRP); squares, Water Recovered Proteins (WRP); circles, commercial sodium caseinate). Empty symbols correspond to the barycenter of each of the two protein ingredients. The emulsion of sodium caseinate has been prepared at 12.5 % protein, pH 5.55 and 0.2 M NaCl; this sample has been added as a supplementary individual in the PCA.

4.2.4. *Multi-response optimizations highlight the strong potential of WRP and GGRP as substitutes for NaCas to stabilizing emulsions*

As in the optimization approach presented above for gelling properties, optimal conditions were sought so that WRP and GGRP would offer emulsifying properties identical, or at least close to those of NaCas. Optimization was first carried out considering lipid droplet size distribution, *i.e.* parameters $d_{3,2}$, $d_{4,3}$, and/or span taken together, and emulsion stability after 1h rest (TSI 1h). For WRP, the $d_{3,2}$ parameter was excluded from the optimization because the regression model equation was not significant for this variable; for the same reason, the $d_{4,3}$ and span parameters were excluded for GGRP (Le Foll et al., 2024). The optimal protein concentration, pH, and ionic strength values thus determined for WRP and GGRP are summarized in Table 19A. The response surfaces of desirability values throughout the experimental domain investigated are presented in Figure 32.

Table 19A shows the maximum desirability value for the polydispersity parameter (span) of WRP emulsions, indicating that under some conditions, the WRP ingredient can perfectly mimic NaCas on this criterion. WRP can also mimic NaCas almost perfectly (desirability of 0.99) with respect to the $d_{4,3}$ parameter, which is a measure of droplet size. As a result, the optimal desirability calculated for droplet size distribution is close to the maximum (0.99) for WRP, which can therefore efficiently mimic NaCas with regard to lipid droplet size distribution. To achieve this, the WRP emulsion must be prepared at a higher pH than NaCas emulsion (pH 6.96 *vs.* pH 5.55), and almost without NaCl addition (0.065 M *vs.* 0.2 M), probably because of the natural NaCl content of WRP (5.96 %; see section 3.3.2. Table 14). More interesting is that WRP requires a lower protein concentration than NaCas (5.32 % *vs.* 12.5 %) to obtain a similar droplet size distribution, suggesting better emulsifying properties of WRP with respect to this feature. As for GGRP, only the $d_{3,2}$ parameter could be optimized, but the result is a much higher value compared with NaCas (27.7 μm *vs.* 1.18 μm), and a moderate desirability value (0.80). However, as mentioned above, this may be an artefact due to the low solubility of the GGRP proteins (from 20 % to 30 %)(Le Foll et al., 2024) making that particle size analysis could include indiscriminately both lipid droplets and insoluble particles.

Table 19: Optimal conditions for Water Recovered Protein (WRP) and the Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP) to mimic a commercial sodium caseinate (NaCas), considering the size distribution and emulsion stability separately (A), or all properties taken together (B). Protein concentration (C), pH, and ionic strength (I) are given to mimic a NaCas tested at 12.5 % protein, pH 5.55, and 0.2 M added NaCl. d: desirability function of a response value equal to y on a scale of 0 to 1; D: all responses were combined for a single desirability score.

A	WRP	Reference NaCas	d	D	GGRP	Reference NaCas	d	D
C (%)	5.32	12.50			7.44	12.5		
pH	6.96	5.55			5.47	5.55		
I (M NaCl added)	0.065	0.20			0.003	0.2		
d_{3,2} (µm)	nd	1.18	nd		27.7	1.18	0.80	
d_{4,3} (µm)	8.30	8.31	0.99	0.99	nd	8.31	nd	0.8
span	1.97	1.97	1		nd	1.97	nd	
C (%)	16.25	12.5			7.75	12.5		
pH	6.62	5.55			5.78	5.55		
I (M NaCl added)	0.08	0.20			0.2	0.2		
TSI 1h	10	10	1	1	10	10	1	1

B	WRP	Reference NaCas	d	D	GGRP	Reference NaCas	d	D
C (%)	14.97	12.50			10.92	12.5		
pH	4.00	5.55			6.01	5.55		
I (M NaCl added)	0.24	0.20			0.08	0.20		
d_{3,2} (µm)	nd	1.18	nd		33.39	1.18	0.75	
d_{4,3} (µm)	15.17	8.31	0.72	0.77	nd	8.31	nd	0.87
span	1.63	1.97	0.62		nd	1.97	nd	
TSI 1h	10	10	0.99		10	10	0.99	

Concerning emulsion stability after 1h rest (TSI 1h), maximum desirability was calculated for the two protein ingredients (Table 19A), indicating that some conditions exist in the CCD investigated, for WRP and GGRP to perfectly mimic the stability of NaCas emulsions. Compared with the reference NaCas emulsion tested, the pH must be either similar for GGRP (pH 5.78 vs. pH 5.55), or higher for WRP (pH 6.62); NaCl addition should be the same for GGRP (0.2 M), lower for WRP (0.08 M); protein concentration should be higher for WRP (16.25 % vs. 12.5 %), lower for GGRP (7.75 %). Therefore, it can be concluded that the WRP proteins are almost as effective as NaCas in stabilizing emulsions, and that the GGRP proteins are even more effective, bearing in mind that stability is a major criterion of emulsion quality. According to the literature, NaCas-stabilized emulsions are unstable at a pH close to the isoelectric point of caseins (pH~4.6), at high processing and storage temperatures, at high ionic strength, and at high caseinate concentration (Ma & Chatterton, 2021). These factors actually limit the use of NaCas in acidic or salt-rich foods, and the experimental conditions set in the present study to evaluate NaCas as a reference emulsifier (pH 5.55, 0.2 M NaCl, 12.5 % protein, and 50 °C) may not be optimal. Lastly, it should be noted that maximum desirability for emulsion stability is obtained in a wide range of experimental conditions in the CCD investigated, and this for the two ingredients (Figure 32),

suggesting a wide range of food applications for which WRP and the GGRP may be efficient ingredients to stabilize emulsions.

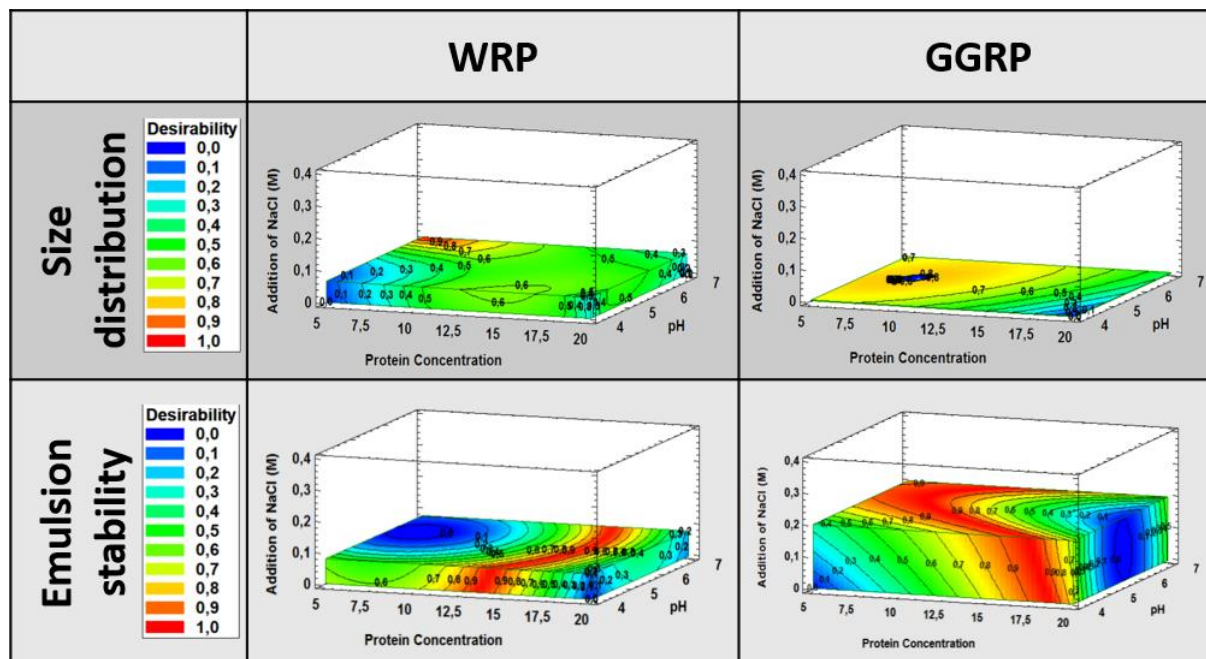


Figure 32: Desirability mapping for the two categories of emulsifying properties of Water Recovered Proteins (WRP) and Greasy Greaves Recovered Proteins (GGRP). Desirability values indicate the capability of each ingredient to mimic a commercial sodium caseinate, for separately droplet size distribution, or emulsion stability after 1 h rest. The optimization of droplet size distribution simultaneously considers $d_{4,3}$ and span for WRP, and $d_{3,2}$ only for GGRP. Desirability is presented as a function of protein concentration and pH, the ionic strength (M added NaCl) being set in each case for the maximum desirability.

To go further, multi-response optimizations were performed for both ingredients, including all emulsifying properties together. The optimal conditions thus defined, and corresponding desirability scores are summarized in Table 19B; the desirability maps are presented in Figure 33. This exhibits that, although high desirability scores were calculated when emulsifying properties were considered separately (see above), it is quite impossible to determine experimental conditions that met perfectly all objectives at the same time. However, an almost maximal d score (0.99) was calculated for emulsion stability for both ingredients, and the overall desirability scores (D) were quite high for WRP and GGRP, with D scores of 0.77 and 0.87, respectively. For WRP, this optimum desirability score is obtained for a higher protein concentration compared to NaCas (14.97 % *vs.* 12.5 %), a lower pH (4.00 *vs.* 5.55) and a little more added NaCl (0.24 M *vs.* 0.2 M). For GGRP, the optimal conditions are a lower protein concentration than that of the NaCas reference emulsion (10.92 % *vs.* 12.5 %), a higher pH (6.01 *vs.* 5.55) and a lower addition of NaCl (0.08 M *vs.* 0.2 M). However, even under optimal conditions, the GGRP-based emulsion is much coarser than the NaCas-based reference emulsion, with a lipid droplet size ($d_{3,2}$) of 33.39 μm *vs.* 1.18 μm , respectively.

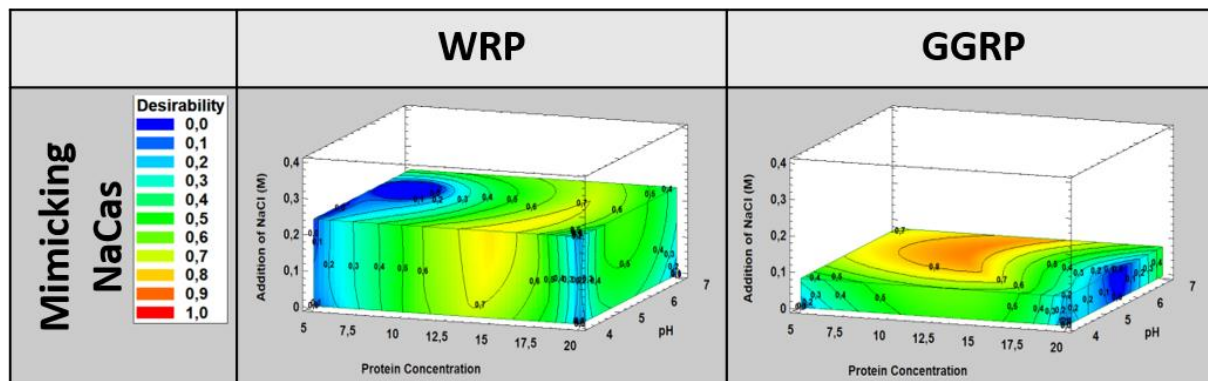


Figure 33: Desirability mapping for all emulsifying properties of Water Recovered Proteins (WRP) and Greasy Greaves Recovered Proteins (GGRP) taken together. Desirability values indicate the capability of each ingredient to mimic a commercial sodium caseinate in all dimensions of emulsifying properties ($d_{3,2}$, $d_{4,3}$, span, stability). Desirability is presented as a function of protein concentration and pH, the ionic strength (M added NaCl) being set in each case for the maximum desirability.

4.3. Supplementary data

Table S1. PCA setting of the gelling properties study

Eigenvalues

	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4	Dim.5	Dim.6
Variance	3.678	1.787	0.317	0.192	0.022	0.005
% of var.	61.298	29.781	5.277	3.193	0.373	0.078
Cumulative % of var.	61.298	91.078	96.356	99.549	99.922	100.00

Active variables	Dim.1	ctr	cos2	Dim.2	ctr	cos2
Deformation Rupture	0.977	25.937	0.954	-0.141	1.120	0.020
Strength Rupture	0.640	11.132	0.409	0.702	27.570	0.493
Hardness	-0.385	4.028	0.148	0.847	40.195	0.718
Cohesiveness	0.941	24.083	0.886	-0.279	4.367	0.078
Adhesiveness	-0.956	24.854	0.914	0.138	1.067	0.019
Water Holding Capacity	0.605	9.966	0.367	0.677	25.682	0.459

Supplementary variables	Dim.1	cos2	Dim.2	cos2
pH	0.079	0.006	0.083	0.007
Protein concentration	-0.115	0.013	0.955	0.912
Ionic strength	0.050	0.002	-0.020	0.000
Soluble protein	0.921	0.849	-0.357	0.127

Supplementary individuals	Dist	Dim.1	cos2	Dim.2	cos2
Beef Gelatin 240B_90°C	2.528	2.123	0.705	-1.147	0.206
Beef Gelatin 240B_50°C	3.122	2.312	0.548	-1.131	0.001
Beef Gelatin 150B_90°C	2.282	1.418	0.386	-1.615	0.501
Beef Gelatin 150B_50°C	2.712	1.498	0.305	-2.064	0.579

Supplementary categories	Dist	Dim.1	cos2	v.test	Dim.2	cos2	v.test
GGRP	1.830	-1.765	0.931	-5.444	0.480	0.069	2.124
WRP	1.830	1.765	0.931	5.444	-0.48	0.09	-2.124

Correlation matrix

	pH	Protein concentration	Ionic strength	Soluble protein	Adhesiveness	Cohesiveness	Deformation Rupture	Hardness	Rupture Strength	WHC
pH	1.00	-6.45e-19	0.00	0.002	-0.097	0.065	0.028	0.049	0.036	0.172
Protein concentration		1.00	-3.38e-021	-0.451	0.267	-0.392	-0.239	0.821	0.634	0.568
Ionic strength			1.00	-0.008	-0.040	0.002	0.089	-0.063	-0.075	0.132
Soluble protein				1.00	-0.917	0.967	0.964	-0.654	0.367	0.284
Adhesiveness					1.00	-0.981	-0.929	0.401	-0.477	-0.445
Cohesiveness						1.00	0.944	-0.535	0.391	0.337
Deformation Rupture							1.00	-0.501	0.550	0.480
Hardness								1.00	0.322	0.242
Rupture Strength									1.00	0.785
WHC										1.00

Table S2. PCA setting of the emulsifying properties study

Eigenvalues

	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4
Variance	2.738	0.896	0.311	0.055
% of var.	64.454	22.396	7.764	1.386
Cumulative % of var.	68.454	90.850	98.614	100.000

Active variables	Dim.1	ctr	cos2	Dim.2	ctr	cos2
d_{3,2}	0.939	32.179	0.881	-0.036	0.141	0.001
d_{4,3}	0.970	34.381	0.941	0.091	0.914	0.008
span	0.780	22.208	0.608	0.498	27.717	0.248
TSI 1h	-0.555	11.232	0.308	0.799	71.228	0.638

Supplementary variables	Dim.1	cos2	Dim.2	cos2
pH	-0.045	0.002	-0.085	0.007
Protein concentration	0.176	0.031	-0.783	0.613
Ionic strength	0.036	0.001	-0.145	0.021
Soluble protein	-0.962	0.925	-0.158	0.025

Supplementary individuals	Dist	Dim.1	cos2	Dim.2	cos2
Sodium caseinate	1.792	-1.522	0.721	-0.780	0.190

Supplementary categories	Dist	Dim.1	cos2	v.test	Dim.2	cos2	v.test
GGRP	1.600	1.592	0.352	5.692	0.147	0.008	0.918
WRP	1.600	-1.592	0.990	-5.692	-0.147	0.008	-0.918

Correlation matrix

	pH	Protein concentration	Ionic strength	Soluble protein	d_{3,2}	d_{4,3}	span	TSI 1h
pH	1.00	-1.20e-18	0.00	0.003	-0.065	-0.015	-0.090	-0.040
Protein concentration		1.00	0.00	-1.75e-18	0.242	0.070	-0.266	-0.706
Ionic strength			1.00	-0.008	0.068	0.077	-0.121	-0.092
Soluble protein				1.00	-0.857	-0.954	-0.861	0.406
d _{3,2}					1.00	0.926	0.612	-0.456
d _{4,3}						1.00	0.747	-0.416
Span							1.00	-0.113
TSI 1h								1.00

En résumé

- Une similitude globale a été obtenue entre les gels WRP et les gélatines commerciales, ce qui a été confirmé par l'optimisation multi-réponse. Un bon score global de désirabilité a ainsi été obtenu avec le WRP qui peut imiter de manière satisfaisante la gélatine, en particulier la gélatine 150 Bloom, à condition d'utiliser une concentration protéique plus élevée (environ 9% contre 5% pour la gélatine). Le WRP est donc une alternative efficace à la gélatine en tant qu'agent gélifiant.
- En revanche, il n'a pas été possible d'obtenir des performances similaires à celles des gélatines avec le GGRP, à l'exception de la résistance à la rupture et de la capacité de rétention d'eau des gels.
- Le GGRP et le WRP peuvent imiter le NaCas en ce qui concerne la stabilité de l'émulsion, ce qui a été confirmé par l'optimisation multi-réponse, avec un score de désirabilité maximal (1) pour les deux ingrédients sur ce critère.
- Le WRP et le GGRP diffèrent fortement en ce qui concerne la distribution de la taille des gouttelettes lipidiques, les émulsions à base de GGRP étant beaucoup plus grossières que les émulsions à base de WRP et de NaCas.
- Les deux ingrédients sont des alternatives efficaces au NaCas, notamment en raison de leur grande capacité à stabiliser les émulsions. Le GGRP pourrait même être considéré comme plus efficace que le NaCas, car la concentration optimale en protéines est plus faible pour le GGRP (11 %) que pour l'émulsion de référence à base

5. The flow properties of a beef protein co-product recovered from process water, can be modulated to mimic the flow behavior of commercial gelatin solutions

Rozenn Le Foll¹, Françoise Nau^{1,*}, Pascaline Hamon¹, Catherine Guérin-Dubiard¹, Xavier Lambert², Amélie Deglaire¹, Valérie Lechevalier¹

¹INRAE, Institut Agro, STLO, 35042 Rennes, France

²CORNILLE sas, 35500 Cornillé, France

Keyword : Animal co-product; Beef protein; Collagen; Optimization; Flow properties

5.1. Abstract

Food thickeners are widely used to modify the rheological (viscosity and flow behavior) properties of foods. Meat proteins are compositionally and structurally complex materials and can exhibit a wide range of flow behaviors under different conditions. The objective of this study was to better understand the flow behavior of an innovative protein ingredient (WRP), derived from water recovered from a beef co-product treatment process. This ingredient can offer a sustainable protein resource, while the valorization of protein co-products is now imperative. As protein concentration, pH and NaCl content may affect the flow properties, the present study aims also to determine the optimal conditions under which this innovative bovine co-product can mimic the flow properties of commercial gelatins. In fact, ionic strength did not affect the flow behavior of the coproduct in the experimental domain explored, while pH had a very limited impact. In the end, the WRP ingredient exhibited a shear-thinning behavior at high protein concentration only (> 8 %), and proved to be suitable to mimic commercial gelatins. The behavior of 150 and 240 Bloom commercial gelatins (5 %) can be mimic by providing 5.78 and 6.82 % protein, respectively.

5.2. Results and Discussion

5.2.1. *WRP solutions exhibit a shear-thinning behavior, mainly affected by protein concentration*

An important flow characteristic observed for all WRP solutions is the presence of a yield stress (σ_0 ; Table 20). This behavior reflects the tendency of particles and/or molecules to organize themselves to facilitate the flow when the shear rate exceeds this threshold. It also indicates that, when the solutions are allowed to stand, there is a cross-linked or other interactive structure, which has to be broken down before flow can occur at an appreciable rate (Cheng, 1986).

The yield stress, measured at 50 °C, ranges from 0.001 to 0.127 Pa depending on the experimental conditions (pH, protein concentration, and ionic strength, *supplementary data*, Table S1). As for the consistency coefficient K, it varies from 0.002 to 0.047 Pa.s depending on the same experimental conditions (*supplementary data*, Table S1). Moreover, the flow index (n) is close to 1, ranging from 1.08 to 0.87 depending on the experimental conditions, which is indicative of a Newtonian to a shear-thinning behavior (*supplementary data*, Table S1) (Couarraze et al., 2014). As a comparison, a 0.25 % xanthan solution has a much higher yield stress and consistency coefficient at 49 °C (0.79 Pa and 0.43 Pa.s, respectively), but lower flow index (0.41), which is indicative of a higher shear-thinning behavior.

In order to assess the relative impact of pH, protein concentration, and ionic strength on the flow behavior of WRP solutions, a regression analysis of the experimental data has been carried out, from all the experimental conditions described in Table 13 (see section 3.2.2). Quadratic models indicate very high R² values (83.13 to 96.56 %), meaning that the variation in experimental data set is satisfactorily explained by the estimated equations (Table 20). The most striking result is that the flow behavior of WRP solutions mainly depends on protein concentration that significantly affects the yield stress (τ_0), the consistency coefficient (K), and the flow index (n) (Table 20). The plus or minus designation of the coefficients indicates that the yield stress and consistency coefficient increase with protein concentration, whereas the flow index decreases. Therefore, as the protein concentration increases, the shear rate required to allow the flow of the solutions, as well as their shear-thinning nature increase. The increased yield stress and consistency coefficient as the protein concentration increases could be explained by the presence of collagen. Indeed, at a concentration higher than 0.75 % and in the range of 0.01–10 Hz, the complex viscosity values of collagen solutions was shown to increase exponentially (Lai et al., 2008). The presence of collagen might also explain the shear-thinning behavior of the WRP solutions, since such a behavior was previously described for this protein in solution (Lai et al., 2008); Duan et al., 2013). Without shear rates, collagen particles maintain an irregular internal order and become entangled. As the shear rate increases, collagen particles unravel due to shear forces, and slide on top of each other more easily. Lastly, as the shear rate further increases, collagen particles disintegrate into monomers, and the flow of the solutions becomes easier, resulting in a decrease in the apparent

viscosity (Duan et al., 2013). However, a Newtonian flow behavior is usually reported for gelatin solutions (Wulansari et al., 1998; Marcotte et al., 2001), which may be a technical advantage from an industrial point of view, since it ensures proper handling of the solutions, independently of the stream flow.

Table 20: Regression coefficients and analysis of variance of the regression models for the flow behavior characteristics of Water Recovered Protein (WRP) solutions at 50 °C. C: protein concentration; I: ionic strength;

	Yield stress (τ_0)	Consistency coefficient (K)	Flow index (n)
Constant	0.010	0.013	0.910
<i>Linear</i>			
pH	-0.008	-0.002*	0.008
C	0.032*	0.013*	-0.062*
I	0.001	-0.001	0.003
<i>Interaction</i>			
pH x C	-0.017	-0.003*	0.006
pH x I	-0.007	-0.002	0.003
C x I	-0.001	-0.001	-0.003
<i>Quadratic</i>			
pH x pH	0.005	-0.001	0.006
C x C	0.024*	0.005*	0.029*
I x I	-0.002	-0.001	-0.001
R²	83.13	96.04	96.56
p-value	0.02	0.00	0.00

Moreover, the quadratic coefficient of the protein concentration also has a significant effect on the three rheological parameters (τ_0 , K, and n) describing the WRP solutions (Table 20). Thus, in the experimental domain explored, there is a minimum value for the yield stress, consistency coefficient and flow index of WRP solutions (0, 0 and 0.85, respectively), obtained when the protein concentration is 6.09 %, 5.27 % and 19.31 %, respectively. The corresponding response surfaces are presented in Figure 34.

In addition, pH significantly affects the consistency coefficient of WRP solutions, the sign of the regression coefficient being negative (Table 20). Thus, the higher the pH, the lower the consistency coefficient, meaning a decreasing viscosity. This result is in agreement with Amis et al. (1985), who described a decreased viscosity of dilute collagen solutions when pH increases from pH 4.0 to pH 7.4. These authors hypothesized a change in the molecular structure of collagen as pH increases, from a rod-like molecule with partial flexibility to a semi-flexible rod with loose joints to the ends. However, the pH regression coefficient is much lower than that of the protein concentration. Thus, it may be concluded that the protein concentration has a much greater effect than pH on the flow parameters of WRP solutions. Moreover, it is noticeable that, in the experimental domain considered in the present study, ionic strength has no significant effect on the flow behavior of WRP solutions. This is consistent with data previously reported for collagen solutions, for which no or very low differences were observed for the three rheological parameters depending on NaCl concentration (0 to 0.3 M; Duan et al., 2013).

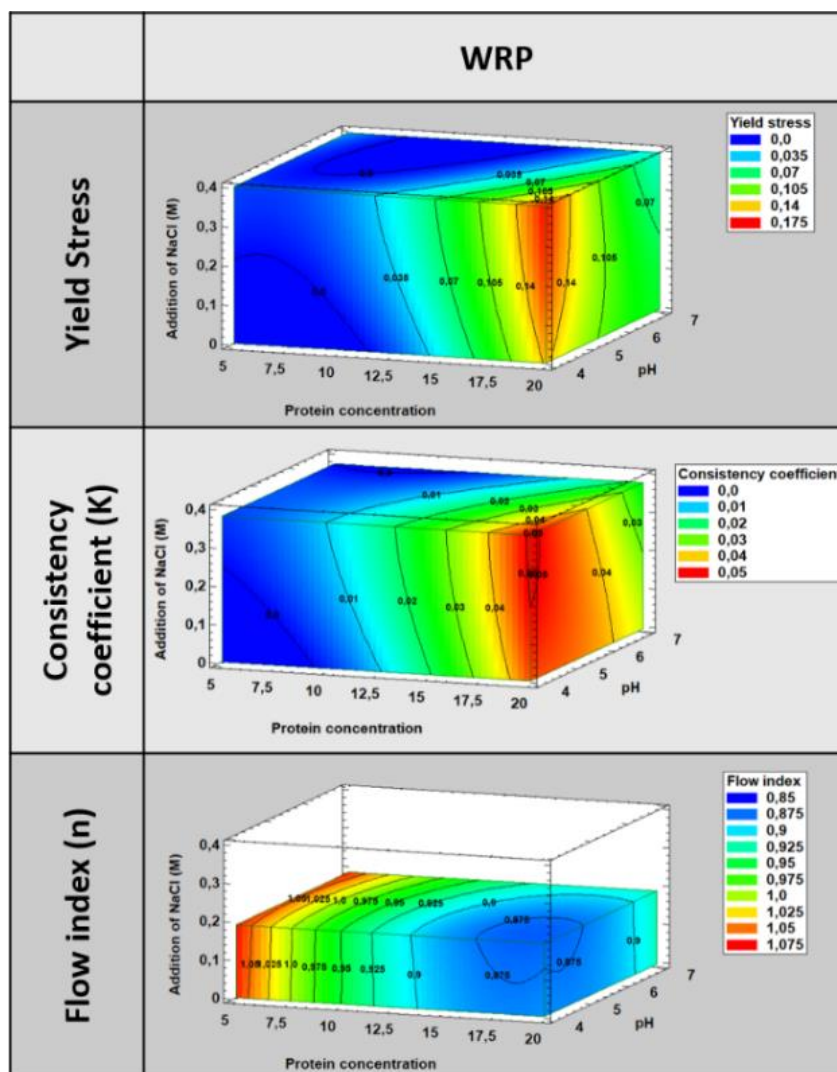


Figure 34: Rheological properties of Water Recovered Protein (WRP) solutions at 50 °C depending on protein concentration, pH, and ionic strength. The added NaCl level set for the cross-section of response surfaces is that corresponding to the optimum for each characteristic (maximum value).

5.2.2. WRP solutions can mimic the flow behavior of commercial gelatin solutions

It was previously established that WRP ingredient mainly consists of proteins (around 62 %), the major part of which are soluble at low ionic strength (Table 14, see section 3.3.2). In order to assess to what extent and under what physicochemical conditions the WRP ingredient could substitute gelatin as a thickening agent, a multi-criteria optimization was carried out, comparing it to two commercial beef gelatins of different gel strength (240 and 150 Bloom). Optimal protein concentration, pH and ionic strength conditions could be actually determined in the experimental domain investigated, for WRP solutions to mimic almost exactly the flow behavior of the two beef gelatins tested at 5 % protein, pH 5.55 and 0.2 M added NaCl, *i.e.* in conditions that correspond to the central point of the CCD (Table 21). Moreover, a very high optimum desirability value, *i.e.* very close to 1.00, could be achieved in a fairly wide experimental domain around these optimal conditions, for a reasonable compromise between the three rheological variables, namely yield stress, consistency coefficient, and flow index (Figure 35).

Table 21: Optimal conditions for Water Recovered Protein (WRP) solutions to mimic the flow behavior of commercial beef gelatins. Protein concentration (C), pH, and ionic strength (I) are given to mimic either a 150 Bloom, or a 240 Bloom gelatin, both tested at 5 % protein, pH 5.55, and 0.2 M added NaCl. d: desirability function of a response value equal to y on a scale of 0 to 1; D: all responses were combined for a single desirability score.

	WRP	Reference 150 GB	d	D	WRP	Reference 240GB	d	D
C (%)	5.78	5.00			6.82	5.00		
pH	5.53	5.55			5.77	5.55		
I (M NaCl added)	0.087	0.20			0.00	0.20		
Yield stress (Pa)	0.0061	0.0062	0.99		0.0027	0.0027	0.99	
Consistency coefficient (K; Pa.s ⁿ)	0.0038	0.0038	1.00	0.99	0.0040	0.0040	0.99	0.99
Flow index (n; dimensionless)	1.03	1.03	0.99		1.00	1.00	0.99	

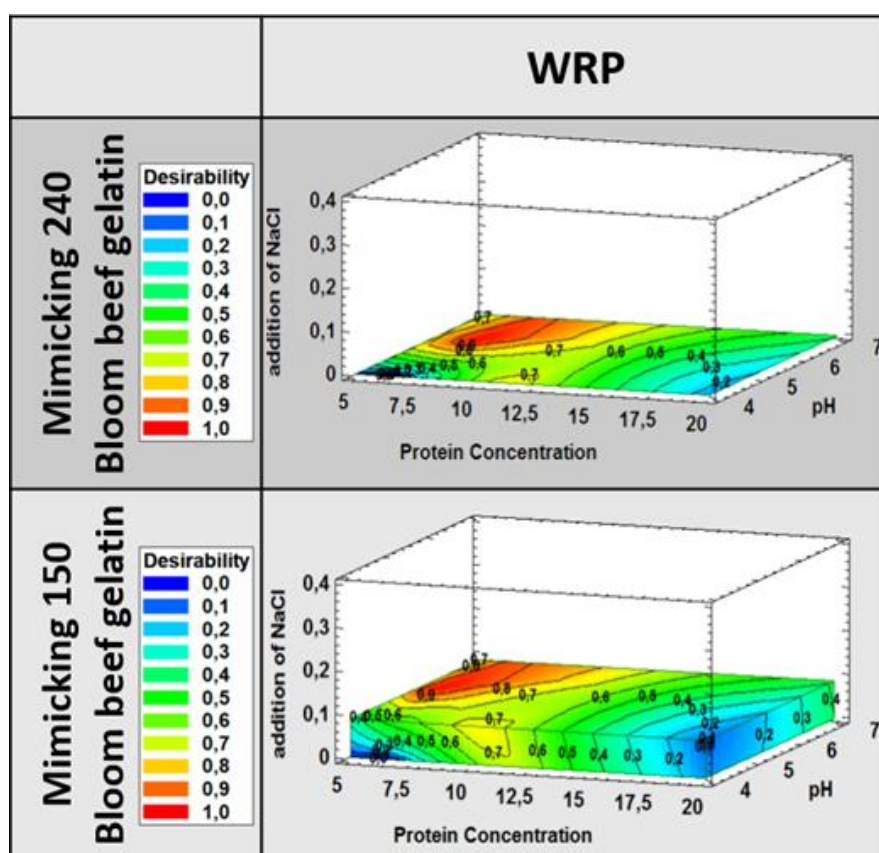


Figure 35: Desirability mapping for the rheological properties of Water Recovered Protein (WRP) solutions at 50 °C. Desirability values indicate the capability of each ingredient to mimic a 150 Bloom and a 240 Bloom beef gelatin in all dimensions of rheological properties (yield stress, consistency coefficient and flow index). Desirability is presented as a function of protein concentration and pH, the ionic strength (M added NaCl) being set in each case for the maximum desirability.

Same rheological properties can be obtained with WRP and beef gelatin 240 Bloom, provided that the protein concentration of WRP is higher (6.82 % *vs.* 5 %), the pH is higher (5.77, *vs.* 5.55), and the ionic strength is lower (0 M added NaCl *vs.* 0.2 M). The conditions differ to approximate the rheological properties of beef gelatin 150 Bloom. As expected, the protein concentration has to be lower (5.78 % for WRP) but still higher than the one used for gelatin, whereas the pH is very similar (5.53), and the ionic strength still lower than for gelatin (0.09 M NaCl). The lower ionic strength required for WRP to mimic beef gelatin solutions very likely results from the natural NaCl content of WRP (5.96 % of the WRP powder). As for the higher protein concentration required, it was expected as WRP contain only 80 % soluble proteins, involved in the thickening behavior.

In any event, it should be highlighted that it is possible to mimic the overall flow behavior of commercial beef gelatins at 50 °C, with WRP solutions in conditions relevant with usual meat products. Moreover, although WRP ingredient is not purified proteins, the protein concentration required for WRP to mimic the commercial gelatins is not far greater in comparison with these purified ingredients. In particular, a 5.8 % protein WRP solution can mimic a 5 % protein beef gelatin 150 Bloom. In other words, this latter ingredient may be substituted by WRP ingredient as a thickening agent at 50 °C. In addition, the process for obtaining WRP is much less energy-intensive and without chemical reagents, unlike conventional gelatin production processes.

5.3. Supplementary data

Table S1. Experimental measurements of the rheological property of Water Recovered Protein (WRP) ingredients. C: protein concentration; I: ionic strength. Each value is the mean of three measurements \pm SD. Values in bold are those mentioned in the text.

Trial	Sample	pH	C	I	Yield stress (Pa)	Consistency coefficient (K, Pa.sn)	Flow index (n)
1	WRP	5.55	12.5	0.2	0.001 ± 0.001	0.011 ± 0.000	0.920 ± 0.004
2	WRP	4.44	7.2	0.34	0.007 ± 0.000	0.004 ± 0.000	1.010 ± 0.008
3	WRP	5.55	20	0.2	0.127 ± 0.001	0.047 ± 0.003	0.874 ± 0.018
4	WRP	4.44	17.8	0.06	0.083 ± 0.001	0.032 ± 0.001	0.879 ± 0.004
5	WRP	5.55	12.5	0.4	0.012 ± 0.001	0.014 ± 0.001	0.912 ± 0.005
6	WRP	5.55	12.5	0.2	0.014 ± 0.001	0.015 ± 0.000	0.898 ± 0.001
7	WRP	5.55	5	0.2	0.007 ± 0.001	0.002 ± 0.000	1.081 ± 0.013
8	WRP	4.44	7.2	0.06	0.006 ± 0.002	0.004 ± 0.000	0.990 ± 0.000
9	WRP	4	12.5	0.2	0.010 ± 0.012	0.014 ± 0.001	0.907 ± 0.016
10	WRP	5.55	12.5	0.2	0.010 ± 0.008	0.013 ± 0.000	0.910 ± 0.000
11	WRP	5.55	12.5	0	0.013 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.920 ± 0.001
12	WRP	6.56	7.2	0.06	0.003 ± 0.002	0.004 ± 0.000	0.990 ± 0.000
13	WRP	7	12.5	0.2	0.046 ± 0.046	0.010 ± 0.001	0.948 ± 0.027
14	WRP	4.44	17.8	0.34	0.114 ± 0.016	0.038 ± 0.001	0.869 ± 0.004
15	WRP	6.56	17.8	0.06	0.041 ± 0.001	0.028 ± 0.003	0.892 ± 0.007
16	WRP	6.56	7.2	0.34	0.006 ± 0.000	0.004 ± 0.000	1.011 ± 0.005
17	WRP	6.56	17.8	0.34	0.009 ± 0.012	0.016 ± 0.001	0.906 ± 0.011
18	WRP	5.55	12.5	0.2	0.002 ± 0.002	0.014 ± 0.001	0.901 ± 0.004

En résumé

- Le paramètre le plus influent sur les propriétés d'écoulement du WRP est la concentration en protéines qui, lorsqu'elle augmente, accentue son caractère rhéofluidifiant.
- Le comportement à l'écoulement d'une solution de WRP peut être similaire à celui de solutions de gélatines, à condition de se placer à concentration en protéines plus élevée : 5,78% ou 6,82% de protéines de WRP pour mimer des solutions à 5 % de gélatine respectivement 150 ou 240 Bloom.

6. Conclusion

As a reminder, the objective of this chapter was to characterize as completely as possible the functional properties (gelling, emulsifying and thickening) of the two co-products WRP and GGRP, under physicochemical conditions relevant for usual food applications, *i.e.* between pH 4 and pH 7, and without or with the addition of NaCl up to 0.4 M. The question then arose as to whether these two co-products could be effective substitutes for common functional ingredients, such as gelatin and NaCas, chosen as references for gelling and thickening, and emulsifying, respectively.

It has been shown that WRP and GGRP have good gelling and emulsifying properties, and shear thinning behavior, all mainly influenced by protein concentration. These functionalities are particularly favorable in salty applications (meat product types). In addition, the low impact of ionic strength and pH on the functional properties studied should be considered as a positive point, as these ingredients can therefore be considered in many food applications, without constraints related to these two key physicochemical parameters in food science and food technology. The only parameter to control would be their rate of incorporation into the food. The gelling properties of GGRP are not similar to those of gelatin (except for rupture strength and WHC), unlike WRP, which is close to the performance of gelatin. WRP can thus satisfactorily mimic gelatin, especially 150 Bloom gelatin, provided that a higher protein concentration is used (about 9 % versus 5 %). It can therefore be concluded that WRP could be an effective alternative to gelatin as a gelling agent. Replacing gelatin with WRP can be interesting from an economic and environmental point of view, because the production process is simpler (no step of converting collagen to gelatin), and does not require the use of chemical reagents such as acid or alkali.

Regarding emulsifying properties, GGRP and WRP can mimic NaCas. However, WRP and GGRP differed strongly with respect to the size distribution of lipid droplets, with GGRP-based emulsions being much coarser than WRP-based and NaCas-based emulsions. The two ingredients have thus appeared as effective alternatives to NaCas, especially because of their strong capacity to stabilize emulsions. GGRP could even be considered more effective than NaCas, the optimal protein concentration being lower for GGRP (11 %) than for the reference NaCas-based emulsion (12.5 %). Replacing NaCas with WRP or GGRP can be interesting from a product formulation point of view, since unlike NaCas-based emulsions that are altered at a pH close to the pI of caseins (pH 4.6), WRP- and GGRP-based emulsions are not pH-sensitive in the pH 4 to pH 7 range.

In addition, it was demonstrated that the shear thinning behavior of WRP solutions can be modulated into a Newtonian behavior like gelatin. This characteristic is important under industrial conditions, since a Newtonian behavior, which means that viscosity remains constant whatever the constraints imposed on the product during processing, is a facilitating factor.

All these findings underline the potential for WRP and GGRP to be valorized as functional ingredients, given that they are currently poorly or little valued. But beyond their technological interest, these two co-products would be all the more interesting if they also displayed a certain nutritional quality. This question is explored in the next chapter.

Chapitre 4

Qualité nutritionnelle des deux ingrédients WRP et GGRP

1. Introduction

As we enter the 21st century, agriculture and the food system face many challenges that call for changes in agricultural systems, rural economies and natural resource management to ensure a healthy and secure future for everyone and the planet as a whole (FAO, 2018b). In particular, there will be a growing demand for food and especially proteins, which leads to the search for alternative sources of proteins, while limiting the environmental impact of agriculture (OECD & FAO, 2022).

In addition, the fight against hunger and malnutrition in poor countries has been at the heart of the concerns of international agencies since the creation of the FAO/WHO Expert Committee on Nutrition. In order to combat protein-energy malnutrition, it is recommended for sensitive populations (malnourished children and the elderly) to consume more protein than the general population of children or adults. Thus, the nutritional reference for protein intake (whatever the origin) for malnourished children is 2.82 g/kg/d (FAO, 2018a) and for elderly people 1 g/kg/d (Anses, 2019) compared to 0.86-1.12 and 0.83 g/kg/d for healthy children and healthy adults (FAO, 2013). In order to compensate for these nutritional deficiencies and facilitate food intake, nutritional strategies have been developed for these populations, in particular via supplementation with animal proteins or EAA in order to effectively compensate for nutritional deficits (de Vries-ten Have et al., 2020; Hsu et al., 2014; Dardevet et al., 2021). However, protein resources of animal origin are not always affordable or accessible to these populations (Neumann et al., 2014). For these various reasons, the development of new food ingredients based on meat by-products could meet these requirements (Anzani et al., 2020). Therefore, the development of protein ingredients from co-products, such as meat co-products that are little valorized in human food, is a promising way to meet current challenges (Lynch, Mullen, et al., 2018), provided that these ingredients are of good nutritional quality.

To date, the nutritional quality of proteins can only be reliably determined by *in vivo* experiments, the growing pig model being recommended when experiments in humans are not possible, due to the proximity of its digestive physiology to that of humans (FAO, 2014). Several studies have shown a good correlation regarding protein digestibility between humans and pigs (Hodgkinson et al., 2022 ; Deglaire et al., 2009). Furthermore, measuring ileal amino acid (AA) digestibility is preferable to fecal AA digestibility to assess accurately the net absorption of dietary AAs by the host (FAO, 2013), as the colonic fermentation modifies the profile of the residual dietary AAs. Ileal AA digestibility, combined with the AA profile of the dietary proteins, makes it possible to determine the digestible indispensable amino acid score (DIAAS), such as recommended by FAO (2013) to assess the quality of proteins in foods and food ingredients for humans. Concomitantly, the concentration of AAs in plasma can be monitored to determine the AA release kinetics, a factor that can modulate their postprandial metabolic fate (Boirie et al., 1997 ; Nørgaard et al., 2021).

The present chapter aimed to characterize the nutritional quality of the two protein ingredients WRP and GGRP, obtained from bovine co-products during the beef fat rendering process, and not yet characterized from this point of view. Indeed, these two protein ingredients are currently an untapped source in human food, although they are fully compliant with the European regulations in this area (Corrigendum to Regulation (EC) No 852/2004). Moreover, the functional properties of these protein ingredients, described in the previous chapter, indicate that they could be interesting ingredients for food texturing. In order to promote their use in human food, in particular for protein enrichment for specific populations (children or elderly people), it was first necessary to evaluate the nutritional quality of these protein ingredients through the measurement of their true ileal AA digestibility (TID), their DIAAS and the kinetics of plasma AA release as determined in the growing pig. In addition, a study to optimize nutritional quality adapted to the needs of malnourished populations (children, elderly) was carried out using optimal combinations of bovine co-products with plant protein sources.

2. Nutritional quality of proteins from two beef co-products as determined in the growing pig

Rozenn Le Foll¹; Françoise Nau¹; Yann Le Gouar¹; Gwenaële Henry¹; Séverine Chevalier¹. Arlette Leduc¹; Pascaline Hamon¹; Catherine Guérin-Dubiart¹; Xavier Lambert², Valérie Lechevalier¹; Amélie Deglaire^{1*}.

¹INRAE, L'Institut Agro, STLO, 35042 Rennes, France

²CORNILLE sas, 35500 Cornillé, France

Keywords: beef co-product; protein; collagen; true digestibility; DIAAS; bioavailability

Article in preparation for submission to *The Journal of Nutrition* as an Original Research article

2.1. Abstract

Background: The increasing demand for food and especially for proteins, leads to the search for alternative protein sources. The valorization of co-products, such as meat co-products little valorized in human food, is a promising way to meet this challenge, which is moreover in line with the principle of circular economy.

Objective: The present study aimed to evaluate the nutritional quality of two protein ingredients of bovine origin (Greasy Greaves Recovered Proteins-GGRP and Water Recovered Proteins-WRP), both co-products of the fat rendering process.

Methods: Their true ileal digestibility (TID), digestible indispensable amino acid score (DIAAS) and kinetics of plasma amino acids (AAs) were measured in ten growing pigs each fed with the two co-products and a protein-free diet. Titanium dioxide (3 g/kg) was used as an indigestible marker. Digesta and blood samples were collected during 9 h following meal ingestion and total N and AA contents were analyzed by the Dumas method or by ion-exchange chromatography, respectively. Data were statistically analyzed using linear models.

Results: The TID of total N was not significantly different between WRP and GGRP (84.2 ± 3.2 and 81.2 ± 2.3 %, respectively; mean \pm SD). The primary limiting AA was tryptophan for both protein ingredients, with a DIAAS much higher for GGRP (74 %) than for WRP (18 %) for old children, adolescents and adults. The kinetics of AA release differed between proteins, with postprandial plasma AA concentration reaching its maximal value earlier for WRP (3 h) than for GGRP (5 h). Plasma concentration of total and essential AAs was higher ($p < 0.001$) with GGRP meal compared to WRP meal, while the opposite was true for urea ($p < 0.001$).

Conclusions: GGRP has a nutritional quality suitable to meet the needs of old children, adolescents and adults, while WRP needs to be supplemented with other protein sources rich in essential AAs to fulfill the dietary requirements.

2.2. Materials and Methods

All procedures were in accordance with the European Community guidelines for the use of laboratory animals (L358-86/609/EEC). The study was approved by the local committee for ethics in animal experimentation and by the French Ministry of Higher Education and Research (agreement number: D3527532).

2.2.1. Animals and diet

Ten male growing pigs (Large White × Land Race × Pietrain), three-months old and an initial average body weight (BW) of 35.6 kg (\pm 2.0), were used. Pigs were acclimatized for 7 days in individual pens with slatted floors. The room temperature was maintained between 21 and 24 °C (thermo-neutral zone), with a 12 h light/dark cycle. One week before starting the experiment, the pigs were surgically fitted, under general anesthesia, with a T-shaped cannula (silicone rubber) in the ileum (8 cm insert into the lumen of the digestive tract) (Wubben et al., 2001), and a catheter (polyvinyl chloride; 1.02 mm internal diameter, 2.16 mm outer diameter) in the jugular vein (about 20 cm inside the blood vessel) (Fudge et al., 2002). The pigs received no antibiotics during the experimental period. During the acclimatization and convalescence period following the surgical procedure, pigs were fed a basal diet (Table 22).

Table 22: Ingredient composition of the diets (g/kg)

Ingredient	WRP	GGRP	Protein-Free	Basal diet
Maize starch (purified)	624.60	642.76	761.57	570
Sucrose	100	100	100	100
Sunflower oil	50	50	50	50
Cellulose (purified)	30	30	30	30
Vitamin–micromineral Premix^a	5	5	5	5
Calcium carbonate	16	16	16	16
Calcium monophosphate	25	25	25	25
Sodium chloride	0	8.74	9.43	4
WRP ingredient (68.16 % crude protein, 6.44 % NaCl)	146.4	0	0	0
GGRP ingredient (83.73 % crude protein, 0.58 % NaCl)	0	119.5	0	0
Micellar casein isolate	0	0	0	200
Titanium dioxide	3	3	3	0

^aMG2MIX (Châteaubourg – France). The vitamin–micromineral premix provided the following quantities of vitamins and minerals per kg of complete diet: Vit. A: 1000,000 U.I; Vit. D3: 200,000 U.I; Vit. E : 4,000 mg; Vit. K3 (MNB): 870 mg; Vit. B1-Thiamin: 400 mg; Vit. B2-Riboflavin: 800 mg; Vit. PP-Niacin: 3,000 mg; Vit. B5-Pantothenate Ca: 2,000 mg; Vit. B6-Pyridoxine: 200 mg; Vit. H-B8-Biotin: 40 mg; Vit. B9-Folic acid: 200 mg; Vit. B12-Cyanocobalamin: 4 mg; Choline chloride: 133,333 mg; Fe (sulfate monohydrate): 16,000 mg; Cu (sulfate pentahydrate): 2,000 mg; Zn (oxide): 14,000 mg; Mn (oxide): 8,000 mg; Se (selenite): 30 mg; I (calcium): 40 mg.

The experimental diets (Table 22) were formulated in accordance with the FAO recommendations, aiming at a 10 % of dietary proteins on a dry matter basis (FAO, 2014). The tested proteins were dehydrated beef proteins, namely Greasy Greaves Recovered Proteins (GGRP) and Water Recovered Proteins (WRP), both derived from bovine co-products and supplied by a local factory (CORNILLE SAS, France). GGRP is obtained during the fat rendering process of beef. WRP is derived from water

recovery during the fat rendering process of beef, and during the bone degreasing process (Le Foll et al., 2024). Each protein ingredient was included in the experimental diet as the sole source of crude protein, so that the diets were iso-nitrogenous (Table 22). A protein-free diet (Table 22) was used to estimate basal endogenous losses of N and AAs. Each pig was its own control for the correction of endogenous losses. Titanium dioxide (TiO₂, 3 g/kg) was included as an indigestible solid phase marker for the calculation of the ileal digestibility of AAs (Jagger et al., 1992). Vitamins and minerals were included in all diets to meet current requirement estimates for growing pigs (National Research Council, 2012). Because the WRP contained a significant amount of NaCl (6.44 %), the GGRP-containing diet and the protein-free diet were supplemented with NaCl to balance the diets between them (Table 22).

2.2.2. Animals and diet Experimental design

The experiment took place on two blocks of 5 animals each. The meals were mixed with water (0.5:1, w:w). The pigs had free access to water, and were fed twice daily at 8 am and 4 pm, available for 15 min. The daily dietary ration for each pig was $0.08 \times BW^{0.75}$ (body weight, kg), calculated on a dry matter (DM) basis. Pigs were weighed at each diet change and the daily ration of each pig was adjusted according to the BW of the pig. An adaptation phase to each of the test diets was carried out during the three days preceding the experiment itself, in order to facilitate the consumption of the meal on the day of the experiment (25:75; 50:50; 75:25, diet 1 : diet 2, % w/w). Each pig received both experimental diets for 4 days, following a cross-over design. The protein-free diet was distributed after the two experimental diets, also for 4 days. Overall, the experimental period lasted for 12 days, with a total study duration of 30 days.

On the sampling day, the pigs received the experimental diet at 8 am, and the food was available for 15 min. Digesta collection started 30 min before the ingestion of the test meal and lasted for the 9 following hours. Digesta were collected continuously in pre-weighed plastic bags (Whirl-Pak, 540 ml) attached to the ileal cannula. The bags contained 1.5 ml sodium benzoate (2.3 mol/l) in order to avoid bacterial growth. Full bags were replaced with empty ones when necessary (at least after the 1st hour, then every 2 hours). Content was immediately transferred to plastic box (previously weighed) and stored at -20 °C before being freeze-dried. One portion of the freeze-dried samples were pooled over the 0-1 h, 1-3 h, 3-5 h, 5-7 h, and 7-9 h periods, and the other portion was pooled over the entire collection. Samples were pooled accordingly to the DM collected at each time point. Blood samples (2.5 ml per time point) were collected in heparin-lithium tubes at 30 min before and 20, 40, 60, 90, 120, 180, 300, 420, and 540 min after the test meal. Plasma was immediately separated by centrifugation at 4°C for 10 min at 2,500g and stored at -80 °C until AA analysis.

2.2.3. Chemical analysis

Diets were analyzed in triplicate, ileal digesta in duplicate, and plasma samples in single. Diets and ileal digesta were analyzed for DM, total AAs, total N and TiO_2 . Plasma samples were analyzed for free AAs content, urea and insulin.

The DM content of the diets and of the freeze-dried ileal digesta was determined gravimetrically at 102 ± 2 °C for 5 h.

The total AA content was determined according to Davies and Thomas (1973). Samples were hydrolyzed for 24 h in 6 N hydrochloric acid at 110 °C in vacuum sealed glass tubes. For cysteine and methionine, performic acid oxidation was carried out before acid hydrolysis. AAs were separated by ion-exchange chromatography (Biochrom30+ automatic AA Analyser), and quantified photometrically after ninhydrin derivatization (Ultra Ninhydrin Reagent Kit). Absorbance was measured at 570 nm, except for proline and hydroxyproline detection (440 nm) and AAs were quantified using an external calibration curve previously established with standards (A6407 and A6232, Sigma). Tryptophan was analyzed after sample hydrolysis with $\text{Ba}(\text{OH})_2$ for 16 h at 110 °C in Teflon tubes with screw cap (Charton et al., 2022). Tryptophan was determined using an ion-exchange HPLC system (Waters™ e2695 Separations Modul) and quantified by fluorimetry (excitation at 280 nm and emission at 346 nm). L-tryptophan standard (0 to 10 mg/l), corrected by the internal 5-methyl-tryptophan standard (3.57 mg/l), was used for tryptophan quantification.

The concentration of free AAs in plasma was determined after deproteinization of the samples (Mondino et al., 1972), using the same ion-exchange chromatography, the same ninhydrin derivatization and the same absorbance as for total AAs. For deproteinization, plasma samples were incubated with sulfosalicylic acid solution (5 % SSA, including L-Neu internal standard) at 0 °C for 1 h, then centrifuged (10,000g, 10 min) before filtration on a 0.45 µm membrane. Lithium citrate buffer was used as an eluent (Moore et al., 1958). AAs were quantified using an external calibration curve previously established with standards in lithium citrate buffer (A6407, A6232, glutamin, urea, 5 % SSA and L-Neu, Sigma). Urea content was determined concomitantly with the free AAs analysis. Insulin concentration in plasma was measured using a radioimmunoassay kit (Insulin-CT, CisBio Bioassays, Codolet, France) and an AIA-1800 device (Automated Immunoassay Analyzer; TOSOH Bioscience, Tokyo, Japan) (Eugenio et al., 2023).

Total N in diet and digesta samples was analyzed by the Dumas method on a LECO FP 828 analyzer after calibration using EDTA. Nitrogen to protein conversion factor of 6.25 was used to determine the crude protein content (AOAC international, 1992).

TiO_2 content was determined based on a method adapted from Mudunkotuwa et al. (2016). A mineralization by acid digestion assisted by microwave was first carried out (ETHOS UP, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). For this, 0.25 g of samples were heated to 210 °C in the presence of acid (2 ml HNO_3 98 % + 4 ml H_2SO_4 69 %) in Teflon digestion vessels, with a ramp time of 25 min and

a holding time of 15 min. Then 30 ml of ultrapure H₂O were added after sample cooling. The TiO₂ content was then measured using inductively coupled optical emission spectrometry (ICP-OES, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) using an external calibration curve (0 to 10 mg/l TiO₂). All samples were diluted in HNO₃ 5 % before analysis.

2.2.4. Data analysis

Total ileal N and AA flows were calculated as follows (Equation 23, in mg/g dry matter intake, DMI):

$$\text{Total Ileal N or AA flow} = [\text{Total N}]_{\text{digesta}} \text{ or } [\text{AA}]_{\text{digesta}} \times \frac{[\text{TiO}_2]_{\text{diet}}}{[\text{TiO}_2]_{\text{digesta}}} \quad [\text{Eq. 23}]$$

where $[\text{Total N}]_{\text{digesta}}$, $[\text{AA}]_{\text{digesta}}$ and $[\text{TiO}_2]_{\text{digesta}}$ were expressed in mg/g of dry matter of digesta and $[\text{TiO}_2]_{\text{diet}}$ expressed in mg/g of dry matter of diet.

The endogenous ileal N and AA flows were determined for pigs fed the protein-free diet (PF diet) as follows (Equation 24, in mg/g DMI):

$$\text{Endogenous N or AA flow} = [\text{Total N}]_{\text{digesta}} \text{ or } [\text{AA}]_{\text{digesta}} \times \frac{[\text{TiO}_2]_{\text{PF diet}}}{[\text{TiO}_2]_{\text{PF-digesta}}} \quad [\text{Eq. 24}]$$

True ileal digestibility (TID) of N and AAs were calculated in the pool digesta as follows (Equation 25, in %):

$$\text{N or AA TID (\%)} = \frac{[\text{Total N}]_{\text{diet}} \text{ or } [\text{AA}]_{\text{diet}} - (\text{Total N or AA flow} - \text{Endogenous N or AA flow})}{[\text{Total N}]_{\text{diet}} \text{ or } [\text{AA}]_{\text{diet}}} \times 100 \quad [\text{Eq. 25}]$$

with variables expressed in mg/g of DMI.

Digestible indispensable amino acid ratio (DIAAR) was calculated for each essential AA (EAA) (Equation 26), using the AA scoring pattern of the reference protein for three different populations, namely undernourished children (0.5 – 5 years-old) (FAO, 2018a), healthy children (< 3 years-old), and > 3 years-old children, adolescents and adults (FAO, 2013):

$$\text{DIAAR (\%)} = \frac{\text{mg of the EAA in 1 g of the dietary protein} \times \text{TID of the EAA}}{\text{mg of the EAA in 1 g of the reference protein}} \times 100 \quad [\text{Eq. 26}]$$

where 1 g of the dietary protein corresponded to 1 g of crude protein (total N x 6.25).

DIAAS was defined as the minimum value among all the DIAAR scores (FAO, 2013).

2.2.5. Semi-dynamic digestion and analysis of digesta

The *in vitro* semi-dynamic model (INFOGEST) was used to simulate gastric digestion of both WRP and GGRP meals. The semi-dynamic digestions were carried out according to a method adapted from Mule-Cabero et al. (2020) using pH-stat Bioreactor with a pH probe (Porotrode, Ref 60235200, 842 Titrand, Metrohm) and tiamo™ software (Metrohm). The model includes a progressive 5-step addition of gastric secretions (HCl, pepsin and simulated gastric fluid), according to Musse et al. (2023). The progressive gastric emptying was not considered in the present experiment. In this study, only the oral and gastric phases of digestion were performed, and for the oral phase only a dilution of the meals was carried out with simulated salivary fluid without enzyme. Samples (5 ml) were collected at 40, 80 and 120 min of

the gastric phase to evaluate their microstructure based on confocal microscopy and particle size distribution as well as their viscosity.

Microstructures of the reconstituted meals in water (0.5:1) and gastric digesta were observed using a laser scanning confocal microscope (ZEISS LSM880, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) at 20x magnification, at 37 °C, as described by Chauvet et al. (2023). The particle size distribution of these samples was determined using laser light scattering with a Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instrument Ltd., Worcestershire, UK). The refractive index of protein was set at 1.52 and that of water at 1.33. The particle diameter was expressed as the median diameter $d(0.5)$ and the volume-weighted average diameter $d_{4,3}$ using Equation 27:

$$d_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad [\text{Eq. 27}]$$

with n_i the number of droplets of diameter d_i .

The rheology of the reconstituted meals in water (0.5:1) and of the gastric digesta was measured using a rheometer (AR2000, EX TA Instrument) as described by Wu et al. (2017) with a slight modification, a know that the scanning range of the steady shear rate was 0.1–500 s^{-1} . The viscosity value considered for result analysis was that measured at 10 s^{-1} .

2.2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the R software (version 3.6.2) (R Core Development Team, 2020). A linear model was used to test the diet effect and block effect on the TID of total N and of each AA. Normality (Shapiro-Wilk test) and homoscedasticity (Levene's tests) of the model residuals were verified ($p > 0.05$).

The plasma AA concentrations were statistically analyzed by a linear model (lmerTest package) for repeated measures over time considering the factors "diet" (WRP, GGRP), "time" (-30, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 300, 420, 540) and their interaction. When a difference was significant for the interaction, a post-hoc test was performed to establish the pairwise comparisons (Emmeans, Tuckey adjustment). Statistical significance was reached at $p \leq 0.05$. Normality (Shapiro-Wilk test) and homoscedasticity (Levene's tests) of the model residuals were verified ($p > 0.05$).

Data are presented as mean \pm SEM, unless otherwise mentioned.

2.3. Results

The pigs stayed healthy throughout the experimental period. Minimal leakage occurred from the ileal cannula during digesta collection (one WRP-fed pigs was excluded). They weighed 35.6 ± 2.0 kg at the beginning of the study (before surgery) and 41.6 ± 3.8 kg (mean \pm SD) at the end of the study. All pigs readily consumed the diets with the exception of three pigs for the WRP diet (meal refusal $> 50\%$) that were thus excluded from the data analysis for both the digestibility and plasma AA dataset. Therefore,

the final dataset included digestibility data for 6 WRP-fed pigs and 10 GGRP-fed pigs, and plasma AA data for 7 WRP-fed pigs and 10 GGRP-fed pigs.

2.3.1. Crude protein and amino acid composition of the diets

Crude protein content of the WRP or GGRP diets, 11.4 % and 12.1 % on a DM basis respectively, was slightly higher than the FAO recommendation for the measurement of protein digestibility (10 % dietary protein), but in the same range between diets (Table 23). Individual AA contents varied between the two diets (Table 23), with the WRP diet containing less EAAs than the GGRP diet (216.26 vs. 329.95 mg/g protein, respectively). Tryptophan was the least abundant EAA in WRP and GGRP diets, while the most abundant was lysine in WRP and leucine in GGRP.

Table 23: Protein and amino acid composition of the experimental diets (%) containing WRP or GGRP. Data are mean values \pm SD (n = 3)

	Diets	
	WRP	GGRP
Dry matter (g/ 100 g experimental diet)	91.4 \pm 0.1	91.1 \pm 0.2
Crude protein (N \times 6.25) (g/100 g DM)	11.4 \pm 0.1	12.1 \pm 0.1
Essential Amino Acids (mg/g of protein)		
Cys	3.75 \pm 0.17	9.37 \pm 0.67
His	28.02 \pm 0.44	16.21 \pm 0.75
Ile	17.01 \pm 0.24	30.18 \pm 0.86
Leu	38.27 \pm 0.57	62.65 \pm 1.11
Lys	42.01 \pm 0.61	55.30 \pm 2.40
Met	7.02 \pm 0.35	16.83 \pm 0.73
Phe	20.09 \pm 0.21	32.42 \pm 0.68
Tyr	9.60 \pm 0.15	19.94 \pm 0.53
Thr	21.78 \pm 0.35	32.18 \pm 0.91
Trp	1.31 \pm 0.02	6.33 \pm 0.08
Val	27.38 \pm 0.38	48.53 \pm 1.21
Total	216.3 \pm 3.50	329.95 \pm 9.92
Non-essential Amino Acids (mg/g protein)		
Ala	83.10 \pm 1.30	80.47 \pm 1.06
Arg	68.06 \pm 0.94	63.85 \pm 2.43
Asp ¹	60.06 \pm 0.85	71.00 \pm 2.40
Glu ²	120.46 \pm 2.04	111.18 \pm 4.22
Gly	188.99 \pm 2.84	143.08 \pm 4.57
Pro	97.85 \pm 1.53	81.62 \pm 2.38
HyPro	87.81 \pm 1.35	57.06 \pm 2.86
Ser	30.60 \pm 0.48	34.80 \pm 0.95
Total	736.93 \pm 11.3	643.05 \pm 20.9
Total amino acids	953.20 \pm 14.8	973.00 \pm 30.8

¹Asparagine + aspartate. ²Glutamine + glutamate. Abbreviations: WRP, water recovered protein; GGRP, greasy greaves recovered proteins; N, nitrogen

2.3.2. True ileal digestibility of nitrogen and amino acids

True ileal digestibility (TID) of total N did not significantly differ between diets despite being numerically lower for GGRP than for WRP (81 and 84 %, respectively; Table 24). Similarly, the TID of individual AAs did not significantly differ between diets, except for Ala, Arg and Glu, for which the TID was significantly higher in WRP-fed pigs. Tryptophan and cysteine could not be analyzed in the digesta of WRP-fed pigs due to the very low content in the WRP-diet (Table 23).

Table 24: True ileal digestibility of N and amino acids (%) in growing pigs fed either WRP or GGRP diet. Data are mean values \pm SEM (WRP: n = 6; GGRP: n = 10).

	<i>True digestibility (%)</i>		
	WRP	GGRP	<i>Diet effect (p-value)</i>
Total N	84.2 \pm 3.19	81.2 \pm 2.20	NS
Essential Amino Acids			
Cys	bd	77.57 \pm 2.64	
His	87.82 \pm 2.64	82.58 \pm 1.59	NS
Ile	88.56 \pm 4.10	85.00 \pm 1.68	NS
Leu	89.47 \pm 3.33	85.76 \pm 1.40	NS
Lys	88.77 \pm 2.60	83.89 \pm 1.18	NS
Met	86.72 \pm 7.35	87.41 \pm 2.32	NS
Phe	90.72 \pm 3.12	87.23 \pm 1.56	NS
Tyr	82.68 \pm 5.58	83.13 \pm 1.58	NS
Thr	84.51 \pm 4.25	83.60 \pm 1.52	NS
Trp	bd	77.15 \pm 3.08	
Val	88.35 \pm 4.34	84.71 \pm 1.83	NS
Mean	87.51 \pm 4.15	83.46 \pm 1.85	
Non-essential Amino Acids			
Ala	91.92 \pm 2.53	83.68 \pm 1.65	*
Arg	96.07 \pm 1.24	92.07 \pm 0.71	*
Asp¹	66.44 \pm 7.44	62.59 \pm 3.19	NS
Glu²	89.92 \pm 2.64	81.77 \pm 1.73	*
Gly	91.13 \pm 3.01	83.63 \pm 3.18	NS
Pro	97.37 \pm 5.27	87.04 \pm 3.05	NS
HyPro	86.14 \pm 4.25	79.98 \pm 3.62	NS
Ser	87.99 \pm 3.77	83.27 \pm 1.57	NS
Mean	88.37 \pm 3.77	81.75 \pm 2.34	

¹Asparagine + aspartate. ²Glutamine + glutamate. Abbreviations: AA, Amino Acid; WRP, water recovered protein; GGRP, greasy greaves recovered protein; N, nitrogen; b.d., below detection limit. * : p < 0.05; NS : p > 0.05

2.3.3. Digestible indispensable amino acid ratio and score (DIAAR and DIAAS)

DIAAR has been calculated for each EAA of the WRP- and GGRP-diets, and for three target populations. The minimum values, *i.e.* the DIAAS, and the corresponding limiting EAA were then determined (Table 25). The limiting EAA was tryptophan for the WRP- and GGRP-diets and for all three target populations, associated with very low DIAAS values (12 %-18 %) for the WRP-diet. In contrast, the DIAAS value was significantly higher for the GGRP-diet, with values remaining low for

young children, undernourished or healthy (49 % and 57 %, respectively), but reaching 74 % for older children (> 3 years), adolescents and adults. It should be noted that WRP is rich in His, with a content being 7 to 54 % higher than that recommended for the three target populations, while on the contrary His was the second limiting AA in GGRP. GGRP is rich in AAAs (Phe + Tyr), Thr and Val, but to a limited extent with contents being only 3 to 9 % higher than the recommended value for the > 3 years-old children, adolescents and adults.

Table 25: Digestible indispensable amino acid ratio (DIAAR) and scores (DIAAS) of the WRP- and GGRP-diets for three different target populations. *The primary limiting amino acid is given in brackets. As the digestibility of Trp and Cys could not be determined in the WRP diet, the average AA digestibility of each pig (87.94 ± 3.25) was used to calculate the DIAARs for these two AAs.*

	WRP	GGRP
DIAAR - undernourished child (6 months to 5 years old)		
SAA (Cys + Met)	31	71
His	107	58
Ile	44	75
Leu	49	77
Lys	57	71
AAA (Phe + Tyr)	42	71
Thr	50	73
Trp	12	49
Val	53	89
DIAAS (%)	12 (Trp)	49 (Trp)
Quality	Low	Low
DIAAR - healthy child (6 months to 3 years old)		
SAA (Cys + Met)	35	81
His	123	67
Ile	47	80
Leu	52	81
Lys	65	81
AAA (Phe + Tyr)	50	86
Thr	59	87
Trp	14	57
Val	56	96
DIAAS (%)	14 (Trp)	57 (Trp)
Quality	Low	Low
DIAAR - older child, adolescent, adult		
SAA (Cys + Met)	41	96
His	154	84
Ile	50	85
Leu	56	88
Lys	78	97
AAA (Phe + Tyr)	64	109
Thr	74	108
Trp	18	74
Val	60	103
DIAAS (%)	18 (Trp)	74 (Trp)
Quality	Low	Good

Abbreviations: WRP, water recovered proteins; GGRP, greasy greaves recovered proteins; SAA, sulphur amino acids; AAA, aromatic amino acids.

2.3.4. Postprandial kinetics of plasma amino acids, urea and insulin

The evolution of plasma AAs concentrations during the 9-hour postprandial period is shown in Figure 36, 37 and 38. The postprandial concentration of total AAs in plasma significantly differed since the pre-prandial time (0 h), with higher concentrations for the GGRP-diet (Figure 36A). Plasma AAs concentrations peaked 3 h or 5 h after ingestion of the WRP-diet or of the GGRP-diet, respectively, with a significant diet and diet x time effect (Figure 36A). The concentrations of non-essential AAs in plasma (Figure 36B) followed the same patterns as total AAs, with a similar peak at 3 h or 5 h for the WRP- and GGRP-diets, respectively, but with a non-significant diet effect for the non-essential AAs. The concentration of EAAs in plasma (Figure 36C) peaked 5 h after feeding for the both diets, with a significant diet and diet x time effect. The postprandial concentration of EAAs in plasma significantly differed since the pre-prandial time (0 h), with higher concentrations for GGRP, difference which was maintained during the 9 hours (Figure 36C).

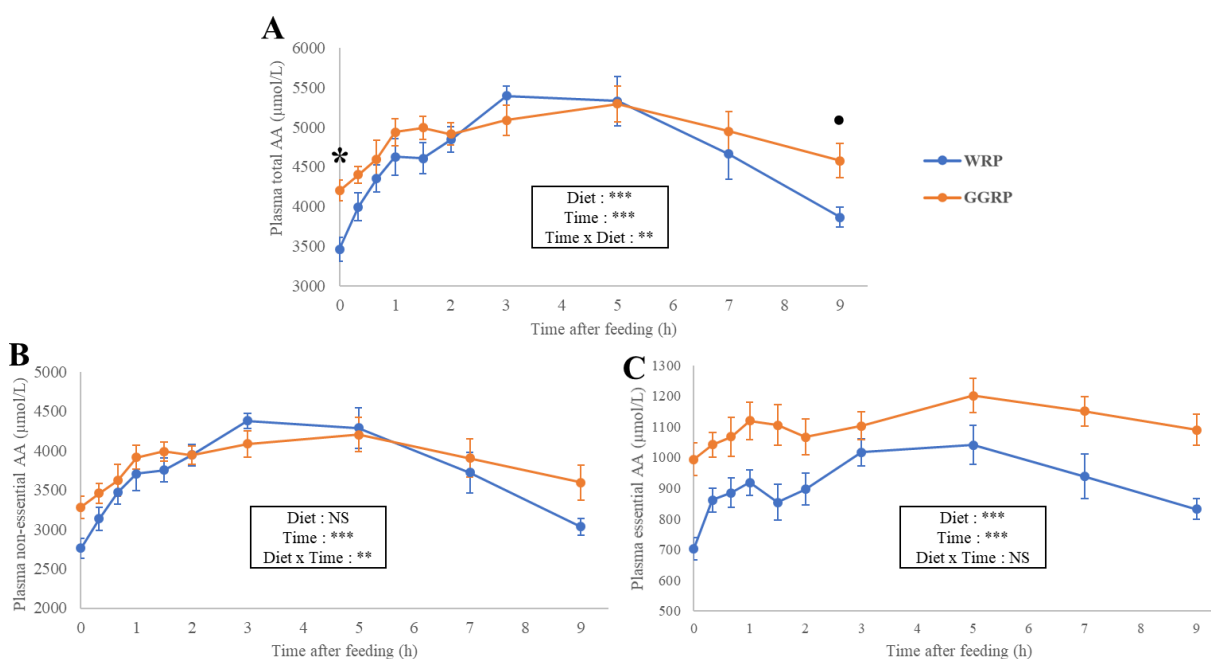


Figure 36: Total AA concentration (A), non-essential AA concentration (B) and essential AA concentration (C) in plasma of pigs fed experimental diets containing WRP (blue, n = 7) or GGRP (orange, n = 10) as the only dietary protein source. Means \pm SEM. Statistically significant factors were referenced with $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*) and $p > 0.05$ (NS) or $p < 0.1$ (*). Essential amino acids are the sum of His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val and conditionally EAA (Tyr, Cys). Non-essential amino acids are the sum of Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Pro, HyPro, and Ser.

The EAA concentration was mainly influenced by that of Val and Leu, which presented higher concentrations for the GGRP-diet (Figure 37). Others individual AAs, such as Ileu, Met, Phe, Tyr, and Gly, also had a significantly higher plasma concentration for the GGRP-diet (Figures 37 and 38). On the contrary, His, Pro, and HyPro presented lower plasma concentrations for the GGRP-diet along the entire postprandial period, while this was true for Ser only between 1 and 7 h after meal ingestion (Figure 37 and 38). A significant effect of the time x diet interaction was also observed for Tyr and Ser (Figure 37 and 38). GGRP was significantly higher 9 hours after meal ingestion for Tyr (Figure 38). Solely Lys,

Thr, Ala, Asp and Glu plasma concentrations did not present any significant difference between diets along the entire postprandial period.

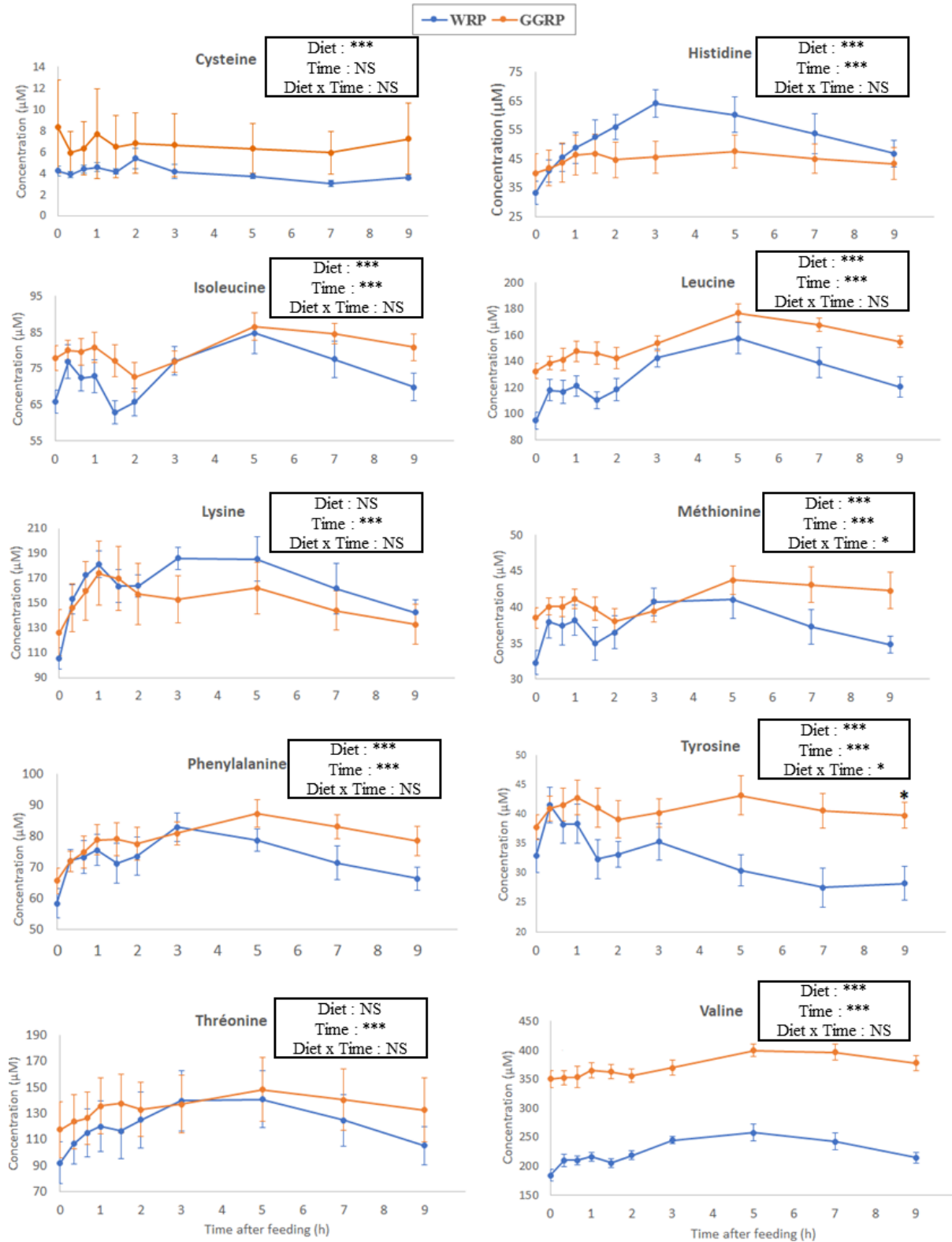


Figure 37: Essential amino acid (EAA) concentrations in plasma of pigs fed experimental diets containing WRP (blue, $n = 7$) or GGRP (orange, $n = 10$) as the only dietary protein source. Means \pm SEM. Statistically significant factors were referenced with $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*) and $p > 0.05$ (NS).

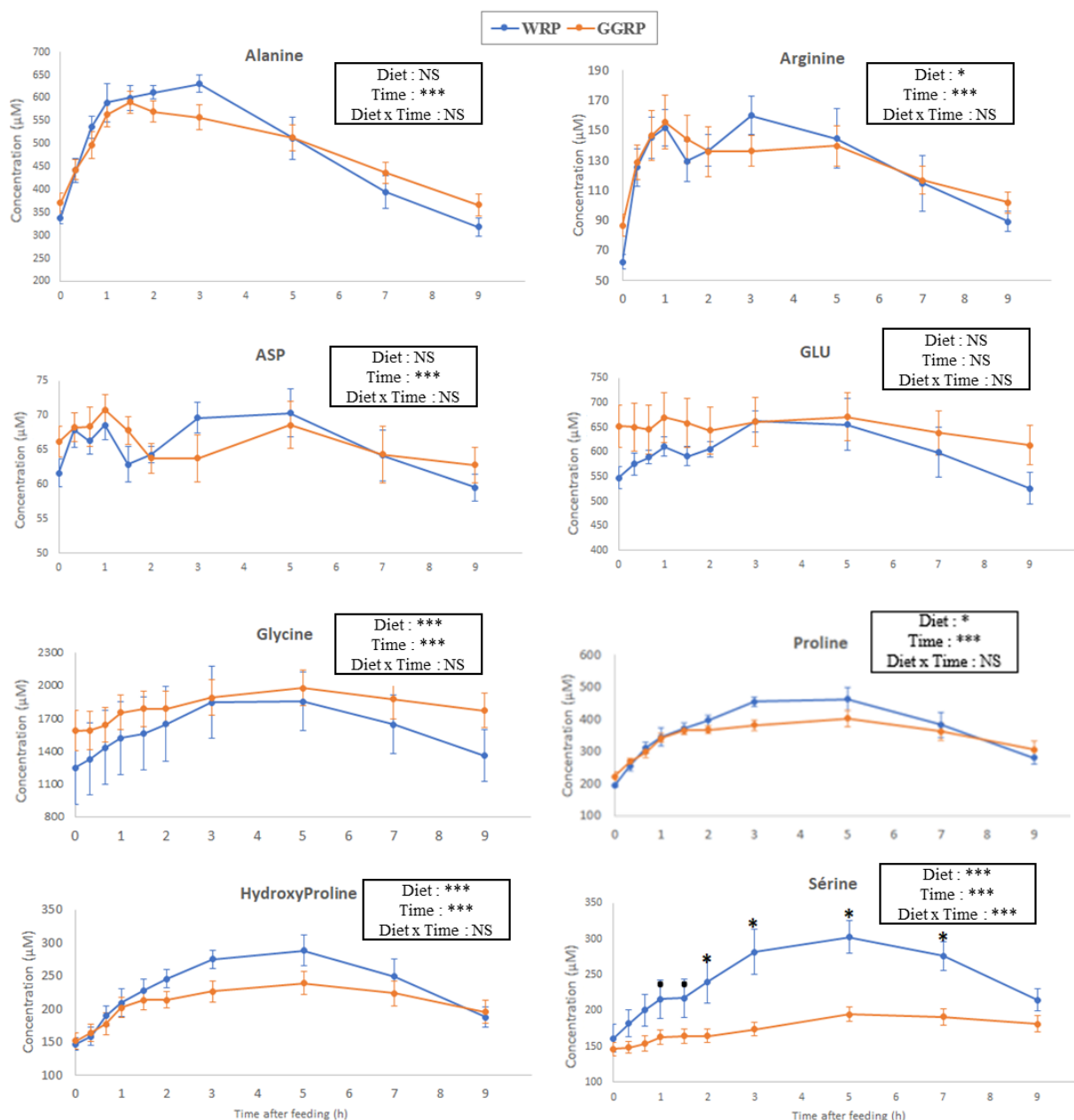


Figure 38: Non-essential amino acid concentrations in plasma of pigs fed experimental diets containing WRP (blue, $n = 7$) or GGRP (orange, $n = 10$) as the only dietary protein source. Means \pm SEM. Statistically significant factors were referenced with $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*) and $p > 0.05$ (NS). ASP = Asn + Asp ; GLU = Gln + Glu.

A significant effect of the diet was observed on plasma urea concentration, which was significantly lower in GGRP-fed pigs than in WRP-fed pigs throughout the entire postprandial period (Figure 39A). The maximum concentration of urea was observed 7 h after feeding the two diets.

The postprandial plasma concentration of insulin did not significantly differ between diets and was at its maximum 20 min after feeding (Figure 39B).

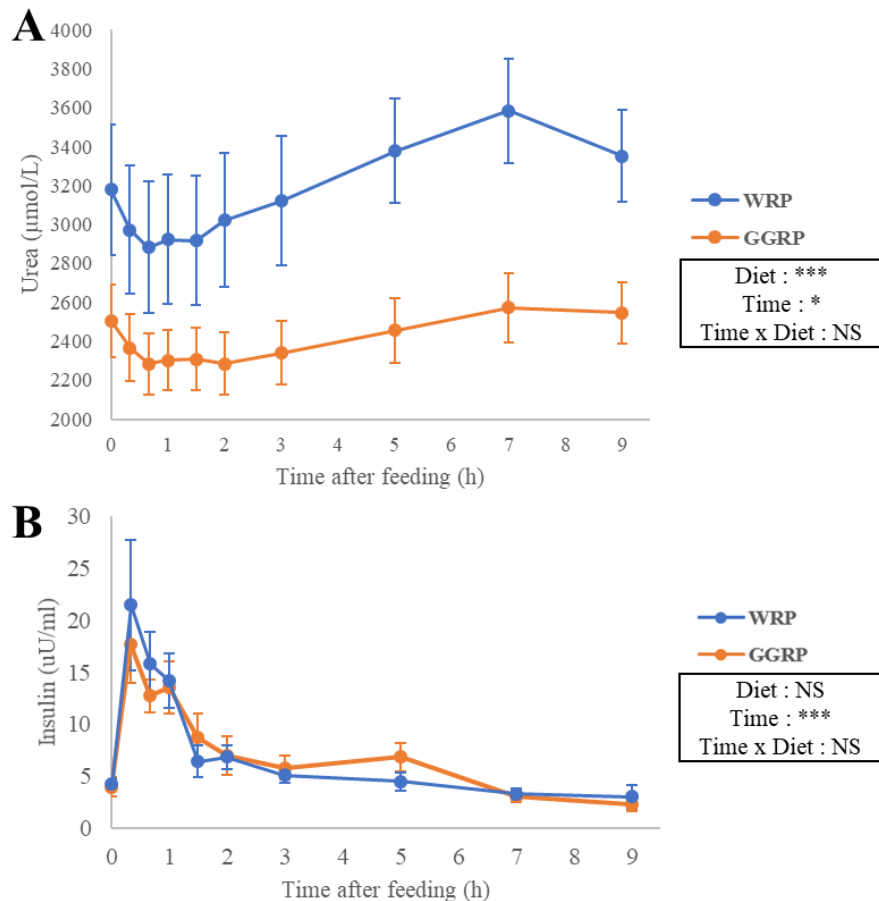


Figure 39: Postprandial urea (A) and insulin (B) concentration in plasma of pigs fed experimental diets containing WRP (blue, n = 7) or GGRP (orange, n = 10) as the only dietary protein source. Means \pm SEM. Statistically significant factors were referenced with $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*) and $p > 0.05$ (NS).

2.3.5. Structural change of the meals during *in vitro* digestion

The changes of the microstructure and viscosity of the WRP and GGRP meals during *in vitro* digestion are illustrated in Figure 40 and Table 26.

Confocal microscopy images show protein aggregation throughout digestion for both WRP and GGRP meals (Figures 40B and 40D). This is confirmed by the increase in mean diameter by a factor of 3 for WRP and 6 for GGRP after 120 min of digestion (Table 26). This reflects the increase in peak intensity of 1000 μm -diameter particles and the shift of the peak of smaller particles (around 80 μm) to higher values (around 100 μm). However, at all times during digestion, the median particle size ($d_{0.5}$) is lower in WRP digesta (from 66 to 202 μm) than in GGRP digesta (from 86 to 518 μm) (Table 26).

At the same time, the viscosity of both meals sharply decreased along the gastric digestion by an equivalent factor (around 34), from 1.31 to 0.04 Pa.s at 10s^{-1} for WRP meal, and from 35.79 to 1.03 Pa.s for GGRP meal. However, at all times during digestion, WRP was at least 25 times less viscous than GGRP (Table 26).

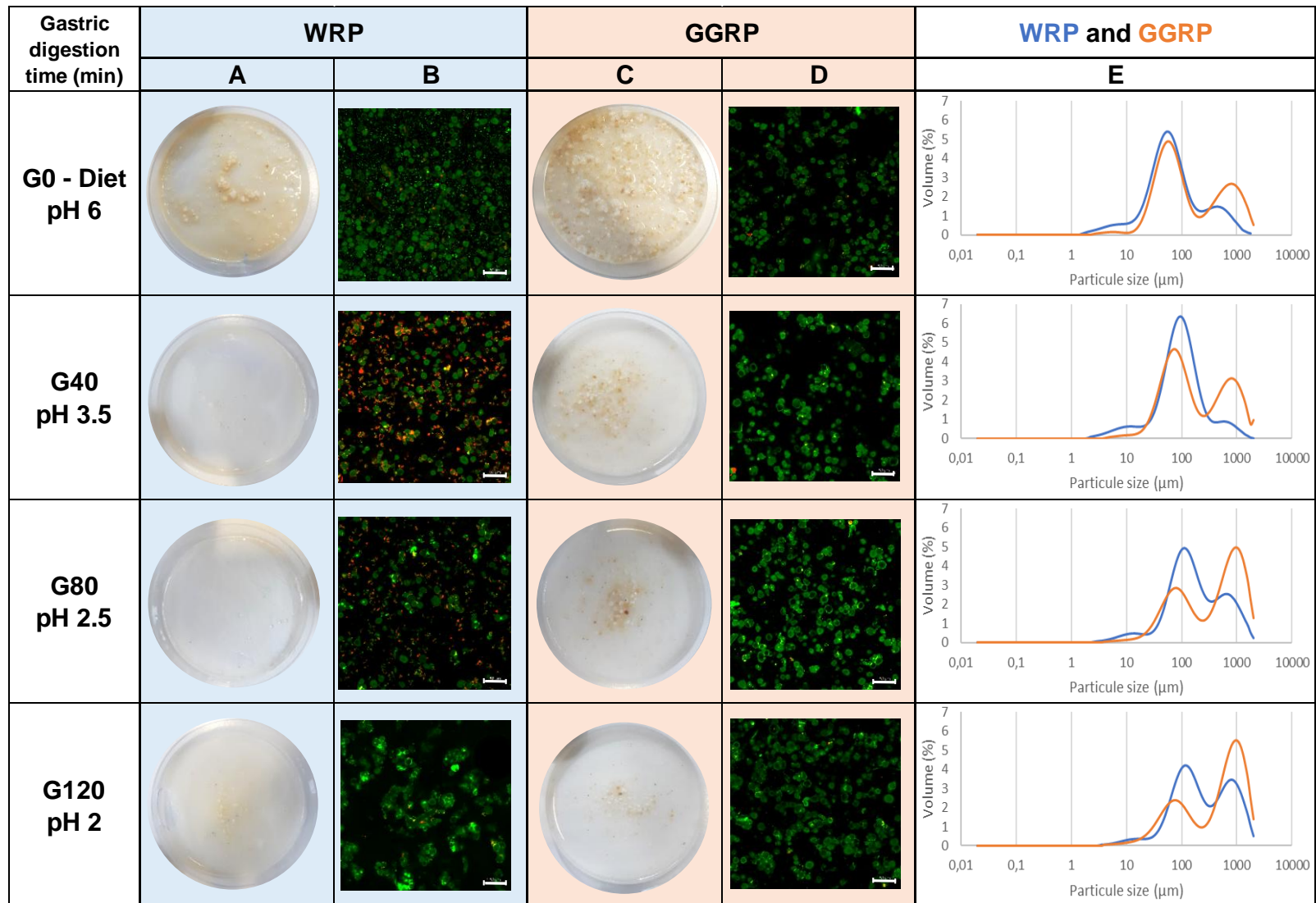


Figure 40: Structural change of the experimental meals (WRP, blue; GGRP, orange) during *in vitro* semi-dynamic digestion at 0, 40, 80 and 120 min of digestion. Visual observations (A-C); confocal laser scanning microscopy images (B-D); particle size distribution (E). (B-D) Proteins are colored in green and lipids in red.; scale bar: 50 μm . (B-D) Size distribution data are means \pm SEM (n = 2).

Table 26: Particule size and viscosity of the reconstituted diets and of the gastric digesta at 40, 80 and 120 min of digestion (G40, G80, G120). Data are given as mean \pm SEM (n = 2).

	WRP				GGRP				p-value
	Diet	G40	G80	G120	Diet	G40	G80	G120	
d(0.5) (μm)	66.07 ± 0.14	87.72 ± 0.37	142.68 ± 7.95	202.28 ± 46.50	85.64 ± 0.40	129.07 ± 12.87	433.04 ± 28.86	517.69 ± 9.68	Diet*** Digestion*** DietxDigestion***
d _{4,3} (μm)	154.98 ± 3.44	144.98 ± 13.42	294.54 ± 46.37	390.87 ± 96.55	311.34 ± 10.72	373.00 ± 8.44	540.09 ± 30.77	583.42 ± 6.18	Diet*** Digestion*** Diet x Digestion NS
Viscosity (Pa.s at 10 s ⁻¹)	1.31 ± 0.15	0.07 ± 0.04	0.15 ± 0.17	0.04 ± 0.01	35.79 ± 3.99	13.45 ± 5.76	4.82 ± 4.46	1.03 ± 1.15	Diet*** Digestion*** DietxDigestion***

2.4. Discussion

2.4.1. Diet composition

As previously reported (Le Foll et al., 2024), the difference in AA composition between the WRP and GGRP diets can be explained by the different origin of these ingredients (process and animal part). These compositions are close to bovine muscle hydrolysate for GGRP, and bovine collagen hydrolysate for WRP (Bindari et al., 2018). However, both ingredients are difficult to compare with other meat co-products described in literature, as the composition depends on each particular type of co-product and on the animal species from which they originate (Toldrá et al., 2016).

The greater rate of refusal observed for WRP meal may be due to the lower palatability of this ingredient. Its low content of Trp (0.02 %) could also be to blame, as it has been shown that a diet deficient in this AA induces a drop in appetite (Henry et al., 1992). However, such an effect was reported after 21 days on a deficient diet, whereas here each animal only consumed the WRP-based meal for 2.5 days only.

2.4.2. WRP and GGRP proteins are moderately digestible

Quantification of total AAs and total N in the pool of ileal digesta collected throughout the 9-hour postprandial period was used to calculate the protein digestibility of WRP and GGRP proteins, after correction for the endogenous N and AA flows determined after ingestion of a protein-free diet. Protein digestibility measured in this way, called standardized ileal digestibility (SID) in animal nutrition (Stein et al., 2007), corresponds to the true ileal digestibility (TID) in human nutrition, as reported by the FAO (2014).

The ileal endogenous N and AA flows measured (2.4 g/kg DMI and 11.5 g/kg, respectively; Table 27) were consistent with the literature data (Adeola et al., 2016). TID of N did not significantly differ between diets, due to a high variability of the data, particularly for WRP. The values of TID were 84.2 % for WRP, and 81.2 % for GGRP (Table 24), which corresponds to a moderate digestibility, lower than the TID value reported for bovine meat proteins (> 90 %) (Silvester & Cummings, 1995 ; Oberli et al., 2015). This is likely due to the high collagen content of both ingredients (Le Foll et al., 2024), given

that connective tissue proteins are known to be more resistant to enzymatic proteolysis (Laser-Reuterswärd et al., 1982). As a matter of fact, TID values of measured for GGRP and WRP were similar to those reported for beef muscle hydrolysate and collagen, *i.e.* 84 % and 79 %, respectively (Bindari et al., 2018). Such values are however higher than many unpurified plant products such as maize (70-76 % TID), barley (74 % TID), sorghum (66 % TID), and even beans (41-72 % TID) (Cervantes-Pahm et al., 2014 ; Han et al., 2020).

Table 27: Endogenous flows of total N and individual amino acids at the ileum from pigs (n = 10) that were fed a protein-free diet. Data are means \pm SEM.

Endogenous flow	
(g/kg DM)	
Total N	0.24 \pm 0.02
Essential Amino Acids	
Cys	0.27 \pm 0.02
His	0.20 \pm 0.01
Ile	0.42 \pm 0.03
Leu	0.71 \pm 0.05
Lys	0.50 \pm 0.04
Met	0.23 \pm 0.02
Phe	0.42 \pm 0.03
Tyr	0.27 \pm 0.03
Thr	0.73 \pm 0.05
Trp	0.20 \pm 0.02
Val	0.58 \pm 0.04
Non-essential Amino Acids	
Ala	0.60 \pm 0.05
Arg	0.45 \pm 0.05
Asp¹	0.97 \pm 0.06
Glu²	1.24 \pm 0.09
Gly	1.34 \pm 0.19
Pro	1.89 \pm 0.71
HyPro	0.00 \pm 0.00
Ser	0.57 \pm 0.04
Total Amino Acid	11.55 \pm 0.10

Abbreviations: N, nitrogen. ¹Asparagine + aspartate. ²Glutamine + glutamate.

In the present study, WRP and GGRP ingredients were included in meals as is, with no further process. Processing, in particular cooking, could modify protein digestibility, but in directions that can be opposite depending on the process parameters and/or protein nature. For example, cooking beef at high temperatures for a long time can moderately reduce protein digestibility, compared to cooking at a lower temperature for a short time (Oberli et al., 2015). Moreover, it has been demonstrated that heating collagen to 70 °C for 0.5 h induces conformational changes in proteins, modulating its affinity for pepsin and resulting in higher digestibility (Zhang et al., 2020). Given the data available at the present time, it is therefore not possible to predict whether the TID of WRP and GGRP would be increased or decreased after cooking. As has been done for other food ingredients (Hodgkinson et al., 2018 ; Oberli et al., 2015),

further work is needed to estimate the effects of processing on the nutritional quality of WRP and GGRP proteins, and devise possible technological strategies to improve it.

2.4.3. *The DIAAS measurement classifies GGRP as a good quality protein but solely for the adult population*

DIAAS of both WRP and GGRP ingredients was much below 75 for young children (undernourished or healthy), meaning that these protein sources are considered of low quality for these populations (FAO, 2013). The low DIAAS values of WRP and GGRP result from a too low content of EAAs, and especially of tryptophan that is the limiting AA, making both ingredients unbalanced proteins for young children. This results from the high collagen content, particularly for WRP, as collagen does not contain any tryptophan, leading even to a zero DIAAS value for a beef collagen hydrolysate (Bindari et al., 2018). GGRP had a higher DIAAS value (49 or 57 for undernourished and healthy children, respectively), consistently with an EAA composition closer to that of a beef meat hydrolysate, for which a DIAAS of 63 has been reported (Bindari et al., 2018). Combining GGRP with protein foods rich in tryptophan and histidine, *i.e.* the only two EAAs for which the DIAAR value of GGRP is below 80 for healthy young children, would allow to obtain a protein mix of quality for this population.

For older children (> 3-year-old), adolescents and adults, the DIAAS value of WRP remains very low (18, with tryptophan as the limiting EAA), unlike GGRP, whose DIAAS value (74) is close to the threshold of 75, level at which a protein can be classified of good quality. This value indicates that the protein intake of GGRP needs to be 1.35 times higher than that of an “ideal” protein (DIAAS = 1) to meet requirements. For this population, the limiting AA is also tryptophan, but it can be underlined that for AAA, Thr and Val, the DIAAR values are above 100. These results are consistent with the DIAAS value calculated for a beef muscle hydrolysate, for which AA composition is close to GGRP, and for which a DIAAS of 81 has been previously reported for the same target population, with tryptophan as the limiting AA (Bindari et al., 2018). As a reminder, DIAAS values ranging from 80 to 99 have been determined for bovine meat, depending on the cooking processes (Hodgkinson et al., 2018).

Overall, the present results indicate that GGRP is a good protein quality for older children, adolescents and adults, while this is not the case for WRP. Nevertheless, the latter ingredient can be interesting for His supplementation, with a content 1.5 times higher than the recommendation for the older children, adolescents and adults.

The strategy of judiciously combining protein ingredients to compensate for the limitation or lack of certain EAAs and reach DIAAS values > 75, as suggested by Bindari et al. (2018), may be relevant for the GGRP ingredient, whose EAA composition is not so far from the nutritional requirements. Such a strategy has been successfully implemented in a previous study by combining plant and animal proteins to achieve AA profiles adapted to the EAA needs of different target populations (Dimina et al., 2022). GGRP ingredient could contribute to the protein fortification of some plant foods that can be lacking of EAAs such as lysine for cereals and SAA for legumes (Day et al., 2022). This can also be of interest for

plant-based staple foods of low protein quality in developing countries, such as suggested by de Vries-ten Have et al. (2020).

It should be noted that some debate exists regarding the way of calculating the DIAAS, particularly regarding the way of calculating the AA profile (mg/g of proteins), *i.e.* either based on the crude protein content ($N \times 6.25$), as recommended by the FAO, or based on the total mass of AA residues (Tessier et al., 2021). Using the latter methodology, the DIAAS values were somewhat higher, particularly for GGRP that achieves a DIAAS of 82 instead of 74 for the population of older children (> 3 years), adolescents and adults (Table 28), in line with the N to collagen protein conversion factor of 5.55 (Mariotti et al., 2008).

2.4.4. *The Plasma AA concentrations were affected by the EAA profile of the protein ingredients and by the microstructure of the meal*

Plasma AAs reached a maximum concentration at 3 h and 5 h after ingestion of the WRP and GGRP diets, respectively (Figure 36), allowing to define both ingredients as slow protein sources according to Boirie et al. (1997). This is consistent with a previous study in humans that reported a peak for plasma concentration of AAs 3 h after eating bovine meat proteins (Oberli et al., 2015). The slow AA release in the present study is likely due to the high collagen content of both GGRP and WRP, responsible for protein gelation leading to a high meal viscosity, thus slowing down the gastric emptying rate and subsequently the rates of intestinal digestion and absorption (Jin et al., 2022). This was particularly true for GGRP meal, which had the highest viscosity throughout the *in vitro* digestion, in line with the slowest plasma AA appearance. In addition, the higher proportion of very large particles in GGRP digesta compared with WRP could also contribute to the slower digestion of GGRP. Indeed, these particles are presumably more difficult to digest.

A significantly higher level of plasma EAA concentration was observed along the entire plasma kinetics for GGRP-diet compared with WRP-diet (Figure 36C), including at the pre-prandial time. This suggests, during the habituation period, a metabolic adaptation of the pig to the experimental diets, which contained a higher level of EAAs in GGRP than in WRP diets, particularly for Leu and Val.

The plasma concentration of hydroxyproline was significantly higher with WRP than with GGRP meals. Hydroxyproline is solely present in foods containing collagen, as it is the case for WRP and GGRP. It has been demonstrated that the increase in the plasma concentration of hydroxyproline can promote the synthesis of collagen by the fibroblasts (Asai et al., 2019). Thus, the ingestion of the two ingredients, and particularly WRP, could contribute to the stimulation of connective tissue synthesis especially important in the skin and the joints (Asai et al., 2019; Holwerda & van Loon, 2022).

Table 28: Digestible Indispensable Amino Acid Scores (DIAAS) for WRP and GGRP. Amino acid profile presented in the FAO report published in 2013 and 2018a used as protein reference pattern. The content of AA expressed in mass AA residue profile.

	WRP	GGRP
DIAAR - undernourished child (6 months to 5 years old)		
SAA (Cys + Met)	33	74
His	118	63
Ile	48	79
Leu	53	81
Lys	63	76
AAA (Phe + Tyr)	46	77
Thr	53	75
Trp	13	54
Val	56	92
DIAAS (%)	13 (Trp)	54 (Trp)
Quality	Low	Low
DIAAR - child (6 months to 3 years old)		
SAA (Cys + Met)	38	84
His	136	72
Ile	51	84
Leu	56	85
Lys	72	87
AAA (Phe + Tyr)	55	93
Thr	63	90
Trp	16	64
Val	59	98
DIAAS (%)	16 (Trp)	64 (Trp)
Quality	Low	Low
DIAAR - older child, adolescent, adult		
SAA (Cys + Met)	45	99
His	170	90
Ile	54	90
Leu	61	92
Lys	85	103
AAA (Phe + Tyr)	70	118
Thr	78	111
Trp	20	82
Val	64	106
DIAAS (%)	20.08 (Trp)	82 (Trp)
Quality	Low	Good

First limiting amino acid is given in brackets. Abbreviations: WRP, water recovered proteins; GGRP, greasy greaves recovered proteins; SAA, sulphur amino acids; AAA, aromatic amino acids.

The plasma urea concentration was significantly higher in WRP-fed pigs than in GGRP-ones, even though the values remained in accordance with previous experiments conducted in growing pigs (Eugenio et al., 2023). The difference of plasma urea observed here, which is an indicator of the level of hepatic AA catabolism (Brown & Cline, 1974) and of EAA deficiencies (Marín-García et al., 2022 ; Kampman-van de Hoek et al., 2016), was in line with the greatest imbalance of WRP in terms of EAA profile, compared with GGRP. Pigs fed WRP were thus in a more catabolic state than pigs fed GGRP, thus underlining that WRP cannot be solely fed to humans but needs to be completed with an adequate protein source.

Insulin, the main anabolic hormone stimulating postprandial AA utilization for protein synthesis, notably in muscle (Davis et al., 1998), was similar between diets, suggesting a similar anabolic stimulation for protein accretion following ingestion of both meals in pigs. The present plasma concentrations of insulin were in accordance with previous experimental data collected in growing pigs (Eugenio et al., 2023).

En résumé

- Le WRP et le GGRP sont modérément digestibles (TID de 84 et 81 %) et considérés comme des sources protéiques lentes.
- GGRP a une qualité nutritionnelle adaptée pour répondre aux besoins des enfants (> 3ans), des adolescents et des adultes.
- Le WRP doit être complété par d'autres sources de protéines riches en AAE pour répondre aux exigences nutritionnelles de toutes les catégories de population.

3. Optimisation de la qualité nutritionnelle des ingrédients WRP et GGRP à destination de populations malnutries ou à risque de malnutrition

3.1. Matériels et Méthodes

La qualité nutritionnelle des protéines a été évaluée via le calcul du DIAAS (Equation 28) au regard des besoins en AAES (mg/g de protéines) de trois populations d'intérêt (enfants > 3ans, adolescents, adultes; enfants en bonne santé < 3ans ; enfants malnutris 0.5-5ans ; FAO, 2013 ; FAO, 2018a).

$$\text{DIAAS (\%)} = \text{Min} \frac{\text{Concentration de l'AAE}_i \text{ dans l'ingrédient (mg/g de protéine)} \times \text{Digestibilité iléale de l'AAE}_i \text{ (\%)}}{\text{Concentration de l'AAE}_i \text{ dans le profil de référence (mg/g de protéine)}}$$

[Eq. 28]

La complémentation des ingrédients WRP et GGRP à l'aide de farines végétales a été envisagée et son efficacité évaluée de manière théorique au travers du calcul des DIAAS résultant. Une base de données a été construite pour 21 farines végétales à partir des données de l'USDA Data Food Central, de la FAO, des tables Ciqual et autres articles scientifiques. Elle renseigne sur les teneurs en AAES et leur digestibilité (*donnée supplémentaire*, Tableau S1).

L'optimisation nutritionnelle des mélanges protéiques associant WRP et/ou GGRP avec une farine végétale a été réalisée par itération à l'aide d'Excel. L'objectif était de maximiser la qualité nutritionnelle du mélange avec les contraintes suivantes : (1) au moins 70 % de protéines d'origine animale (WRP ou GGRP) ; (2) maximum trois ingrédients ; (3) le DIAAS du mélange devait être supérieur à 75 %. La formule utilisée pour calculer le DIAAR d'un AAES dans un mélange comportant n ingrédients était la suivante (Equation 29) :

$$\text{DIAAR}_i = \frac{\sum_{t=1}^n \text{Dig}(i)_t \times [\text{AAE}_i]_t}{[\text{AAE}_i \text{ profil de référence}]} \quad [\text{Eq. 29}]$$

avec $\text{Dig}(i)_t$, la digestibilité de l'AAE i dans l'ingrédient t ; $[\text{AAE}_i]_t$, la concentration en l'AAE i dans l'ingrédient t et $[\text{AAE}_i \text{ profil de référence}]$, la concentration en l'AAE i dans le profil de référence de la FAO (2013).

3.2. Résultats et Discussion

Comme montré précédemment (Chapitre 5, §1.5.3), l'ingrédient GGRP a une composition et une digestibilité permettant presque de couvrir les besoins en AAES de la population « enfants > 3ans, adolescents, adultes ». Le relatif équilibre entre tous les AAES au sein de cet ingrédient permet d'envisager de compenser sa qualité nutritionnelle, décrite comme « moyenne » selon les critères de la FAO, par une simple augmentation de la quantité consommée. Ainsi, sachant que le DIAAS de GGRP est de 74 (DIAAR du Trp, AA limitant), il suffit de consommer 135 g de protéines GGRP pour avoir un apport en Trp similaire à celui de 100 g d'une protéine idéale (DIAAS = 100). En revanche, pour les populations d'enfants, l'augmentation qu'il faudrait appliquer semble trop importante pour être envisageable : 170 g de protéines GGRP pour 100 g d'une protéine idéale pour la population en bonne santé de moins de 3 ans, et 200 g pour la population des enfants malnutris de moins de 5 ans.

De même, cette stratégie n'est pas envisageable pour le WRP, dont le DIAAS est au maximum de 18 (pour la population « enfants > 3ans, adolescents, adultes »).

Ainsi, la complémentation des ingrédients GGRP et/ou WRP par différentes protéines végétales semble une autre stratégie envisageable, voire nécessaire pour obtenir des profils en AAEs adaptés à certaines populations spécifiques.

3.2.1. Cas des enfants malnutris de moins de 5 ans

La qualité nutritionnelle de différentes sources de protéines végétales, ne montre qu'aucune des farines de légumineuses et de céréales retenues dans notre étude ne permet de couvrir l'ensemble des besoins en AAEs des enfants malnutris (Tableau 29). Les céréales et le lupin sont déficitaires en lysine (DIAAS entre 6 % et 70 %) et les autres légumineuses sont déficitaires en tryptophane et en AA soufrés ou aromatiques (DIAAS entre 32 % et 60 %). Les farines de soja et de lupin possèdent les DIAAS les plus élevés (72 et 70 %, respectivement), avec des DIAAR > 100 pour l'histidine, l'isoleucine, la leucine, le tryptophane et les AAA dans le cas du soja, et pour l'isoleucine, la leucine, la thréonine et les AAA dans le cas de la farine de lupin.

Tableau 29: Qualité nutritionnelle des farines de légumineuses et céréales rapportée aux besoins en AAe des enfants malnutris 6 mois à 5 ans (FAO, 2018a). DIAAR : Digestible indispensable amino acid ratio ; SAA : AA soufré (Cys + Met) ; AAA : AA aromatique (Phe + Tyr). En gras les AA limitants de chaque source végétale.

	DIAAR (%) - Enfant malnutri 6 mois à 5 ans								
	His	Ileu	leu	Lys	Thr	Trp	Val	SAA	AAA
WRP	103	44	49	57	51	12	53	30	41
GGRP	56	75	77	71	75	49	89	70	71
Haricot rouge	63	75	74	64	62	58	64	32	56
Haricot mungo	65	69	68	61	48	55	59	45	71
Haricot adzuki	73	54	79	49	43	46	48	32	43
Fève	98	97	136	82	79	60	77	66	68
Pois	64	66	67	62	53	49	52	57	45
Pois chiche	61	65	91	55	50	59	48	76	47
Lentilles	79	85	71	73	64	51	72	43	81
Lupin	97	123	105	70	101	87	73	87	146
Soja	105	122	99	90	92	139	96	72	123
Blé	75	87	81	27	57	98	72	98	91
Riz	70	90	84	45	65	97	95	92	121
Sarrasin	87	97	80	68	91	126	97	81	82
Orge	77	87	80	44	73	133	85	108	112
Seigle	47	47	57	22	55	84	48	31	60
Sorgho	85	87	119	46	76	53	92	89	83
Avoine	90	99	93	57	74	62	100	120	102
Millet Proso	181	238	408	20	141	173	213	152	327
Millet Foxtail	115	153	259	21	127	180	141	273	200
Millet Adlay	245	382	698	61	239	225	380	163	479
Maïs	59	66	178	18	58	-	60	98	106
Triticale	15	16	15	6	12	17	15	18	19

Ainsi, de par les faibles valeurs de DIAAR des protéines végétales considérées ici, il n'a pas été possible d'identifier des combinaisons permettant de couvrir les besoins en AAAs des enfants malnutris de moins de 5 ans, en associant les protéines de WRP et/ou GGRP avec une des farines végétales recensées, et avec la contrainte fixée d'au moins 70 % de protéines d'origine animale (WRP ou GGRP).

Élargir la base de données à d'autres sources de protéines pourrait être envisagé afin de compléter le profil en AAAs du WRP et GGRP pour couvrir les besoins des enfants malnutris. Il pourrait également être envisagé d'incorporer le WRP ou GGRP dans des aliments thérapeutiques prêts à l'emploi (RUTF) ou complémentaires (RUSF) pour le traitement de la malnutrition aiguë (ou modérée). En effet, cette stratégie permettrait une optimisation innovante des RUTF/RUSF, comme cela a déjà été proposé avec d'autres sources protéiques (Brixi, 2018 ; Potani et al., 2021), et avec l'avantage des propriétés techno-fonctionnelles de WRP et GGRP (gélifiant, stabilisant, émulsifiant) (Le Foll et al., 2024). De plus, des formules RUTF/RUSF alternatives, éprouvées et rentables ont été développées pour faciliter les choix et la production locale, au plus près des populations cibles et permettre ainsi d'améliorer les efforts de traitement de la malnutrition. Or, les ingrédients déshydratés que sont le GGRP et le WRP semblent pouvoir répondre aux contraintes de telles productions (facilité et faible coût de transport et de stockage). Enfin, il pourrait être envisagé de compléter des farines végétales avec le GGRP en visant le ratio inverse de 30:70 (protéines animales:protéines végétales). En effet, plusieurs mélanges associant GGRP (apportant 20 à 30 % des protéines du mélange) avec deux sources protéiques d'origine végétale, et répondant aux critères d'optimisation pour l'alimentation des enfants malnutris, ont pu être identifiés (Tableau 30). Ces mélanges présentent une bonne qualité nutritionnelle, au regard des critères de la FAO (2018a), les DIAAS étant presque tous de 75 %. Ces mélanges sont cohérents avec les optimisations protéiques suggérées dans la littérature et associant le soja et le sorgho avec du maïs ou de l'orge pour les enfants malnutris (Brixi, 2018 ; Bahwere et al., 2017). Il pourrait donc être envisageable d'en substituer une partie par l'ingrédient GGRP, avec comme avantage d'apporter des arômes viandés et des propriétés techno-fonctionnelles (gélifiant, stabilisant d'émulsion) (Le Foll et al., 2024) permettant de structurer la matrice.

Tableau 30: Mélanges protéiques sélectionnés à l'issue du processus d'optimisation en réponse aux besoins en AAAs des enfants malnutris de moins de 5 ans

Ingrédients	Quantité d'ingrédient (g/100g de mélange)	DIAAS
GGRP-Soja-Orge	20-55-25	75 % (Lys)
GGRP-Soja-Sorgho	20-55-25	75 % (Lys)
GGRP-Soja-Maïs	30-55-15	74 % (Lys)
GGRP-Soja-Lupin	20-55-25	75 % (SAA)

3.2.2. Cas des séniors

Vis-à-vis des besoins des séniors, pour la majorité des farines de légumineuses et de céréales, les AAEs limitants sont les mêmes que pour les enfants malnutris (Lys, SAA), mais avec des DIAAS plus élevés (jusqu'à 98 % pour le soja) (Tableau 31). Plusieurs farines végétales, affichant un DIAAS supérieur à 75 %, peuvent ainsi être qualifiées de « protéines de bonne qualité nutritionnelle » pour les adultes, incluant les séniors. Il s'agit des farines de fève, lupin, soja, sarrasin, avoine et millet Adlay.

Tableau 31: Qualité nutritionnelle de farines de légumineuses et céréales rapportée aux besoins en AAEs des séniors (FAO, 2013). DIAAR : Digestible indispensable amino acid ratio ; SAA : AA soufrés (Cys + Met) ; AAA : AA aromatiques (Phe + Tyr). En gras les AAs limitants de chaque source végétale.

	DIAAR (%) - Sénior (profil enfants > 3ans, adolescents, adultes)								
	His	Ileu	leu	Lys	Thr	Trp	Val	SAA	AAA
WRP	154	50	56	78	74	18	61	41	63
GGRP	84	86	88	97	108	74	103	94	109
Haricot rouge	94	85	85	87	89	87	74	43	85
Haricot mungo	97	78	78	82	69	83	68	61	109
Haricot adzuki	109	61	91	67	62	69	55	43	66
Fève	147	110	156	111	114	91	89	89	104
Pois	95	75	77	84	76	74	60	77	69
Pois chiche	91	74	104	74	72	90	56	102	73
Lentilles	119	96	82	99	92	78	83	58	125
Lupin	146	139	120	95	146	132	84	117	225
Soja	157	138	114	122	133	211	110	98	190
Blé	113	99	93	37	82	149	83	133	140
Riz	106	101	97	61	94	148	110	124	185
Sarrasin	131	110	92	92	132	190	112	109	127
Orge	115	99	91	59	104	202	98	146	172
Seigle	70	53	66	30	79	128	55	41	93
Sorgho	128	99	136	62	109	80	106	120	127
Avoine	135	112	107	77	107	95	115	162	156
Millet Proso	271	270	469	27	203	261	245	205	503
Millet Foxtail	172	174	297	28	183	273	163	368	307
Millet Adlay	367	433	802	82	344	340	436	219	736
Maïs	89	75	204	24	84	-	69	132	163
Triticale	22	18	17	8	17	26	17	24	29

Plusieurs mélanges protéiques associant WRP, GGRP et une source d'origine végétale, et respectant l'objectif d'un ratio protéine animale:protéine végétale de 70:30, ont pu être identifiés pour répondre aux critères d'optimisation destinés à enrichir l'alimentation des « Seniors » (Tableau 32). Ces mélanges présentent une bonne qualité nutritionnelle au regard des critères de la FAO, les DIAAS étant tous supérieurs à 80 %, voire 90 %. Deux mélanges sont particulièrement intéressants en raison de leurs DIAAS (> 85) et de leurs fortes densités protéiques (> 0,6 g de protéine / g de mélange) : **GGRP-WRP-Soja**, et **GGRP-WRP-Adlay**. Ainsi, leur densité protéique est presque deux fois supérieure à celle des autres mélanges (à l'exception du mélange à base de GGRP-WRP-Lupin). Ces différentes solutions ouvrent donc des pistes potentielles pour la formulation de mélanges adaptés aux séniors. La prise en

considération de paramètres supplémentaires comme le prix et l'impact environnemental des ingrédients pourrait permettre de privilégier certains mélanges plutôt que d'autres.

Tableau 32: Mélange protéique sélectionné lors du processus d'optimisation adapté au besoin en AAE des sénior

Ingrédients	Quantité d'ingrédient (g/100g de mélange)	g protéine/g mélange	DIAAS
GGRP-WRP-Lupin	40-13-47	0,61	83 (Trp)
GGRP-WRP-Soja	45-15-40	0,69	87 (SAA)
GGRP-WRP-Blé	34-10-57	0,43	81 (Trp)
GGRP-WRP-Riz	28-8-64	0,38	84 (Leu)
GGRP-WRP-Sarrasin	20-7-73	0,30	84 (Trp)
GGRP-WRP-Orge	22-7-71	0,30	83 (Ile)
GGRP-WRP-Adlay	55-13-32	0,61	92 (Trp)

3.3. Données supplémentaires

Tableau S1: Base de données des farines végétales retenues pour l'étude d'optimisation nutritionnelle

	Concentration protéique (g/100g d'ingrédient)	Profil en Acide Aminés Essentiels (en g/g de protéines)									Digestibilité Acide Aminés Essentiels (%) **									Sources
		His	Ileu	leu	Lys	Thr	Trp	Val	SAA	AAA	His	Ileu	leu	Lys	Thr	Trp	Val	SAA	AAA	
enfant malnutri 6 mois à 5ans		0,24	0,34	0,7	0,65	0,36	0,1	0,46	0,31	0,63										FAO, 2018
jeunes enfants < 3 ans		0,2	0,32	0,66	0,57	0,31	0,09	0,43	0,27	0,52										FAO, 2013
enfants >3ans, adolescents, adultes		0,16	0,3	0,61	0,48	0,25	0,07	0,4	0,23	0,41										FAO, 2013
WRP	83,7	0,28	0,17	0,38	0,42	0,22	0,01	0,27	0,11	0,30	87,8	88,6	89,5	88,8	84,5	88,5	88,4	87,6	86,7	
GGRP	68,1	0,16	0,30	0,63	0,55	0,32	0,06	0,49	0,26	0,52	82,6	85,0	85,8	83,9	83,6	77,2	84,7	82,5	85,2	
Haricot rouge	27,8	0,27	0,32	0,58	0,50	0,30	0,07	0,37	0,23	0,59	56,50	79,90	88,70	83,60	74,60	77,90	79,90	43,70	59,10	Nosworthy et al., 2017 ; Han et al., 2020
Haricot mungo	27,0	0,23	0,28	0,52	0,46	0,22	0,07	0,33	0,26	0,55	68,10	83,00	90,60	86,10	76,90	82,20	82,80	53,00	81,90	Nosworthy et al., 2017 ; Han et al., 2020
Haricot adzuki	26,2	0,20	0,21	0,59	0,36	0,18	0,06	0,25	0,19	0,32	88,90	88,60	93,90	89,90	86,60	77,00	89,20	52,90	85,10	Nosworthy et al., 2017 ; Han et al., 2020
Fève	31,9	0,28	0,36	0,99	0,58	0,32	0,07	0,39	0,30	0,48	84,90	92,00	95,50	92,90	89,20	83,50	91,10	67,80	88,50	Nosworthy et al., 2017 ; Han et al., 2020
Pois	26,2	0,20	0,25	0,50	0,44	0,23	0,06	0,28	0,24	0,34	75,20	88,40	93,00	91,00	83,10	87,20	87,10	75,20	82,80	Nosworthy et al., 2017 ; Han et al., 2020
Pois chiche	28,0	0,20	0,26	0,70	0,41	0,23	0,07	0,27	0,31	0,39	72,60	84,80	90,30	87,60	79,40	86,90	83,40	76,90	75,70	Nosworthy et al., 2017 ; Han et al., 2020
Lentilles	25,9	0,20	0,30	0,51	0,49	0,25	0,06	0,35	0,15	0,53	96,00	95,00	98,00	97,00	91,00	82,00	95,00	88,00	96,00	USDA Food Data Central ; Gilani et al., 2011
Lupin	39,0	0,26	0,46	0,81	0,51	0,41	0,10	0,37	0,30	1,02	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	Mariotti et al., 2002 ; Gilani et al., 2011
Soja	52,3	0,27	0,45	0,77	0,63	0,38	0,15	0,48	0,28	0,85	92,00	92,00	91,00	93,00	87,00	92,00	91,00	81,00	92,00	Mathai et al., 2017
Blé	15,3	0,20	0,33	0,62	0,21	0,24	0,11	0,38	0,35	0,65	91,00	90,00	91,00	87,00	86,00	89,00	88,00	86,00	89,00	Cervantes-Pahm et al., 2014
Riz	14,7	0,21	0,39	0,77	0,32	0,34	0,12	0,53	0,49	1,01	82,46	78,87	76,39	92,48	69,24	81,86	82,02	58,69	75,31	Cervantes-Pahm et al., 2014
Sarrasin	12,6	0,23	0,38	0,63	0,51	0,38	0,15	0,51	0,30	0,58	89,66	88,00	89,03	87,15	85,95	86,50	87,25	82,82	90,16	Cervantes-Pahm et al., 2014
Orge	10,5	0,22	0,36	0,68	0,37	0,34	0,17	0,49	0,41	0,85	82,00	81,00	82,00	76,00	77,00	80,00	80,00	81,00	83,00	Cervantes-Pahm et al., 2014
Seigle	15,9	0,15	0,22	0,54	0,21	0,31	0,11	0,31	0,13	0,58	76,71	71,86	74,17	67,01	64,38	74,64	70,67	75,72	65,88	Gilani et al., 2011 ; Cervantes-Pahm, 2014
Sorgho	8,4	0,28	0,40	1,09	0,43	0,40	0,07	0,58	0,41	0,74	73,53	73,53	76,28	69,10	67,73	73,31	73,45	68,34	70,79	Cervantes-Pahm et al., 2014
Avoine	13,1	0,24	0,39	0,75	0,44	0,33	0,08	0,54	0,48	0,79	88,11	86,52	87,24	84,51	81,30	81,88	84,66	77,44	80,73	Cervantes-Pahm et al., 2014
Millet Proso	17,2	0,51	1,03	3,48	0,13	0,71	0,22	1,21	0,71	2,57	85,42	78,54	82,17	95,97	71,56	78,31	80,89	66,25	80,23	Cervantes-Pahm et al., 2014
Millet Foxtail	12,9	0,29	0,60	1,94	0,15	0,54	0,20	0,72	0,95	1,38	93,88	87,03	93,56	88,27	84,76	91,05	90,75	88,63	91,01	Cervantes-Pahm et al., 2014
Millet Adlay	19,3	0,62	1,37	5,03	0,44	0,92	0,24	1,84	0,60	3,36	94	94,9	97,2	90,4	93,4	91,7	94,9	84,6	89,6	Cervantes-Pahm et al., 2014
Mais	8,5	0,17	0,26	1,35	0,15	0,28	/	0,32	0,38	0,79	84,00	86,00	92,00	76,00	76,00	78,00	85,00	79,00	84,00	Cervantes-Pahm et al., 2014
Triticale	13,2	0,04	0,06	0,12	0,05	0,05	0,02	0,08	0,06	0,14	86,00	86,00	86,00	82,00	78,00	82,00	85,00	88,00	87,00	Gilani et al., 2011

En résumé

- 135 g de protéines GGRP (DIAAS 75 %-Trp) permettent de couvrir les besoins en AAES des séniors au même titre que 100 g d'une protéine « idéale ».
- L'association de GGRP (20-30 % des protéines du mélange) avec du soja (55 %) et une autre farine végétale (orge, sorgho, maïs, lupin ; 25-15 %) permet de couvrir de manière satisfaisante (DIAAS 75 %-Lys ou SAA) les besoins en AAES des enfants malnutris.
- La supplémentation de WRP (13-15 % des protéines du mélange) par du GGRP (45-55 %) et une farine végétale (millet Adlay, soja, 32-40 %) permet de couvrir de manière satisfaisante (DIAAS > 80 %-Trp/SAA) les besoins en AAES des séniors.

4. Conclusion

Pour rappel, l'objectif de ce chapitre était de caractériser la qualité nutritionnelle de deux ingrédients protéiques issus de coproduits bovins (WRP et GGRP), au travers de la digestibilité iléal vraie (TID) et du DIAAS mesurés sur un modèle *in vivo* (porc en croissance). La question s'est également posée de savoir si la qualité nutritionnelle pouvait être optimisée afin de répondre aux besoins des populations malnutries ou à risque de malnutrition (enfants, personnes âgées) en réalisant des combinaisons optimales des deux coproduits bovins avec des sources de protéines d'origine végétale.

Il a été démontré que les TID du WRP et du GGRP sont similaires et supérieurs à 80 %. Le GGRP est en revanche le seul à présenter une qualité nutritionnelle protéique adaptée aux enfants de plus de 3 ans, aux adolescents et aux adultes (DIAAS 74 %), contrairement au WRP (DIAAS 18 %).

Ainsi le concentré de protéines WRP devra impérativement être complété par des protéines d'autre origine (végétale ou animale) plus riches en AAEs, pour atteindre la valeur minimale recommandée par la FAO (2013) pour alléger sur la qualité protéique des aliments. Toutefois, pour l'ingrédient WRP comme pour le GGRP, l'étude d'optimisation de la qualité nutritionnelle effectuée a montré qu'il n'est pas possible de compenser les déficiences en certains des AAEs de ces deux coproduits par l'ajout d'une seule source protéique végétale dans le cadre de l'alimentation des enfants malnutris.

Concernant l'alimentation des séniors, une première stratégie pourrait consister simplement à augmenter d'un facteur 1,35 la quantité de protéines apportées par l'ingrédient GGRP par rapport à une protéine idéale pour couvrir les besoins en AAEs. En revanche, le WRP devrait être apporté en association avec GGRP et une autre source végétale (millet Adlay, soja) pour couvrir de manière satisfaisante les besoins en AAEs des séniors (DIAAS > 80 %-Trp/SAA).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats souligne, sous réserve de ces ajustements, que GGRP pourrait être envisagé dans des stratégies nutritionnelles de lutte contre les états de malnutrition et de prévention chez les enfants et les seniors.

Chapitre 5

Discussion générale et perspectives

Peu d'études ont été consacrées à la caractérisation et à la valorisation de protéine issues de coproduits et plus particulièrement d'origine bovine. Avec pour objectif l'évaluation des propriétés physico-chimiques, des propriétés techno-fonctionnelles et de la qualité nutritionnelle de deux coproduits issus du processus de fonte des graisses d'origine bovine (WRP et GGRP), cette thèse s'inscrit dans une démarche plus globale visant à répondre à la demande croissante de protéines et à accompagner les potentiels utilisateurs de ces ingrédients dans leur mise en œuvre au sein d'aliments formulés et transformés. Ces travaux pourront également contribuer à terme à la création de produits innovants répondant aux besoins en AAs de l'homme (FAO, 2013), tout en diminuant l'impact environnemental de la filière viande bovine par une valorisation maximale des protéines qui en sont issues.

Pour étudier les propriétés techno-fonctionnelles (propriétés gélifiantes, émulsifiantes, rhéoépaissiantes) des deux coproduits, et l'influence de la concentration en protéines, du pH et de la force ionique sur ces propriétés, la méthodologie des surfaces de réponse à partir d'un plan d'expériences composite centré a été utilisée. Une optimisation multi-réponses a permis, par l'utilisation d'une fonction de désirabilité, de comparer ces deux coproduits à des ingrédients alimentaires couramment utilisés (pris ici comme références) pour ces mêmes propriétés techno-fonctionnelles. Cette approche a permis de déterminer les conditions environnementales dans lesquelles WRP et GGRP pouvaient mimer au mieux ces ingrédients de référence. Pour évaluer la qualité nutritionnelle de ces sources protéiques, un modèle *in vivo* (porc en croissance) a été mis en œuvre pour la mesure de leur digestibilité, de leur DIAAS et pour suivre les cinétiques plasmatiques des AAs en conditions postprandiales. Des études complémentaires *in vitro* ont permis d'étudier la structure adoptée par ces ingrédients au cours de la digestion. Enfin, des calculs théoriques ont été réalisés afin d'évaluer l'aptitude de chacun des deux coproduits à couvrir les besoins en protéines et en AAes de différentes population cibles, seuls ou en combinaison avec d'autres sources protéiques, et avec un focus particulier sur les populations à risque de déficience protéique.

Afin de synthétiser les résultats obtenus au cours de cette thèse, et de faciliter la discussion à suivre, un tableau récapitulatif décrivant les propriétés physiques, la composition, les propriétés techno-fonctionnelle et les digestions *in vivo* est proposé Tableau 33. La comparaison entre les deux coproduits, mais aussi avec la gélatine de bœuf et le caséinate de sodium (NaCas) est également présentée dans ce tableau. La discussion portera dans un premier temps sur les différents points de valorisation de WRP puis de GGRP. Enfin, les limites de ces travaux seront discutées avant d'exposer les perspectives auxquelles cette thèse ouvre quant à la valorisation des co-produits bovins.

Tableau 33: Origine des coproduits WRP et GGRP, caractérisation physico-chimique, propriétés techno-fonctionnelles et qualité nutritionnelle.

		WRP -Water Recovered Proteins	GGRP - Greasy Greaves Recovered Proteins	Comparaison
Origine et procédé d'obtention des ingrédients protéiques	Origine	Fraction protéique aqueuse issue du processus de fonte des graisses et de dégraissage d'os de coproduits bovins	Fraction protéique solide (creton gras) issue du processus de fonte des graisses de coproduits bovins	
	Extraction	Filtration et pasteurisation, puis concentration par évaporation sous vide (de 5 % à 24 % MS).	Second dégraissage du creton.	
	Séchage	Séchoir cylindre chauffant (à 157 °C)	Séchoir rotatif à tambour (à 102 °C, vapeur indirecte)	
Propriétés physiques	Poudre sèche	Grosses particules de taille hétérogène, faible écoulement et tendance à l'éboulement. Densité aérée faible et compressibilité moyenne (29 %)	Grosses particules de taille hétérogène, faibles écoulement et éboulement. Densité aérée élevée et compressibilité élevée (47%)	Taille des particules : WRP < GGRP Densité aérée : WRP < GGRP Compressibilité : WRP < GGRP
	Poudre réhydratée	Poudre soluble (97 %), non-mouillable et dispersible (86 %) Taille de particules nettement réduite par rapport à l'état sec	Poudre non soluble (67 %), mouillable et non-dispersible (71%) Taille de particules légèrement réduite par rapport à l'état sec	Taille des particules : WRP < GGRP Solubilité : WRP > GGRP Distensibilité : WRP > GGRP
Composition	Globale	62 % de protéines dont 40 % de collagène, 13 % de matière grasse, 9 % de cendres dont 6 % NaCl, pH 5,6	84 % de protéines dont 37 % de collagène, 9 % de matière grasse, 2,5 % de cendres dont 0,6 % NaCl, pH 6	Protéines : WRP < GGRP Matière grasse : WRP > GGRP Cendres : WRP > GGRP
	Solubilité protéique	80% de protéines solubles à faible force ionique 2,4% solubles à forte force ionique 4,4% insolubles ↑ force ionique (0 à 0,4 M NaCl) à pH5;6;7 = ↓ solubilité (94-89 %)	12,4% de protéines solubles à faible force ionique 3,5 % solubles à forte force ionique 70,5% insolubles ↑ force ionique (0 à 0,4 M NaCl) à pH 4;6;7 = ↑ solubilité (21-29 %)	WRP > GGRP Plus sensible à la force ionique qu'au pH
	Acides aminés (AAs)	23 % d'AAs essentiels (dont 0,06 % Trp)	34 % d'AAs essentiels (dont 0,48 % Trp)	AAs essentiels : WRP < GGRP dont le moins abondant est Trp (WRP et GGRP), le plus abondant Lys (WRP) et Leu (GGRP)
Propriétés Techno-fonctionnelles	Propriétés gélifiantes	Concentration minimale de protéines pour la gélification au refroidissement : 5 % ↑ concentration protéines 5 à 20 % = ↑ T° gélification, ↑ force et déformation à la rupture du gel, ↑ dureté et capacité de rétention d'eau du gel, ↓ cohésion et adhésion du gel	Concentration minimale de protéines pour la gélification au refroidissement : 12 % ↑ concentration protéine 12 à 20 % = ↑ force et déformation à la rupture du gel, ↑ dureté et capacité de rétention d'eau du gel, ↑ cohésion et ↓ adhésion du gel	Gélatines (5 % prot) ≥ WRP (9 % prot) > GGRP (12,9 % prot)

		WRP -Water Recovered Proteins	GGRP - Greasy Greaves Recovered Proteins	Comparaison
Propriétés Techno-fonctionnelles	Propriétés gélifiantes		↑ pH (4 à 7) = ↑capacité de rétention d'eau ↑ force ionique (0 à 0,4 M NaCl) = ↑ force et déformation à la rupture du gel et ↑capacité de rétention d'eau du gel	
	Propriétés émulsifiantes (suivi de la stabilité d'émulsion à 50 °C durant 1h)	↑ concentration protéines (5 à 20 %) = ↓ taille des gouttelettes et indice de polydispersité, ↑stabilité de l'émulsion ↑ pH (4 à 7) = ↓ indice de polydispersité	↑ concentration protéines (5 à 20 %) = ↑ taille des gouttelettes (*artéfact protéines insolubles) et ↑stabilité de l'émulsion ↑ pH (4 à 7) = ↑stabilité de l'émulsion ↑ force ionique (0 à 0,4 M NaCl) = ↑stabilité de l'émulsion	Taille des gouttelettes : GGRP > WRP > NaCas Stabilité de l'émulsion : GGRP (11 % prot) > NaCas (12,5 % prot) > WRP (14,9 % prot)
	Propriétés épaississantes	Comportement rhéofluidifiant renforcé par ↑concentration protéines (5 % à 20 %)	Non réalisé	Comportement newtonien Gélatines (5 % prot) = WRP si ↑concentration protéines (5,78 %), ↓ force ionique (0,09 vs. 0,2 M NaCl ajouté)
Digestion in vivo	Qualité nutritionnelle (Digestibilité, DIAAS)	Modérément digestible (84 %) DIAAS très faible (< 18 % - AA limitant Trp) quelle que soit la population cible	Modérément digestible (81 %) DIAAS différent selon la population cible (49 à 74 %, AA limitant Trp)	Digestibilité : WRP ≥ GGRP DIAAS : WRP < GGRP GGRP meilleure qualité nutritionnelle, adapté aux enfants (> 3 ans), adolescents et adultes, contrairement au WRP
	Plasma (AAs, Urée)	Pic de concentration plasmatique des AAs à 3 h en postprandial Concentration faible en AAes Concentration élevée en urée (pic à 7 h)	Pic de concentration plasmatique des AAs à 5 h en postprandial Concentration faible en AAes Concentration modérée en urée (pic à 7 h)	AAT : WRP < GGRP (0 à 1 h) AAes : WRP < GGRP Urée : WRP > GGRP
Digestion in vitro semi-dynamique	Structure des digestas	Phénomène d'agrégation des protéines tout au long de la digestion ↑ taille des particules progressive au cours de la digestion (distributions bimodales) ↓ viscosité au cours de la digestion (120 min)	Phénomène d'agrégation des protéines tout au long de la digestion ↑ taille des particules progressive au cours de la digestion (distributions bimodales) ↓ viscosité au cours de la digestion (120 min)	Taille des particules : WRP < GGRP Viscosité : WRP < GGRP
Conclusion	Caractéristiques majeures	Propriétés techno-fonctionnelles intéressantes permettant de se substituer à la gélatine et au NaCas Protéines de faible qualité nutritionnelle	Propriétés techno-fonctionnelles intéressantes permettant de se substituer au NaCas (stabilité émulsion) Qualité nutritionnelle des protéines intéressante pour des enfants (> 3ans), adolescents, adultes	Propriétés techno-fonctionnelles : WRP > GGRP Qualité nutritionnelle : WRP < GGRP

↑ ou ↓, augmentation ou diminution significative (p < 0,05) ; = pas de différence significative ; AA : Acide aminé ; DIAAS : score de digestibilité iléal des acides aminé

1. WRP, un ingrédient prometteur pour sa fonctionnalité

Les travaux de thèse ont permis de montrer que WRP possède de bonnes propriétés fonctionnelles. Sa richesse en collagène (40 % des protéines) favorise la formation de gels à froid, lui procurant de bonnes propriétés gélifiantes à une concentration de seulement 5 % de protéines en solution, après avoir été préalablement solubilisé à 50 °C. Il est d'ailleurs possible de reproduire les propriétés gélifiantes de la gélatine de bœuf en augmentant la concentration en protéines (9 % pour WRP contre 5 % pour la gélatine). De plus, l'augmentation de la concentration en protéines de WRP dans la solution permet d'augmenter sa température de gélification (d'environ 30 °C lorsqu'on passe de 5 à 20 % de protéines), ce qui signifie que la gélification se produit plus rapidement au cours du refroidissement, apportant ainsi une meilleure tenue du gel au cours de la fabrication et surtout lors du stockage. Ainsi, il serait envisageable d'incorporer le WRP pour la modification de texture (gels souples) classiquement utilisée pour les personnes souffrant de dysphagie (Aguilera & Park, 2016).

Une autre application culinaire serait d'utiliser le WRP comme stabilisant d'émulsions telles que des sauces. En effet, le WRP possède des propriétés émulsifiantes proches de celles du NaCas, largement utilisé dans l'industrie alimentaire pour ce type d'applications ; une solution à 14,9 % de protéines de WRP permet en effet de mimer la stabilité d'émulsion d'une solution à 12,5 % de NaCas. De plus, le WRP a l'avantage de former des émulsions stables à haute température (50 °C) et quel que soit le pH, contrairement au NaCas (Ma & Chatterton, 2021).

Enfin, du fait de sa solubilité élevée (97 % de solubilité de la poudre, 80 % de protéines solubles), le WRP pourrait être utilisé dans des sauces ou des bouillons pour apporter une saveur et/ou un arôme de viande et une légère coloration « dorée ». Toutefois, bien que la poudre soit très soluble, sa faible mouillabilité implique de mélanger vigoureusement les préparations afin d'éviter les « grumeaux ». La faible mouillabilité pourrait être liée à la migration des graisses vers la surface grains de poudres, comme c'est le cas pour les poudres lactières (Kinsella & Morr, 1984). Toutefois, la réhydratation de la poudre de WRP est rapide grâce à la dispersion pratiquement instantanée des particules sous agitation. Ce profil de réhydratation est similaire à celui des poudres de protéines de lactosérum ou de blanc d'œuf (Kinsella & Morr, 1984 ; Gaiani et al., 2007).

En revanche, du point de vue nutritionnel, le WRP présente des limites importantes en raison d'une faible teneur et d'un déséquilibre important du profil d'AAEs, le tryptophane étant l'AA limitant. Cela s'explique par la forte présence de collagène. Ainsi, bien que l'étude *in vivo* ait démontré une digestibilité supérieure à 80 % du WRP, sa qualité nutritionnelle est très faible (DIAAS < 18 %) du fait de son profil en AAEs inadapté pour toutes les catégories de populations (FAO, 2013 ; FAO, 2018a). Il est finalement difficile d'améliorer la qualité nutritionnelle de WRP en ajoutant une seule protéine végétale, sachant que les protéines végétales sont elles-mêmes pour la plupart déficientes en certains (plusieurs) AAEs. Il est cependant possible, en associant WRP, GGRP et une autre protéine végétale

telle que le soja, d'obtenir des mélanges protéiques de bonne qualité nutritionnelle (DIAAS > 80) et de couvrir les besoins en AAES des enfants > 3 ans, adolescents, adultes et donc également des séniors qui font partie de cette même catégorie de population.

2. GGRP, un ingrédient prometteur pour sa qualité nutritionnelle

La digestibilité *in vivo* de GGRP (81 %) est plus faible que celle rapportée pour la viande (> 90 %) (Silvester & Cummings, 1995 ; Oberli et al., 2015), mais similaire à celle d'hydrolysats de muscle de bœuf (autour de 80 %) (Bindari et al., 2018). Par ailleurs, GGRP présente un profil en AAES relativement bien équilibré par rapport aux besoins des enfants (> 3ans), adolescents et adultes (comprenant également les séniors), ce qui se traduit par une valeur de DIAAS de 74 % pour cette population. L'ingrédient GGRP se classe donc dans la catégorie des protéines de bonne qualité nutritionnelle selon les critères de la FAO (2013).

En revanche, le GGRP à lui seul ne permet pas de couvrir les besoins en AAES des enfants malnutris (DIAAS 49 % pour le Trp ; FAO, 2018a), ni même des enfants de 6 mois à 3 ans en bonne santé (DIAAS 57 %). Pour ces populations spécifiques, le GGRP doit être apporté en mélange avec des protéines végétales (soja-sorgho, soja-maïs, soja-orge, soja-lupin) pour couvrir raisonnablement les besoins en AAES des enfants malnutris de 6 mois à 5 ans (DIAAS de 74-75 %, FAO, 2018a). Cette approche est intéressante quand on sait que les enfants souffrant de malnutrition consomment majoritairement des protéines végétales, et que l'efficacité de cette même stratégie a été démontrée dans des précédentes études synthétisé par Asare et al., (2022), au cours de laquelle des compléments d'origine animale (dont bovine) étaient apportés à un régime à base de bouilli. Une amélioration de la croissance physique des enfants de 6 à 24 mois a pu être mise en évidence, par rapport au groupe témoin (Asare et al., 2022).

Lors de la formulation, une attention particulière devra toutefois être apportée à la réhydratation de la poudre GGRP qui n'est que partiellement soluble (solubilité de la poudre : 33 % ; solubilité des protéines : 12 %), même si ce paramètre peut être amélioré par l'augmentation de la force ionique (30 % de solubilité des protéines à 0,4 M NaCl). De plus, même si le mouillage des particules semble relativement rapide, on observe un gonflement important, en raison de l'aptitude de la poudre GGRP à absorber l'eau (jusqu'à 2,5 fois son poids). Le volume d'eau ajouté lors de la formulation impacte donc l'aspect final du produit : un faible volume d'eau ajouté (< 2,5 fois le poids de poudre) formera une masse pâteuse. En revanche, si le volume d'eau ajouté est supérieur à 2,5 fois le poids de GGRP, un phénomène de décantation peut être observé. Un processus d'agitation en continu est donc conseillé lors de la formulation en phase liquide, afin d'éviter ce phénomène et de réaliser un mélange homogène. Par conséquent, le temps de réhydratation totale peut être long, étant donné la faible dispersibilité de la poudre GGRP dans l'eau. Ce même profil de réhydratation a été rapporté pour les poudres de caséines micellaires (Schuck et al., 2002 ; Gaiani et al., 2007). Une autre solution serait d'incorporer la poudre GGRP dans d'autres ingrédients secs, avant l'ajout d'eau.

Au-delà de son intérêt nutritionnel, le GGRP peut également être valorisé pour ses propriétés techno-fonctionnelles. En effet, la présence de collagène (37 %) favorise la formation de gels, lui procurant des propriétés gélifiantes à une concentration minimum de 12 % de protéines (Le Foll et al., 2024). Cependant, un chauffage préalable à 90°C (30 min, sous agitation) est nécessaire afin de solubiliser le collagène insoluble et un refroidissement lent sous agitation doit être appliqué afin d'éviter les phénomènes de décantation. De plus, il est difficile de reproduire à l'identique les propriétés gélifiantes de la gélatine de bœuf (Chapitre 4-4.2.2). En revanche, GGRP possède une bonne capacité de stabilisation des émulsions à haute température (50 °C), et ce à une concentration en protéines inférieure à celle du NaCas (11 % contre 12.5 %). Le GGRP pourrait donc remplacer le NaCas dans les applications alimentaires où la stabilité d'émulsion est particulièrement recherchée. De plus, la stabilité des émulsions augmente avec la concentration en protéines de GGRP, mais également avec le pH et la force ionique, ce qui pourrait élargir le domaine de ses applications alimentaires.

3. Limites de l'étude et perspectives

Comme mentionné plus haut, il existe peu de travaux sur la caractérisation et la valorisation de protéines issues de coproduits animaux, et aucune sur les ingrédients protéiques qui font l'objet de cette étude. Il était donc difficile de comparer nos résultats avec les données de la littérature. Les ingrédients protéiques WRP et GGRP, composés de divers types de protéines, ne permettaient pas non plus la comparaison à un seul type de protéines, bien qu'ils soient composés d'une quantité importante de collagène. De plus, les propriétés techno-fonctionnelles ont été étudiées dans des conditions spécifiques de mise en œuvre qui sont également difficilement comparables aux études de la littérature (processus de fabrication des gels et des émulsions, conditions d'étude des propriétés...). Il en est de même concernant les cinétiques plasmatiques des AAs au cours de la digestion *in vivo*, peu de données comparables étant disponibles, ce qui a limité l'interprétation de nos résultats (Chapitre 5.1.4).

Une autre limite de notre étude réside dans le facteur de conversion (FC) de l'azote en protéines qui a été appliqué ici, à savoir 6,25, et qui est la valeur standard par défaut pour les aliments dans la plupart des réglementations et normes, et des standards commerciaux. Le FC a été fixé (au XIX^{ème} siècle) à 6.25 en supposant que la teneur en azote des protéines est uniformément de 16 %. Or, les protéines diffèrent en termes de composition en AAs, et donc de teneur en azote (Mariotti et al., 2008). La teneur en azote du collagène est par exemple de 18 %, ce qui correspond à un FC de 5,55. Par conséquent, le rapport azote/protéine des produits carnés varie en fonction du taux de collagène (Benedict, 1987). Si l'on considère les valeurs les plus récentes, le FC varie de 5,38 à 5,74 (en moyenne 5,6) pour la viande (Mariotti et al., 2008). Ainsi, la valeur du FC appliqué a non seulement un impact sur la quantité de protéines calculée pour un aliment donné, mais aussi sur la qualité nutritionnelle de celui-ci (Tessier et al., 2021). Dans notre cas, en diminuant le FC de 6,25 à 5,6, le teneur en protéines du GGRP diminuerait de 84 % à 75 % et pour WRP de 62 % à 55 %. Une alternative au FC « global » a été proposée en raisonnant sur la base de la composition en AAs et la quantité d'azote par AA, en mg/g de résidu (Tessier

et al., 2021). En appliquant cette méthode, le FC calculé serait de 5,48 pour WRP et 5,68 pour GGRP et la qualité nutritionnelle des deux coproduits se verrait améliorée, avec un DIAAS de 82% pour GGRP au lieu de 74 %, et de 20 % pour WRP au lieu de 18 % (Chapitre 5, §1.5.3). En d'autres termes, en appliquant un FC de 6,25 comme cela a été fait dans cette étude (au lieu de 5,6), la qualité nutritionnelle des ingrédients GGRP et WRP a été sous-estimée, du fait de scores chimiques vraisemblablement plus faibles que ce qu'ils sont en réalité. L'utilisation de facteurs spécifiques serait préférable car elle permet d'obtenir des estimations beaucoup plus précises de la « protéine » en termes à la fois de la quantité et de la qualité d'un aliment.

En termes de perspectives, il pourrait être pertinent d'élargir le cadre de cette étude, uniquement axée sur les protéines, en s'intéressant aux autres composants des deux ingrédients protéiques que sont GGRP et WRP. En particulier, les micronutriments (vitamine B12, fer héminique, zinc, sélénium) qu'ils contiennent pourraient présenter un intérêt nutritionnel, permettant par exemple de couvrir une part importante des recommandations nutritionnelles pour la population comme c'est le cas de la viande de bœuf (Sadaka, 2011). En effet, 100 g de WRP contiendraient 4,6 mg de Fer ; ce serait 8,3 mg dans le cas du GGRP (données CORNILLE sas). Ces concentrations sont supérieures à celles d'un steak de bœuf grillé (2,2 mg pour 100 g, donnée Ciquial).

De plus, l'optimisation nutritionnelle réalisée ici par itération pour trouver des sources protéiques complémentaires, pourrait être améliorée en utilisant une approche par programmation linéaire comme ont pu le proposer Dimina et al. (2022).

Enfin, il serait intéressant d'inclure dans l'étude les dimensions environnementale, économique et socio-culturelle pour évaluer la durabilité de la démarche de valorisation des coproduits WRP et GGRP, comme proposé par Eustachio Colombo et al. (2019).

Les perspectives d'utilisation de ces ingrédients protéiques obtenus à partir de coproduits bovins sont nombreuses. A court terme, il est envisagé d'incorporer le WRP dans des sauces, jus, bouillons, permettant par exemple de limiter l'ajout de gélatine. Le GGRP pourrait être incorporé dans de la viande hachée, ce qui permettrait de réduire les coûts de fabrication et de diminuer l'empreinte carbone du produit, tout en enrichissant le produit en protéines carnées. Des produits comme des soupes, cakes, tartes..., à destination de populations spécifiques nécessitant des apports protéiques importants comme les personnes âgées, pourraient être enrichis via l'incorporation de GGRP, en raison de sa bonne qualité nutritionnelle. Le GGRP pourrait également être incorporé dans des produits de nutrition spécialisée, adressés aux sujets malnutris. En effet, dans une perspective à long terme, des aliments thérapeutiques ou complémentaires de type RUTF/RUSF à destination des enfants ou populations malnutries dans les pays en développement, pourraient être développés avec l'ajout de GGRP. Pour cela, un travail de formulation spécifiquement adapté aux populations cibles, tant sur le plan nutritionnel que des habitudes de consommation, devra être mis en œuvre.

Les données acquises au cours de cette étude pour caractériser les deux ingrédients protéiques WRP et GGRP, issus de coproduits bovins, sont importantes pour la filière bovine car elles fournissent des données objectives qui pourront contribuer à l'acceptabilité, par les industriels et les consommateurs, d'ingrédients de ce type dans le cadre de la formulation de produits alimentaires. Elles pourront ainsi faciliter la valorisation des coproduits bovins, à ce jour sous-utilisés en alimentation humaine, en les proposant comme protéines alternatives pour répondre aux enjeux nutritionnels et environnementaux, dans une logique d'économie circulaire. A l'avenir, les protéines issues de coproduits du type WRP et GGRP pourraient constituer une alternative nutritionnelle, fonctionnelle et durable à l'utilisation de protéines animales « standards » dont la production et la consommation doivent diminuer au regard des enjeux environnementaux.

Publications et communications scientifiques

1. Publications scientifiques à comité de relecture

1.1. Publication scientifique à comité de lecture

- Le Foll R., Lechevalier V., Hamon P., Guérin-Dubiard C., Lambert X., Deglaire A., Nau F. (2024). Beef protein ingredients from fat rendering process are promising functional ingredients, *Food Chemistry*, 433, 137298.


1.2. Publications en préparation

- Le Foll R., Nau F., Hamon P., Guérin-Dubiard C., Lambert X., Deglaire A., Lechevalier V., Innovative beef protein co-products to substitute gelatin as gelling agents, and sodium caseinate as emulsifiers, à *LWT-Food Science and Technology*.
- Le Foll R., Nau F., Hamon P., Guérin-Dubiard C., Lambert X., Deglaire A., Lechevalier V., The flow properties of a beef protein co-product recovered from process water, can be modulated to mimic the flow behavior of commercial gelatin solutions.
- Le Foll R., Nau F., Le Gouar Y., Henry G., Chevalier S., Leduc A., Hamon P., Guérin-Dubiard C., Lambert X., Lechevalier V., Deglaire A.. Nutritional quality of proteins from two beef co-products as determined in the growing pig, à *The Journal of Nutrition*.


2. Communications

Posters


- Poster de présentation du sujet de thèse lors des portes ouvertes du laboratoire (2023, Rennes)



Rozenn Le Foll



Funders : Partnership Industry
•
2020-2023





**UMR INRAE – l'Institut Agro
Rennes-Angers In**
Science et technologie
du lait et de l'œuf



Team BN
Bioactivity and Nutrition




Keywords
Animal protein
Functionality
Bioavailability
in vivo digestion

Funding

Collaborators

Characterization of bovine co-products for the protein enrichment of food intended for undernourished populations

Socio-economic context

Increasing food needs in line with global demographic growth induce:

- Nutritional issues:
Availability of quality protein resources
- Environmental issues:

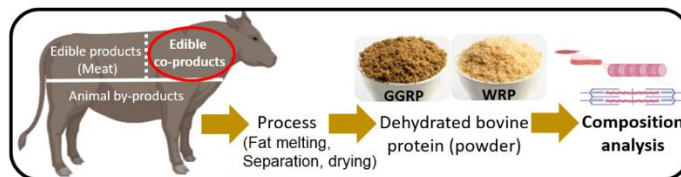
Imagine sustainable solutions to meet this growing demand for protein resources of high nutritional quality

Scientific context

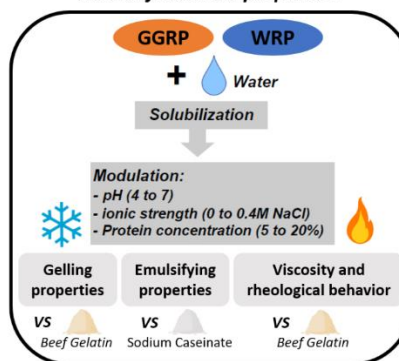
- Improve the extraction and efficiency of use of proteins from raw materials, in particular by upgrading co-products, while improving the functionality of protein ingredients
- Dehydrated proteins from bovine co-products are not valued in line with their quality (nutritional and techno-functional properties)

Research question

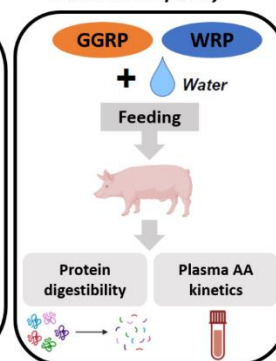
- Can bovine co-products from the fat rendering process be interesting functional and nutritional ingredients in human food ?



Techno-functional properties



Nutritional quality



Expected Results

- Position the ingredients in the field of texturizers (gelling agent, emulsifier, thickener) and understand their behavior according to the conditions of the environment (pH, ionic strength, temperature)
- Evaluate the nutritional value of protein ingredients (*in vivo* digestibility)

Perspectives

- To establish recommendations for conditions to be used as texturizing ingredients
- To determine nutritional quality in order to formulate mixes adapted to nutritional strategies
- To acquire knowledge on the link between biochemical and nutritional properties of food

- *Journée Scientifiques de l'école doctorale EGAAL. Juin 2022. Rennes, France*

Characterization of the gelling properties of protein from bovine co-product using the response surface methodology.

Rozenn Le Foll^{a*}, Valérie Lechevalier^a, Xavier Lambert^b, Françoise Nau^a.

^{a*} UMR STLO 1253, INRAE, INSTITUT AGRO RENNES-ANGER, 65 rue de saint-brieuc, 35042 Rennes cedex, France

^b CORNILLE sas, Cornillé, 35500, France

Keywords: Alimentation, Animal co-product, gelling properties

Abstract:

Aim:

Dehydrated beef proteins are a co-product of edible meat from the fat rendering process that are underutilized in human food. The valorization of these bovine co-products would increase protein resources of good nutritional quality. Giving value to such co-products would reduce the amount of waste and therefore it would contribute to a more sustainable and profitable meat industry.

Method:

In this study, three beef co-products were first characterized with regard to their composition. Second, the response surface methodology was used to characterize and optimize protein solubility and gelling properties by modulating pH (4 to 7), protein concentration (5 % to 20 %) and ionic strength (0 to 0.4M NaCl). The responses of gelling characteristics as a function of the three factors were adjusted to second-order polynomial models.

Results:

These products mostly consisted of proteins (ExtraBeef80: 83.71 %±1.17; K85G: 62.32 % ± 0.00), with molecular weights ranging from 10 to 300 kDa, corresponding to sarcoplasmic, myofibrillar and connective tissue (collagen) proteins in the soluble fraction.

Protein concentration was the most significant factor for almost all the characteristics measured. However, basic pH significantly decreased water loss of ExtraBeef80 gels, and high ionic strength positively affected deformation at the rupture of K85G and ExtraBeef80 gels, and the water loss of ExtraBeef80 gels. Optimum conditions have been determined for each characteristic, in order to get closer to the performances of commercially available beef gelatins.

Conclusion:

This information of the composition and gelling properties of proteins co-products can be useful in guiding the development of functional ingredients suitable for specific uses.

- *36th European Federation of Food Science and Technology (EFFoST) International Conference, Novembre, 2022, Dublin, Irlande.*

Characterization of the gelling properties of protein from bovine co-products using response surface methodology.

Rozenn Le Foll^a, Valérie Lechevalier^a, Catherine Guérin^a, Amélie Deglaire^a, Xavier Lambert^b, Françoise Nau^a.

a* UMR STLO 1253, INRAE, INSTITUT AGRO RENNES-ANGER, 65 rue de saint-brieuc, 35042 Rennes cedex, France

b CORNILLE sas, Cornillé, 35500, France

Aim:

Dehydrated beef proteins are a co-product of edible meat from the fat rendering process that are underutilized in human food. The valorization of these bovine co-products would increase protein resources of good nutritional quality. Giving value to such co-products would reduce the amount of waste and therefore it would contribute to a more sustainable and profitable meat industry.

Method:

In this study, two beef co-products were first characterized with regard to their composition. Second, the response surface methodology was used to characterize and optimize protein solubility and gelling properties by modulating pH (4 to 7), protein concentration (5 % to 20 %) and ionic strength (0 to 0.4M NaCl). The responses of gelling characteristics as a function of the three factors were adjusted to second-order polynomial models.

Results:

These products mostly consisted of proteins (ExtraBeef80: 83.71 % \pm 1.17; K85G: 62.32 % \pm 0.00), with molecular weights ranging from 10 to 300 kDa, corresponding to sarcoplasmic, myofibrillar and connective tissue (collagen) proteins in the soluble fraction.

Protein concentration was the most significant factor for almost all the characteristics measured. However, basic pH significantly decreased water loss of ExtraBeef80 gels, and high ionic strength positively affected deformation at the rupture of ExtraBeef80 gels, and the water loss of ExtraBeef80 gels. Optimum conditions have been determined for each characteristic, in order to get closer to the performances of commercially available beef gelatins.

Conclusion:

This information of the composition and gelling properties of proteins co-products can be useful in guiding the development of functional ingredients suitable for specific uses.

Characterization of the gelling properties of protein from bovine co-products using response surface methodology



Rozenn Le Foll^a, Valérie Lechevalier^a, Catherine Guérin^a, Amélie Deglaire^a, Xavier Lambert^b, Françoise Nau^a.

^a UMR STLO 1253, INRAE, INSTITUT AGRO RENNES-ANGERS, 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes cedex, France
^b CORNILLE sas, Cornillé, 35500, France

DOCTORAT / ECOLOGIE
 BRETAGNE / GEOSCIENCES
 LOIRE / AGRONOME ALIMENTATION

Context



Growing food needs linked to global demographic change are driving:

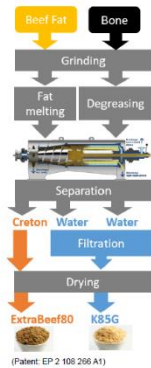
- Nutritional issues: Availability of high quality protein resources
- Environmental issues : Sustainable solutions to meet this growing demand for protein resources

Edible meat co-products are underutilized in the human diet; valorize co-products:

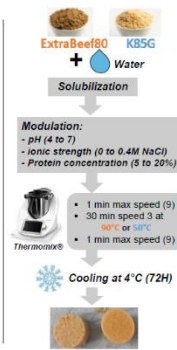
- Would increase the protein resources of good nutritional quality
- Would reduce the quantity of wastes
- Would contribute to a more sustainable and more profitable meat industry

Materials and Methods

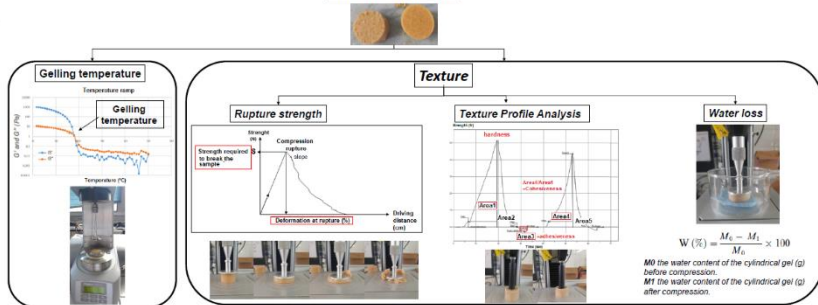
Manufacturing process



Gel making



Gelling properties



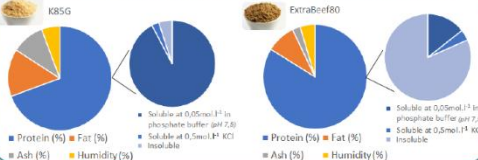
Response surface methodology : Central composite design

- Experimental variables : protein concentration, pH and ionic strength (Xi)
- Adjusted to a second-degree polynomial regression model

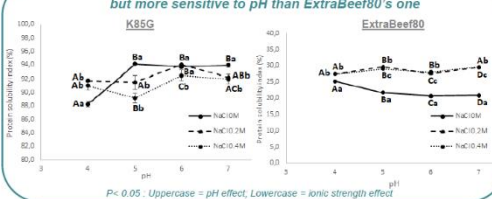
$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

Results

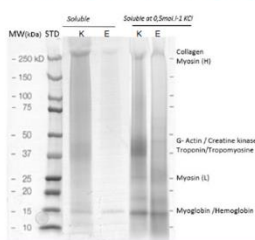
The two products differ in their content of soluble proteins and fat



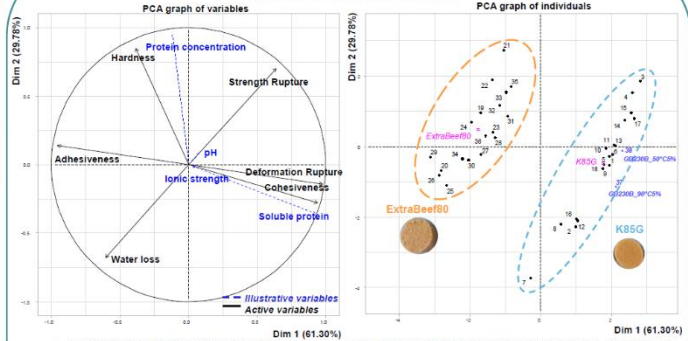
K85G protein solubility is higher but more sensitive to pH than ExtraBeef80's one



Soluble protein fractions are mainly composed of sarcoplasmic proteins, myofibrillar proteins and collagen, known for their gelling properties.



The gelling properties depend mainly on the concentration of proteins, especially soluble proteins of the products tested.

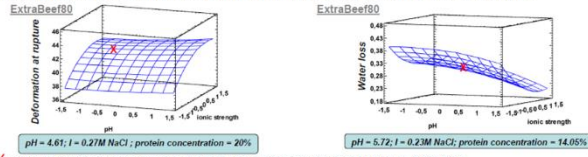


- PC1 separates ExtraBeef80 from K85G : gels made with ExtraBeef80 have a higher adhesiveness, cohesiveness and deformation at the rupture than K85G gels. PC1 is well correlated with soluble protein concentration.
- PC2 explains the variability within gels from a given product opposing hard gels with low water loss (top) to soft gels with high water lost (bottom). PC2 is well correlated with protein concentration.
- K85G best mimics commercial gelatins at 230Bloom (GB).

What about the effect of pH and ionic strength?

- The gelling properties of K85G are not influenced by pH and ionic strength contrary to ExtraBeef80 gels :
- Increasing the ionic strength increases the deformation at the rupture and decreases the water loss of ExtraBeef80 gels.
- Increasing pH decreases the water loss of ExtraBeef80 gels.

Modulating the pH and/or ionic strength allows ExtraBeef80 to approach the properties of commercial gelatin.



X Optimal conditions to mimic a commercial beef gelatin 230Bloom (5% protein, pH=5.55, 0.2M NaCl)

Conclusion

- The protein concentration is the key factor in optimizing the gelling properties of both beef co-products.
- K85G gelation does not depend on pH or ionic strength and comes closest to commercial gelatin than ExtraBeef80.
- The variations in pH and ionic strength on the ExtraBeef80 make it possible to approximate the gelling parameters of commercial beef gelatin.
- These results may be useful in guiding the development of functional ingredients suitable for specific technological uses.

- International Symposium on “Dietary Protein for Human Health”, Septembre 2023, Utrecht, Pays-Bas

Nutritional quality of proteins from two beef co-products as determined in the growing pig

Rozenn Le Foll¹; Françoise Nau¹; Yann Le Gouar¹; Gwenaële Henry¹; Séverine Chevalier¹; Arlette Leduc¹; Pascaline Hamon¹; Catherine Guérin-Dubiart¹; Xavier Lambert²; Valérie Lechevalier¹; Amélie Deglaire^{1,*}

1 UMR STLO 1253, INRAE, INSTITUT AGRO RENNES-ANGER, 65 rue de saint-brieuc, 35042 Rennes cedex, France

2 CORNILLE sas, Cornillé, 35500, France

The increasing demand for food and especially for protein, intensifies the search for alternative protein sources. The valorization of co-products currently not used as human foods, such as from meat is from this point of view a promising approach, in line with the principles of a circular economy. The present study aimed to evaluate the nutritional quality of two protein rich co-products of bovine origin from the fat rendering process. Their true ileal digestibility (TID), digestible indispensable amino acid score (DIAAS) and the postprandial plasma amino acid (AA) kinetics were determined with 10 growing pigs surgically fitted with ileal T-cannulas and a catheter in the jugular vein. After recovery, they received each over a 2.5-day period and following a cross-over design, two experimental diets based either on Greasy Greaves Recovered Proteins (GGRP) or on Water Recovered Proteins (WRP), as the sole source of crude protein, followed by a protein-free diet for endogenous protein loss evaluation. Titanium dioxide (3 g/kg) was used as a digestibility marker. Digesta and blood samples were collected during the 9 hours following meal ingestion (start at 8 am) and total N (Dumas method) and AA contents (ion-exchange chromatography) were determined. Data were statistically analysed using linear models. The mean (\pm SD) TID of N was not different ($p > 0.05$) between WRP (84.2 ± 3.2 %) and GGRP (81.2 ± 2.3 %). The first limiting AA was tryptophan for both protein ingredients, with the DIAAS much higher for GGRP (74 %) than WRP (18 %). The kinetics of AA release differed between proteins, with postprandial plasma AA concentration reaching its maximal value earlier for WRP (3 hours) than for GGRP (5 hours). GGRP has a nutritional quality suitable to meet the needs of older children, adolescents and adults, while WRP should be supplemented with other protein sources rich in essential AAs to fulfill the AA requirements.

INRAE **Nutritional quality of proteins from two beef co-products as determined in the growing pig**

L'INSTITUT agro Rennes Angers

Le Foll R.¹; Nau F.¹; Le Gouar Y.¹; Henry G.¹; Chevalier S.¹; Leduc A.¹; Hamon P.¹; Guérin-Dubiart C.¹; Lambert X.²; Lechevalier V.¹; Deglaire A.^{1*}

INTRODUCTION and OBJECTIVE

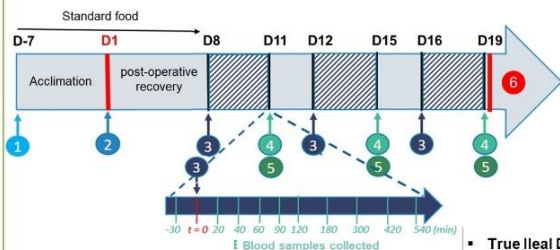
- The increasing demand for food and especially for protein, intensifies the search for **alternative protein sources**.
- The valorization of **co-products** not yet used as human foods, such as from meat production, is from this point of view promising.
- The present study aimed to evaluate the **nutritional quality** of two protein ingredients extracted from the **beef fat rendering process**.

METHODOLOGY

Diets :

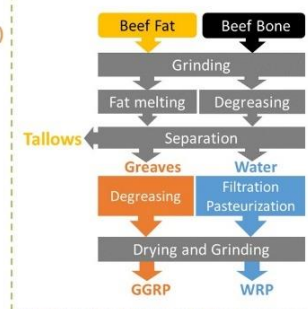
- Two diets (iso-proteic) based on 10% protein :
 - **Water Recovered Protein (WRP)**
 - **Greasy Greaves Recovered Protein (GGRP)**
- Protein-Free (PF) diets : for endogenous N and AA flow determination

Experimental design : as recommended by FAO (2014)



10 growing pigs
(Large White × Land Race × Pietrain)
♂, three-months old, 2 blocks

Diagram of the production process for GGRP and WRP



- 1 - Isolation in individual cages
- 2 - Surgery - ileal cannula and catheter (jugular vein)
- 3 - Meal habituation, 2.5 days, cross-over
- 4 - Collection of ileal digesta (for 9 hours)
- 5 - Blood collection (10 samples for 9 hours)
- 6 - Sample analyse; Total nitrogen (N, Dumas), Amino acid (acid hydrolysis & Cation exchange chromatography) and Tryptophan content (basic hydrolysis & HPLC, fluorimetry), Marker (TiO₂, ICP-OES)

• **True Ileal Digestibility (TID %)** = $100 \times \frac{\text{dietary AA intake} - (\text{AAI}_{\text{digesta}} - \text{AAI}_{\text{endogenous}})}{\text{dietary AA intake}}$

Amino Acid Flow (AAFI)_{endogenous} = $\frac{\text{AA}_{\text{PF digesta}} \times \text{Marker}_{\text{PF diet}}}{\text{Marker}_{\text{PF digesta}}}$; $\text{AAFI}_{\text{digesta}} = \frac{\text{AA}_{\text{digesta}} \times \text{Marker}_{\text{diet}}}{\text{Marker}_{\text{digesta}}}$

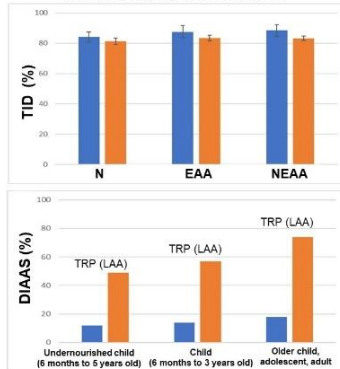
• **Digestibility Ileal Amino Acid Score (DIAAS %)** = $\text{MIN} [100 \times \frac{\text{mg of the digestible dietary EAA in 1 g of the test protein}}{\text{mg of the dietary EAA in 1 g of the reference protein}}]$

RESULTS

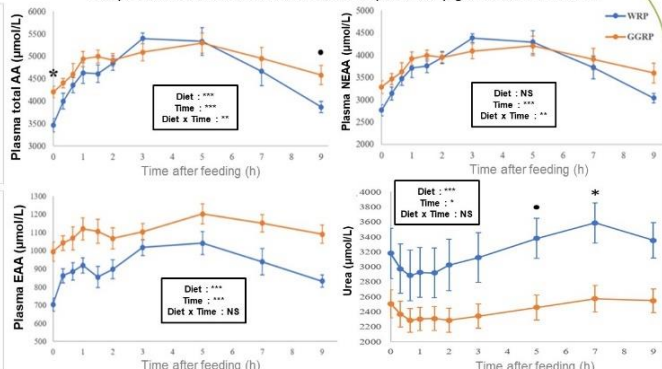
AA distribution of the diets



TID and DIAAS of WRP and GGRP



Postprandial AAs and Urea concentration in plasma of pigs fed WRP and GGRP



N : Nitrogen; EAA : Essential Amino Acids; NEAA : Non-essential Amino Acids; AA : Amino Acids; LAA : limiting amino acid; TRP: Tryptophan p < 0.001 (***), p < 0.01 (**), p < 0.05 (*) and p > 0.05 (NS) or p < 0.1 (•).

WRP is made up of less EAA than GGRP. WRP and GGRP proteins are **moderately digestible** (TID ~ 80%). The first limiting AA is tryptophan (TRP) for both protein ingredients. The DIAAS measurement classifies GGRP as a **good quality protein** but solely for older children, adolescents and adults population.

The **kinetics of AA release** differs between proteins, with postprandial plasma AA concentration reaching its maximal value earlier for WRP (3 hours) than for GGRP (5 hours). The difference in plasma urea concentration, indicates a greater level of **hepatic AA catabolism** and an **EAA deficits** for WRP than GGRP, in line with the greater imbalance in terms of EAA profile for WRP than GGRP.

CONCLUSION

- GGRP has a nutritional quality suitable to meet the needs of older children, adolescents and adults, while WRP should be supplemented with other protein sources rich in EAAs to fulfill the AA requirements.
- Postprandial kinetics of plasma AA and urea highlighted the higher efficiency of GGRP for protein muscle synthesis.



¹ INRAE, Institut Agro, STLO, 35042 Rennes, France
² CORNILLE sas, 35500 Cornillé, France



- Journées Francophones de Nutrition (JFN), Décembre 2023, Marseille, France.

Qualité nutritionnelle des protéines de deux coproduits bovins déterminée chez le porc en croissance.

Rozenn Le Foll¹; Françoise Nau¹; Yann Le Gouar¹; Gwenaële Henry¹; Séverine Chevalier¹; Arlette Leduc¹; Catherine Guérin-Dubiart¹; Xavier Lambert², Valérie Lechevalier¹; Amélie Deglaire¹.

¹INRAE, Institut Agro, STLO, 35042 Rennes, France

²CORNILLE sas, 35500 Cornillé, France

Mots-clés : Coproduit de bœuf ; Protéine; Collagène; Digestibilité; DIAAS ; Biodisponibilité

Thème : 1-Alimentation durable - Alimentation animale et qualité des produits - Technologie alimentaire

Discipline : 3-Expérimental

Introduction et but de l'étude : La demande croissante en protéines conduit à la recherche de sources alternatives. La valorisation de coproduits, comme les coproduits carnés peu valorisés dans l'alimentation humaine, est une voie prometteuse pour relever ce défi, qui s'inscrit par ailleurs dans le principe d'économie circulaire. La présente étude visait à évaluer la qualité nutritionnelle de deux ingrédients protéiques d'origine bovine (Greasy Greaves Recovered Proteins-GGRP et Water Recovered Proteins-WRP), tous deux coproduits du processus de fonte des graisses.

Matériel et méthodes : La digestibilité iléale vraie (TID), le score d'acides aminés indispensables digestibles (DIAAS) et la cinétique de libération des acides aminés plasmatiques (AA) ont été mesurés sur ces deux ingrédients protéiques chez dix porcs en croissance selon un plan expérimental en cross-over. Chaque ingrédient protéique était inclus dans un régime expérimental en tant que seule source de protéines brutes (CP) et d'AAs, de sorte que les régimes étaient iso-azotés. Le dioxyde de titane (3 g/kg) a été utilisé comme marqueur non digestible. Un régime sans protéine, administré à la fin de la période expérimentale, a permis d'évaluer les pertes endogènes en N et AA. Des échantillons de digesta et de sang ont été prélevés tout au long des 9 heures suivant l'ingestion d'un repas et les teneurs en azote (N) et AAs ont été analysées respectivement par la méthode Dumas et par chromatographie par échange d'ions. Les données ont été analysées statistiquement à l'aide de modèles linéaires.

Résultats et analyse statistique : La TID du N total n'était pas différente ($p > 0,05$) entre WRP et GGRP ($84,2 \pm 3,2$ et $81,2 \pm 2,3$ %, respectivement ; moyenne \pm écart-type). Le principal AA limitant était le tryptophane pour les deux ingrédients protéiques, avec un DIAAS beaucoup plus élevé pour le GGRP (74 %) que pour le WRP (18 %) pour les enfants âgés, adolescents et adultes. La cinétique de libération des AAs différait selon les protéines, la concentration plasmatique postprandiale d'AA atteignant sa valeur maximale plus tôt pour le WRP (3 h) que pour le GGRP (5 h). La concentration plasmatique des

AA totaux et essentiels était plus élevée ($p < 0,001$) avec le repas GGRP qu'avec le repas WRP ; l'inverse était vrai pour l'urée ($p < 0,001$). La différence de concentration plasmatique en urée suppose un catabolisme hépatique des AA et un déficit en AA essentiel plus important pour le WRP par rapport au GGRP. A l'inverse une meilleure utilisation des AA pour la synthèse protéique est envisagée pour le GGRP.

Conclusion : Le GGRP a une qualité nutritionnelle adaptée pour répondre aux besoins des enfants âgés, adolescents et adultes, tandis que le WRP doit être complété par d'autres sources de protéines riches en AA essentiels pour répondre aux besoins nutritionnels.

Références

- Abdel-Aal, E.-S. M., & Hucl, P. (2002). Amino Acid Composition and In Vitro Protein Digestibility of Selected Ancient Wheats and their End Products. *Journal of Food Composition and Analysis*, *15*(6), 737-747. <https://doi.org/10.1006/jfca.2002.1094>
- Adeola, O., Xue, P. C., Cowieson, A. J., & Ajuwon, K. M. (2016). Basal endogenous losses of amino acids in protein nutrition research for swine and poultry. *Animal Feed Science and Technology*, *221*, 274-283. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.06.004>
- Adhikari, S., Schop, M., de Boer, I. J. M., & Huppertz, T. (2022). Protein Quality in Perspective : A Review of Protein Quality Metrics and Their Applications. *Nutrients*, *14*(5), 5. <https://doi.org/10.3390/nu14050947>
- Aguilera, J. M., & Park, D. J. (2016). Texture-modified foods for the elderly : Status, technology and opportunities. *Trends in Food Science & Technology*, *57*, 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.001>
- Ahmed, J. (2017). Rheological Properties of Gelatin and Advances in Measurement. In *Advances in Food Rheology and Its Applications* (p. 377-404). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100431-9.00015-2>
- Aluko, R. E. (2004). The extraction and purification of proteins : An introduction. In R. Y. Yada (Éd.), *Proteins in Food Processing* (p. 323-351). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781855738379.2.323>
- Álvarez, C., Drummond, L., & Mullen, A. M. (2018). Novel “gel demineralizing” method for protein recovery from fat rendering waste stream based on its gelling properties. *Food Hydrocolloids*, *84*, 529-536. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.033>
- Amis, E. J., Carriere, C. J., Ferry, J. D., & Veis, A. (1985). Effect of pH on collagen flexibility determined from dilute solution viscoelastic measurements. *International Journal of Biological Macromolecules*, *7*(3), 130-134. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(85\)90014-5](https://doi.org/10.1016/0141-8130(85)90014-5)
- Amiza, M. A., Shima, W. M., Nor Hayati, I., & Nizaha Juhaida, M. (2015). Optimization of gelatin extraction conditions from Cobia (*Rachycentron canadum*) skin and its physicochemical characteristics as compared to bovine gelatin. *International Food Research Journal*, *22*, 213-224.
- An, R., Nickols-Richardson, S. M., Khan, N., Liu, J., Liu, R., & Clarke, C. (2019). Impact of Beef and Beef Product Intake on Cognition in Children and Young Adults : A Systematic Review. *Nutrients*, *11*(8), 1797. <https://doi.org/10.3390/nu11081797>
- Anses. (2019). *AVIS révisé de l'Anses relatif à l'actualisation des repères alimentaires du PNNS - pour les femmes dès la ménopause et les hommes de plus de 65 ans*. Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. <https://www.anses.fr/fr/content/avis-r%C3%A9vis%C3%A9-de-lanses-relatif-%C3%A0-lactualisation-des-rep%C3%A8res-alimentaires-du-pnns-pour-les>
- Anzani, C., Boukid, F., Drummond, L., Mullen, A. M., & Álvarez, C. (2020). Optimising the use of proteins from rich meat co-products and non-meat alternatives : Nutritional, technological and allergenicity challenges. *Food Research International*, *137*, 109575. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109575>
- AOAC international. (1992). *AOAC 992.15-1992, Crude protein in meat and meat products : AOAC Official Method*. http://www.aocofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&products_id=383
- Arêas, José A. G., Alcocer, M. J. C., & Mota, E. M. A. (1993). Effect of organic solvent and the lipid content on functionality of bovine lung protein isolates. *Food Chemistry*, *48*(3), 285-290. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90142-3](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90142-3)
- Asai, T. T., Oikawa, F., Yoshikawa, K., Inoue, N., & Sato, K. (2019). Food-Derived Collagen Peptides, Prolyl-Hydroxyproline (Pro-Hyp), and Hydroxyprolyl-Glycine (Hyp-Gly) Enhance Growth of

- Primary Cultured Mouse Skin Fibroblast Using Fetal Bovine Serum Free from Hydroxypropyl Peptide. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 229. <https://doi.org/10.3390/ijms21010229>
- Asare, H., Rosi, A., Faber, M., Smuts, C. M., & Ricci, C. (2022). Animal-source foods as a suitable complementary food for improved physical growth in 6 to 24-month-old children in low- and middle-income countries : A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *British Journal of Nutrition*, 128(12), 2453-2463. <https://doi.org/10.1017/S0007114522000290>
- Attia, Y. A., Al-Harhi, M. A., Korish, M. A., & Shiboob, M. H. (2020). Protein and Amino Acid Content in Four Brands of Commercial Table Eggs in Retail Markets in Relation to Human Requirements. *Animals*, 10(3), 406. <https://doi.org/10.3390/ani10030406>
- Bahwere, P., Akomo, P., Mwale, M., Murakami, H., Banda, C., Kathumba, S., Banda, C., Jere, S., Sadler, K., & Collins, S. (2017). Soya, maize, and sorghum-based ready-to-use therapeutic food with amino acid is as efficacious as the standard milk and peanut paste-based formulation for the treatment of severe acute malnutrition in children : A noninferiority individually randomized controlled efficacy clinical trial in Malawi1. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 106(4), 1100-1112. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.156653>
- Baker, D. H. (2008). Animal Models in Nutrition Research. *The Journal of Nutrition*, 138(2), 391-396. <https://doi.org/10.1093/jn/138.2.391>
- Balehegn, M., Mekuriaw, Z., Miller, L., Mckune, S., & Adesogan, A. T. (2019). Animal-sourced foods for improved cognitive development. *Animal Frontiers*, 9(4), 50-57. <https://doi.org/10.1093/af/vfz039>
- Bandyopadhyay, S., Kashyap, S., Calvez, J., Devi, S., Azzout-Marniche, D., Tomé, D., Kurpad, A. V., & Gaudichon, C. (2022). Evaluation of Protein Quality in Humans and Insights on Stable Isotope Approaches to Measure Digestibility – A Review. *Advances in Nutrition*, 13(4), 1131-1143. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab134>
- Banerjee, S., & Bhattacharya, S. (2012). Food gels : Gelling process and new applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(4), 334-346. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500234>
- Barbé, F., Ménard, O., Le Gouar, Y., Buffière, C., Famelart, M.-H., Laroche, B., Le Feunteun, S., Dupont, D., & Rémond, D. (2013). 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*, 136(3), 1203-1212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.022>
- Barbosa-Cánovas, G. V., Ortega-Rivas, E., & Yan, H. (2005). *Food Powders-Physical Properties, Processing, and Functionality*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/0-387-27613-0>
- Barnes, H. A., Hutton, J. F., & Walters, K. (1989). *An Introduction to Rheology*. Elsevier.
- Baugreet, S., Kerry, J. P., Allen, P., & Hamill, R. M. (2017). Optimisation of protein-fortified beef patties targeted to the needs of older adults : A mixture design approach. *Meat Science*, 134, 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.07.023>
- Bender, A. E. (1960). Correlation of amino acid composition with nutritive value of proteins. *Clinica Chimica Acta*, 5(1), 1-5. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(60\)90081-4](https://doi.org/10.1016/0009-8981(60)90081-4)
- Benedict, R. C. (1987). Determination of nitrogen and protein content of meat and meat products. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 70(1), 69-74.
- Bhutta, Z. A., Berkley, J. A., Bandsma, R. H. J., Kerac, M., Trehan, I., & Briend, A. (2017). Severe childhood malnutrition. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, 17067. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.67>

- Bianchi, M. a., Pilosof, A. m. r., & Bartholomai, G. b. (1987). Influence of Soy Protein and NaCl on the Rheological Properties of Beef, Pork or Chicken Muscle Homogenates. *Journal of Food Science*, 52(4), 890-892. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb14235.x>
- Biga, L. M., Bronson, S., Dawson, S., Harwell, A., Hopkins, R., Kaufmann, J., LeMaster, M., Matern, P., Morrison-Graham, K., Oja, K., Quick, D., Runyeon, J., Oeru, O., & OpenStax. (2019). *Skeletal Muscle*. <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/10-2-skeletal-muscle/>
- Bindari, Y. R., Laerke, H. N., & Nørgaard, J. V. (2018). Standardized ileal digestibility and digestible indispensable amino acid score of porcine and bovine hydrolyzates in pigs: Amino acid digestibility of protein hydrolyzates in pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(6), 2131-2137. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8697>
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Chapter 16—Amino Acid Metabolism. In A. Blanco & G. Blanco (Éds.), *Medical Biochemistry* (p. 367-399). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00016-1>
- Bloom, O. T. (1925). *Machine for testing jelly strength of glues, gelatins, and the like* (United States US1540979A). <https://patents.google.com/patent/US1540979A/en>
- Bohn, T., Carriere, F., Day, L., Deglaire, A., Egger, L., Freitas, D., Golding, M., Le Feunteun, S., Macierzanka, A., Menard, O., Miralles, B., Moscovici, A., Portmann, R., Recio, I., Rémond, D., Santé-Lhoutelier, V., Wooster, T. J., Lesmes, U., Mackie, A. R., & Dupont, D. (2018). Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(13), 2239-2261. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1315362>
- Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M. P., Maubois, J. L., & Beaufrère, B. (1997). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), 14930-14935. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14930>
- Boles, J. A., Rathgeber, B. M., & Shand, P. J. (2000). Recovery of proteins from beef bone and the functionality of these proteins in sausage batters. *Meat Science*, 55(2), 223-231. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00146-1](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00146-1)
- Borwankar, R. P. (1992). Food texture and rheology: A tutorial review. *Journal of Food Engineering*, 16(1), 1-16. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(92\)90016-Y](https://doi.org/10.1016/0260-8774(92)90016-Y)
- Bos, C., Gaudichon, C., Pueyo, M. E., Morens, C., Tomé, D., Metges, C. C., Petzke, K. J., Everwand, J., & Benamouzig, R. (2003). Postprandial Kinetics of Dietary Amino Acids Are the Main Determinant of Their Metabolism after Soy or Milk Protein Ingestion in Humans. *The Journal of Nutrition*, 133(5), 1308-1315. <https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1308>
- Bos, M., & van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91(3), 437-471. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(00\)00077-4](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(00)00077-4)
- Bourne, M. (2002). *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. Elsevier.
- Bourne, M. C., Kenny, J. F., & Barnard, J. (1978). Computer-Assisted Readout of Data from Texture Profile Analysis Curves. *Journal of Texture Studies*, 9(4), 481-494. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1978.tb01219.x>
- Box, G. E. P., & Wilson, K. B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 13(1), 1-38. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1951.tb00067.x>
- Brixi, G. (2018). Innovative optimization of ready to use food for treatment of acute malnutrition. *Maternal & Child Nutrition*, 14(4), e12599. <https://doi.org/10.1111/mcn.12599>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assuncao, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carriere, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C.,

- Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), 4.
- Brown, J. A., & Cline, T. R. (1974). Urea Excretion in the Pig: An Indicator of Protein Quality and Amino Acid Requirements. *The Journal of Nutrition*, *104*(5), 542-545. <https://doi.org/10.1093/jn/104.5.542>
- Buffière, C., Gaudichon, C., Hafnaoui, N., Migné, C., Scislowsky, V., Khodorova, N., Mosoni, L., Blot, A., Boirie, Y., Dardevet, D., Santé-Lhoutellier, V., & Rémond, D. (2017). In the elderly, meat protein assimilation from rare meat is lower than that from meat that is well done. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *ajcn158113*. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.158113>
- Buffière, C., Hiolle, M., Peyron, M.-A., Richard, R., Meunier, N., Batisse, C., Rémond, D., Dupont, D., Nau, F., Pereira, B., & Savary-Auzeloux, I. (2021). Food matrix structure (from Biscuit to Custard) has an impact on folate bioavailability in healthy volunteers. *European Journal of Nutrition*, *60*(1), 411-423. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02258-5>
- Canfield, C.-A., & Bradshaw, P. C. (2019). Amino acids in the regulation of aging and aging-related diseases. *Translational Medicine of Aging*, *3*, 70-89. <https://doi.org/10.1016/j.tma.2019.09.001>
- Carr, R. (1965). Evaluating flow properties of solids. *Chemical Engineering*. <https://www.semanticscholar.org/paper/EVALUATING-FLOW-PROPERTIES-OF-SOLIDS-Carr/09d1de3f90a3ce6c4f45e3cbd1258ba92e8570f4>
- Cervantes-Pahm, S. K., Liu, Y., & Stein, H. H. (2014). Digestible indispensable amino acid score and digestible amino acids in eight cereal grains. *The British Journal of Nutrition*, *111*(9), 1663-1672. <https://doi.org/10.1017/S0007114513004273>
- Chan, J. T. Y., Omana, D. A., & Betti, M. (2011). Functional and rheological properties of proteins in frozen turkey breast meat with different ultimate pH. *Poultry Science*, *90*(5), 1112-1123. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01185>
- Chapleau, N. J., & de Lamballerie-Anton, M. I. (2003). Changes in myofibrillar proteins interactions and rheological properties induced by high-pressure processing. *European Food Research and Technology*, *216*(6), 470-476. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0684-5>
- Chapoutot, P., Rouillé, B., Sauvart, D., & Renaud, B. (2018). Les coproduits de l'industrie agro-alimentaire : Des ressources alimentaires de qualité à ne pas négliger. *INRAE Productions Animales*, *31*(3), 3. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2018.31.3.2353>
- Charton, E., Bourgeois, A., Bellanger, A., Le-Gouar, Y., Dahirel, P., Romé, V., Randuineau, G., Cahu, A., Moughan, P. J., Montoya, C. A., Blat, S., Dupont, D., Deglaire, A., & Le Huërou-Luron, I. (2022). Infant nutrition affects the microbiota-gut-brain axis : Comparison of human milk vs. infant formula feeding in the piglet model. *Frontiers in Nutrition*, *9*, 976042. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.976042>
- Chauvet, L., Ménard, O., Le Gouar, Y., Henry, G., Jardin, J., Hennetier, M., Croguennec, T., Van Audenhaege, M., Dupont, D., Lemaire, M., Le Huërou-Luron, I., & Deglaire, A. (2023). Protein ingredient quality of infant formulas impacts their structure and kinetics of proteolysis under in vitro dynamic digestion. *Food Research International*, *169*, 112883. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112883>
- Cheftel, J.-C., Cuq, J.-L., & Lorient, D. (1985). *Protéines alimentaires : Biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle, modifications chimiques*. Lavoisier.
- Chen, X., Tume, R. K., Xu, X., & Zhou, G. (2017). Solubilization of myofibrillar proteins in water or low ionic strength media : Classical techniques, basic principles, and novel functionalities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(15), 3260-3280. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1110111>

- Chen, X., Xu, X., Liu, D., Zhou, G., Han, M., & Wang, P. (2018). Rheological behavior, conformational changes and interactions of water-soluble myofibrillar protein during heating. *Food Hydrocolloids*, 77, 524-533. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.030>
- Cheng, D. C.-H. (1986). Yield stress : A time-dependent property and how to measure it. *Rheologica Acta*, 25(5), 542-554. <https://doi.org/10.1007/BF01774406>
- Clavaud, C., Bérut, A., Metzger, B., & Forterre, Y. (2018). Suspensions rhéo-épaississantes—Principes et applications. *Matériaux fonctionnels - Matériaux biosourcés*. <https://doi.org/10.51257/a-v1-n3310>
- Cofrades, S., Careche, M., Carballo, J., & Colmenero, F. J. (1993). Protein Concentration, pH and Ionic Strength Affect Apparent Viscosity of Actomyosin. *Journal of Food Science*, 58(6), 1269-1272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb06163.x>
- Comfort, S., & Howell, N. K. (2003). Gelation properties of salt soluble meat protein and soluble wheat protein mixtures. *Food Hydrocolloids*, 17(2), 149-159. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(02\)00047-4](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00047-4)
- Concern Worldwide. (2022). *2022 Global Hunger Index : Food systems transformation and local governance*. 60.
- Correa de Moraes, M., & Lopes Cunha, R. (2013). Gelation property and water holding capacity of heat-treated collagen at different temperature and pH values. *Food Research International*, 50(1), 213-223. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.016>
- Couarraze, G., GROSSIORD, J., & HUANG, N. (2014). *Initiation à la rhéologie (4^e Éd.) : Bases théoriques et applications expérimentales*. Lavoisier.
- Crujisen, J. (1996). *Physical stability of caseinate stabilized emulsions during heating*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Physical-stability-of-caseinate-stabilized-during-Crujisen/c3f9667b19cabb06e41f5d17672840074b37d3ca>
- Dalgleish, D. (2003). Food Emulsions : Their Structures And Properties. In S. Friberg, K. Larsson, & J. Sjöblom (Éds.), *Food Emulsions* (Vol. 132). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203913222.ch1>
- Dalle Zotte, A., Gleeson, E., Franco, D., Cullere, M., & Lorenzo, J. M. (2020). Proximate Composition, Amino Acid Profile, and Oxidative Stability of Slow-Growing Indigenous Chickens Compared with Commercial Broiler Chickens. *Foods*, 9(5), 546. <https://doi.org/10.3390/foods9050546>
- Damodaran, S. (2006). Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *Journal of Food Science*, 70(3), R54-R66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x>
- Damrongsakkul, S., Ratanathampan, K., Komolpis, K., & Tanthapanichakoon, W. (2008). Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14(2), 202-206. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2007.09.010>
- Dara, P. K., Geetha, A., Mohanty, U., Raghavankutty, M., Mathew, S., Chandragiri Nagarajarao, R., & Rangasamy, A. (2021). Extraction and Characterization of Myofibrillar Proteins from Different Meat Sources : A Comparative Study. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 6(4), 367-378. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2021.04.004>
- Dardevet, D., Mosoni, L., Savary-Auzeloux, I., Peyron, M.-A., Polakof, S., & Rémond, D. (2021). Important determinants to take into account to optimize protein nutrition in the elderly : Solutions to a complex equation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 80(2), 207-220. <https://doi.org/10.1017/S0029665120007934>
- Dardevet, D., Sornet, C., Balage, M., & Grizard, J. (2000). Stimulation of In Vitro Rat Muscle Protein Synthesis by Leucine Decreases with Age. *The Journal of Nutrition*, 130(11), 2630-2635. <https://doi.org/10.1093/jn/130.11.2630>

- Davies, M. G., & Thomas, A. J. (1973). An investigation of hydrolytic techniques for the amino acid analysis of foodstuffs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24(12), 1525-1540. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740241208>
- Davis, T. A., Burrin, D. G., Fiorotto, M. L., Reeds, P. J., & Jahoor, F. (1998). Roles of Insulin and Amino Acids in the Regulation of Protein Synthesis in the Neonate. *The Journal of Nutrition*, 128(2), 347S-350S. <https://doi.org/10.1093/jn/128.2.347S>
- Day, L., Cakebread, J. A., & Loveday, S. M. (2022). Food proteins from animals and plants : Differences in the nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 428-442. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.020>
- Deglaire, A., Bos, C., Tomé, D., & Moughan, P. J. (2009). Ileal digestibility of dietary protein in the growing pig and adult human. *British Journal of Nutrition*, 102(12), 1752-1759. <https://doi.org/10.1017/S0007114509991267>
- Delahaije, R. J. B. M., Gruppen, H., Giuseppin, M. L. F., & Wierenga, P. A. (2015). Towards predicting the stability of protein-stabilized emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 219, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.01.008>
- Delahaije, R. J. B. M., Hilgers, R. J., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2017). Relative contributions of charge and surface coverage on pH-induced flocculation of protein-stabilized emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 521, 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.10.043>
- Denis, A. (2009). *Method for obtaining proteins by treating adipose tissue* (EP2108266). <https://www.freepatentsonline.com/EP2108266.html>
- de Pee, S., & Bloem, M. W. (2009). Current and potential role of specially formulated foods and food supplements for preventing malnutrition among 6- to 23-month-old children and for treating moderate malnutrition among 6- to 59-month-old children. *Food and Nutrition Bulletin*, 30(3 Suppl), S434-463. <https://doi.org/10.1177/15648265090303S305>
- Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology*, 12(4), 214-219. <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>
- DeSesso, J. M., & Jacobson, C. F. (2001). Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and Chemical Toxicology*, 39(3), 209-228. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00136-8)
- Devatkal, S., Mendiratta, S. K., Kondaiah, N., Sharma, M. C., & Anjaneyulu, A. S. R. (2004). Physicochemical, functional and microbiological quality of buffalo liver. *Meat Science*, 68(1), 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.02.006>
- Devi, S., Varkey, A., Sheshshayee, M. S., Preston, T., & Kurpad, A. V. (2018). Measurement of protein digestibility in humans by a dual-tracer method. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 107(6), 984-991. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy062>
- de Vries-ten Have, J., Owolabi, A., Steijns, J., Kudla, U., & Melse-Boonstra, A. (2020). Protein intake adequacy among Nigerian infants, children, adolescents and women and protein quality of commonly consumed foods. *Nutrition Research Reviews*, 33(1), 102-120. <https://doi.org/10.1017/S0954422419000222>
- Dimina, L., Rémond, D., Huneau, J.-F., & Mariotti, F. (2022). Combining Plant Proteins to Achieve Amino Acid Profiles Adapted to Various Nutritional Objectives—An Exploratory Analysis Using Linear Programming. *Frontiers in Nutrition*, 8, 809685. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.809685>
- Drummond, L., Álvarez, C., & Mullen, A. M. (2019). Chapter 4—Proteins Recovery From Meat Processing Coproducts. In C. M. Galanakis (Éd.), *Sustainable Meat Production and Processing* (p. 69-83). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814874-7.00004-3>

- Duan, L., Li, J., Li, C., & Li, G. (2013). Effects of NaCl on the rheological behavior of collagen solution. *Korea-Australia Rheology Journal*, 25(3), 137-144. <https://doi.org/10.1007/s13367-013-0014-9>
- Duarte, R. T., Carvalho Simões, M. C., & Sgarbieri, V. C. (1999). Bovine Blood Components : Fractionation, Composition, and Nutritive Value. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 231-236. <https://doi.org/10.1021/jf9806255>
- Dupont, D., Alric, M., Blanquet-Diot, S., Bornhorst, G., Cueva, C., Deglaire, A., Denis, S., Ferrua, M., Havenaar, R., Lelieveld, J., Mackie, A. R., Marzorati, M., Menard, O., Minekus, M., Miralles, B., Recio, I., & Van den Abbeele, P. (2019). Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(10), 1546-1562. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1421900>
- Dupont, D., & Mackie, A. R. (2015). Static and dynamic in vitro digestion models to study protein stability in the gastrointestinal tract. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 17-18, 23-27. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2016.06.002>
- Eaton, J. C., Rothpletz-Puglia, P., Dreker, M. R., Iannotti, L., Lutter, C., Kaganda, J., & Rayco-Solon, P. (2019). Effectiveness of provision of animal-source foods for supporting optimal growth and development in children 6 to 59 months of age. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2019(2), CD012818. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012818.pub2>
- Elango, R., Levesque, C., Ball, R. O., & Pencharz, P. B. (2012). Available versus digestible amino acids – new stable isotope methods. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S306-S314. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002498>
- Elango, R., Rasmussen, B., & Madden, K. (2016). Safety and Tolerability of Leucine Supplementation in Elderly Men. *The Journal of Nutrition*, 146(12), 2630S-2634S. <https://doi.org/10.3945/jn.116.234930>
- Ertl, P., Knaus, W., & Zollitsch, W. (2016). An approach to including protein quality when assessing the net contribution of livestock to human food supply. *Animal*, 10(11), 1883-1889. <https://doi.org/10.1017/S1751731116000902>
- Eugenio, F. A., van Milgen, J., Duperray, J., Sergheraert, R., & Le Floch, N. (2023). Feeding pigs amino acids as protein-bound or in free form influences postprandial concentrations of amino acids, metabolites, and insulin. *Animal*, 17(1), 100684. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100684>
- Corrigendum to Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs., 226 OJ L (2004). <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/852/corrigendum/2004-06-25/oj/eng>
- Rectificatif au règlement (CE) n° 853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale (JO L 139 du 30.4.2004), 226 OJ L (2004). <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/853/corrigendum/2004-06-25/oj/fra>
- Règlement (CE) n° 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et abrogeant le règlement (CE) n° 1774/2002 (règlement relatif aux sous-produits animaux), 300 OJ L (2009). <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1069/oj/fra>
- Eustachio Colombo, P., Patterson, E., Schäfer Elinder, L., Lindroos, A. K., Sonesson, U., Darmon, N., & Parlesak, A. (2019). Optimizing School Food Supply : Integrating Environmental, Health, Economic, and Cultural Dimensions of Diet Sustainability with Linear Programming. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(17), 3019. <https://doi.org/10.3390/ijerph16173019>

- Fallingborg, J., Pedersen, P., & Jacobsen, B. A. (1998). Small intestinal transit time and intraluminal pH in ileocecal resected patients with Crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 43(4), 702-705. <https://doi.org/10.1023/a:1018893409596>
- FAO. (2013). *Dietary protein quality evaluation in human nutrition : Report of an FAO Expert Consultation, 31 March - 2 April 2011, Auckland, New Zealand*. FAO. <https://www.fao.org/documents/card/fr/c/ab5c9fca-dd15-58e0-93a8-d71e028c8282/>
- FAO. (2014). *Research approaches and methods for evaluating the protein quality of human foods : Report of a FAO Expert Working Group, 2 – 5 March 2014, Bangalore, India*. FAO. <https://www.fao.org/documents/card/fr/c/5fa39b04-68bf-4dd7-bc44-3d1f249a6c5e/>
- FAO. (2018a). *Protein quality assessment in follow-up formula for young children and ready to use therapeutic foods : Report of the FAO Expert Working Group, Rome, 6–9 November 2017*. FAO. <https://www.fao.org/publications/card/en/c/CA2487EN/>
- FAO. (2018b). *The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050*. FAO. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/I8429EN>
- FAO, FIDA, OMS, PAM, & UNICEF. (2022). *L'État de la sécurité alimentaire et de la nutrition dans le monde 2022 : Réorienter les politiques alimentaires et agricoles pour rendre l'alimentation saine plus abordable*. FAO, IFAD, WHO, WFP, UNICEF. <https://doi.org/10.4060/cc0639fr>
- FAO, World Health Organization, & United Nation University. (2007). *Protein and amino acid requirements in human nutrition : Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43411>
- Fardet, A., Souchon, I., & Dupont, D. (2013). *Structure des aliments et effets nutritionnels*. Editions Quae.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Food and Drug Administration. (1993). *Food Labeling : Mandatory Status of Nutrition Labeling and Nutrient Content Revision- « True Protein Digestibility Value of Common Foods. »* Federal Register, Vol. 58, No. 3, 2193-2195.
- Fretheim, K., Egelandsdal, B., Harbitz, O., & Samejima, K. (1985). Slow lowering of pH induces gel formation of myosin. *Food Chemistry*, 18(3), 169-178. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(85\)90044-5](https://doi.org/10.1016/0308-8146(85)90044-5)
- Friedman, H. H., Whitney, J. E., & Szczesniak, A. S. (1963). The Texturometer—A New Instrument for Objective Texture Measurement. *Journal of Food Science*, 28(4), 390-396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1963.tb00216.x>
- Fudge, M., Coleman, R. E., & Parker, S. B. (2002). A minimally invasive percutaneous technique for jugular vein catheterization in pigs. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 41(1), 38-42.
- Fuller, M. F., & Tomé, D. (2005). In vivo determination of amino acid bioavailability in humans and model animals. *Journal of AOAC International*, 88(3), 923-934.
- Gaiani, C., Schuck, P., Scher, J., Desobry, S., & Banon, S. (2007). Dairy Powder Rehydration : Influence of Protein State, Incorporation Mode, and Agglomeration. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 570-581. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71540-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71540-0)
- Galanakis, C. M. (2018). *Sustainable Meat Production and Processing*. Academic Press.
- Gaudichon, C., & Calvez, J. (2021). Determinants of amino acid bioavailability from ingested protein in relation to gut health. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 24(1), 55-61. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000708>
- Gaudichon, C., Roos, N., Mahé, S., Sick, H., Bouley, C., & Tomé, D. (1994). Gastric emptying regulates the kinetics of nitrogen absorption from 15N-labeled milk and 15N-labeled yogurt in miniature pigs. *The Journal of Nutrition*, 124(10), 1970-1977. <https://doi.org/10.1093/jn/124.10.1970>

- Gawat, M. H., Mao, B., Singh, J., & Kaur, L. (2023). Chapter 3 - Food protein digestion and absorption : Current assessment protocols. In Z. F. Bhat, J. D. Morton, A. E.-D. A. Bekhit, & H. A. R. Suleria (Éds.), *Processing Technologies and Food Protein Digestion* (p. 51-80). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95052-7.00001-7>
- Gilani, S., Tomé, D., Moughan, P., & Burlingame, B. (2011). *The assessment of amino acid digestibility in foods for humans and including a collation of published ileal amino acid digestibility data for human foods. Report of a Sub-Committee of the 2011 FAO Consultation on "Protein Quality Evaluation in Human Nutrition"*. 58.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources : A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
- Grantham-McGregor, S. (1995). A Review of Studies of the Effect of Severe Malnutrition on Mental Development. *The Journal of Nutrition*, 125, 2233S-2238S. https://doi.org/10.1093/jn/125.suppl_8.2233S
- Grela, E. R., Kiczorowska, B., Samolińska, W., Matras, J., Kiczorowski, P., Rybiński, W., & Hanczakowska, E. (2017). Chemical composition of leguminous seeds : Part I—content of basic nutrients, amino acids, phytochemical compounds, and antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 243(8), 1385-1395. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2849-7>
- Gropper, S. A. S., & Smith, J. L. (2013). *Advanced nutrition and human metabolism* (Sixth edition). Wadsworth/Cengage Learning.
- Grujić, R., Grujić, R., Savanović, D., & Savanović, D. (2018). Analysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins in pork meat by capillary gel electrophoresis. *Foods and Raw Materials*, 6(2), 421-428. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2018-2-421-428>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.001>
- Halling, P. J. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15(2), 155-203. <https://doi.org/10.1080/10408398109527315>
- Han, F., Han, F., Wang, Y., Fan, L., Song, G., Chen, X., Jiang, P., Miao, H., & Han, Y. (2019). Digestible indispensable amino acid scores of nine cooked cereal grains. *British Journal of Nutrition*, 121(1), 30-41. <https://doi.org/10.1017/S0007114518003033>
- Han, F., Moughan, P., Li, J., & Pang, S. (2020). Digestible Indispensable Amino Acid Scores (DIAAS) of Six Cooked Chinese Pulses. *Nutrients*, 12(12), 3831. <https://doi.org/10.3390/nu12123831>
- Hanani, Z. A. N. (2016). Gelatin. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Éds.), *Encyclopedia of Food and Health* (p. 191-195). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00347-0>
- Haug, I. J., Draget, K. I., & Smidsrød, O. (2004). Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18(2), 203-213. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00065-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00065-1)
- Hegarty, G., Bratzler, L., & Pearson, A. (1963). Studies on the Emulsifying Properties of Some Intracellular Beef Muscle Proteins. *Journal of Food Science*, 28, 663-668. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1963.tb01671.x>
- Hemung, B.-O., Benjakul, S., & Yongsawatdigul, J. (2013). PH-dependent characteristics of gel-like emulsion stabilized by threadfin bream sarcoplasmic proteins. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 315-322. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.023>
- Henchion, M., McCarthy, M., & O'Callaghan, J. (2016). Transforming Beef By-products into Valuable Ingredients : Which Spell/Recipe to Use? *Frontiers in Nutrition*, 0. <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00053>

- Hendriks, W. H., van Baal, J., & Bosch, G. (2012). Ileal and faecal protein digestibility measurement in humans and other non-ruminants—A comparative species view. *The British Journal of Nutrition*, *108 Suppl 2*, S247-257. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002395>
- Henriksen, K., & Karsdal, M. A. (2016). Chapter 1—Type I Collagen. In M. A. Karsdal (Éd.), *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin* (p. 1-11). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809847-9.00001-5>
- Henry, Y., Sève, B., Colléaux, Y., Ganier, P., Saligaut, C., & Jégo, P. (1992). Interactive effects of dietary levels of tryptophan and protein on voluntary feed intake and growth performance in pigs, in relation to plasma free amino acids and hypothalamic serotonin1. *Journal of Animal Science*, *70*(6), 1873-1887. <https://doi.org/10.2527/1992.7061873x>
- Hermansson, A.-M., Harbitz, O., & Langton, M. (1986). Formation of two types of gels from bovine myosin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *37*(1), 69-84. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740370111>
- Herreman, L., Nommensen, P., Pennings, B., & Laus, M. C. (2020). Comprehensive overview of the quality of plant- And animal-sourced proteins based on the digestible indispensable amino acid score. *Food Science & Nutrition*, *8*(10), 5379-5391. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1809>
- Herrero, A. M., de la Hoz, L., Ordóñez, J. A., Herranz, B., Romero de Ávila, M. D., & Cambero, M. I. (2008). Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, *80*(3), 690-696. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.03.008>
- Himashree, P., Sengar, A. S., & Sunil, C. K. (2022). Food thickening agents : Sources, chemistry, properties and applications - A review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *27*, 100468. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2022.100468>
- Hodgkinson, S. M., Montoya, C. A., Scholten, P. T., Rutherford, S. M., & Moughan, P. J. (2018). Cooking Conditions Affect the True Ileal Digestible Amino Acid Content and Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS) of Bovine Meat as Determined in Pigs. *The Journal of Nutrition*, *148*(10), 1564-1569. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy153>
- Hodgkinson, S. M., Stroebinger, N., van der Wielen, N., Mensink, M., Montoya, C., Hendriks, W. H., de Vries, S., Stein, H. H., & Moughan, P. J. (2022). Comparison of True Ileal Amino Acid Digestibility between Adult Humans and Growing Pigs. *The Journal of Nutrition*, *152*(7), 1635-1646. <https://doi.org/10.1093/jn/nxac077>
- Holwerda, A. M., & van Loon, L. J. C. (2022). The impact of collagen protein ingestion on musculoskeletal connective tissue remodeling : A narrative review. *Nutrition Reviews*, *80*(6), 1497-1514. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuab083>
- Hou, Y., He, W., Hu, S., & Wu, G. (2019). Composition of polyamines and amino acids in plant-source foods for human consumption. *Amino Acids*, *51*(8), 1153-1165. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02751-0>
- Hrynets, Y., Omana, D. A., Xu, Y., & Betti, M. (2010). Effect of Acid- and Alkaline-Aided Extractions on Functional and Rheological Properties of Proteins Recovered from Mechanically Separated Turkey Meat (MSTM). *Journal of Food Science*, *75*(7), E477-E486. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01736.x>
- Hsu, J. W., Badaloo, A., Wilson, L., Taylor-Bryan, C., Chambers, B., Reid, M., Forrester, T., & Jahoor, F. (2014). Dietary Supplementation with Aromatic Amino Acids Increases Protein Synthesis in Children with Severe Acute Malnutrition1234. *The Journal of Nutrition*, *144*(5), 660-666. <https://doi.org/10.3945/jn.113.184523>
- Huck-Iriart, C., Álvarez-Cerimedo, M. S., Candal, R. J., & Herrera, M. L. (2011). Structures and stability of lipid emulsions formulated with sodium caseinate. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *16*(5), 412-420. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2011.06.003>

- Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat : The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71(1), 194-204. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.04.022>
- IDF. (1979). Determination of the dispersibility and wettability of instant dried milk. *International Dairy Federation, Brussels, Belgium*.
- Ishioroshi, M., Samejima, K., & Yasui, T. (1983). Heat-induced Gelation of Myosin Filaments at a Low Salt Concentration. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(12), 2809-2816. <https://doi.org/10.1080/00021369.1983.10866029>
- Jagger, S., Wiseman, J., Cole, D. J. A., & Craigon, J. (1992). Evaluation of inert markers for the determination of ileal and faecal apparent digestibility values in the pig. *British Journal of Nutrition*, 68(3), 729-739. <https://doi.org/10.1079/BJN19920129>
- Jahoor, F., Badaloo, A., Reid, M., & Forrester, T. (2005). Protein kinetic differences between children with edematous and nonedematous severe childhood undernutrition in the fed and postabsorptive states. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(4), 792-800. <https://doi.org/10.1093/ajcn/82.4.792>
- Jahoor, F., Badaloo, A., Reid, M., & Forrester, T. (2008). Protein metabolism in severe childhood malnutrition. *Annals of Tropical Paediatrics*, 28(2), 87-101. <https://doi.org/10.1179/146532808X302107>
- Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K., & Bawa, A. S. (2012). Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries : A review. *Journal of Food Science and Technology*, 49(3), 278-293. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0290-7>
- Jayawardena, S. R., Morton, J. D., Brennan, C. S., & Bekhit, A. E.-D. A. (2019). Utilisation of beef lung protein powder as a functional ingredient to enhance protein and iron content of fresh pasta. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(3), 610-618. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13927>
- Jeevithan, E., Bin, B., Yongshi, B., Yu, Z., Qingbo, Z., & Wu, W. (2014). Type II Collagen and Gelatin from Silvertip Shark (*Carcharhinus albimarginatus*) Cartilage : Isolation, Purification, Physicochemical and Antioxidant Properties. *Marine drugs*, 12, 3852-3873. <https://doi.org/10.3390/md12073852>
- Jin, Y., Wilde, P. J., Hou, Y., Wang, Y., Han, J., & Liu, W. (2022). An evolving view on food viscosity regulating gastric emptying. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1-17. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2024132>
- Jobling, A. (1994). Food proteins from red meat by-products. In B. J. F. Hudson (Éd.), *New and Developing Sources of Food Proteins* (p. 31-50). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2652-0_2
- Johnston-Banks, F. A. (1990). Gelatine. In P. Harris (Éd.), *Food Gels* (p. 233-289). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0755-3_7
- Jones, K. W. (1984). Protein Lipid Interactions in Processed Meats. *Proceedings of 37th Annual Reciprocal Meat Conference. American Meat Science Association*, 52-57.
- Juliano, P., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2010). Food Powders Flowability Characterization : Theory, Methods, and Applications. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 211-239. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124155>
- Kampman-van de Hoek, E., Jansman, A. J., van den Borne, J. J., van der Peet-Schwering, C. M., van Beers-Schreurs, H., & Gerrits, W. J. (2016). Dietary Amino Acid Deficiency Reduces the Utilization of Amino Acids for Growth in Growing Pigs after a Period of Poor Health^{1, 2, 3}. *The Journal of Nutrition*, 146(1), 51-58. <https://doi.org/10.3945/jn.115.216044>

- Kar, B. R., Rao, S. L., & Chandramouli, B. A. (2008). Cognitive development in children with chronic protein energy malnutrition. *Behavioral and Brain Functions: BBF*, 4, 31. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-4-31>
- Khalid, I. I., Elhardallou, S. B., & Gubouri, A. A. (2016). Amino Acid Composition and Physicochemical Properties of Bitter Lupine (*Lupinus termis*) Seed Flour. *Oriental Journal of Chemistry*, 32(6), 3175-3182.
- Kijowski, J. (2001). Muscle proteins. In *Chemical and Functional Properties of Food Proteins* (p. 233-269). Zdzistaw E. Sikorski editors.
- Kinsella, J. E., & Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods : A survey. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7(3), 219-280. <https://doi.org/10.1080/10408397609527208>
- Kinsella, J. E., & Morr, C. V. (1984). Milk proteins : Physicochemical and functional properties. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21(3), 197-262. <https://doi.org/10.1080/10408398409527401>
- Kong, F., & Singh, R. P. (2008). Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of Food Science*, 73(5), R67-80. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x>
- Koocheki, A., Ghandi, A., Razavi, S. M. A., Mortazavi, S. A., & Vasiljevic, T. (2009). The rheological properties of ketchup as a function of different hydrocolloids and temperature. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(3), 596-602. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01868.x>
- Kurt, Ş., & Zorba, Ö. (2007). Emulsion Characteristics of Beef and Sheep Offal. *Journal of Muscle Foods*, 18(2), 129-142. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2007.00072.x>
- Lacroix, M., Bos, C., Léonil, J., Airinei, G., Luengo, C., Daré, S., Benamouzig, R., Fouillet, H., Fauquant, J., Tomé, D., & Gaudichon, C. (2006). Compared with casein or total milk protein, digestion of milk soluble proteins is too rapid to sustain the anabolic postprandial amino acid requirement23. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(5), 1070-1079. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.5.1070>
- Lafarga, T., Álvarez, C., & Hayes, M. (2017). Bioactive peptides derived from bovine and porcine co-products : A review. *Journal of Food Biochemistry*, 41(6), e12418. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12418>
- Lai, G., Li, Y., & Li, G. (2008). Effect of concentration and temperature on the rheological behavior of collagen solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(3), 285-291. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.12.010>
- Laser-Reuterswård, A., Asp, N.-G., Björck, I., & Rudéus, H. (1982). Effect of collagen content and heat treatment on protein digestibility and biological value of meat products. *International Journal of Food Science & Technology*, 17(1), 115-123. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb00166.x>
- Lau, M. H., Tang, J., & Paulson, A. T. (2000). Texture profile and turbidity of gellan/gelatin mixed gels. *Food Research International*, 33(8), 665-671. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00111-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00111-3)
- Le Foll, R., Lechevalier, V., Hamon, P., Guérin-Dubiard, C., Lambert, X., Deglaire, A., & Nau, F. (2024). Beef protein ingredients from fat rendering process are promising functional ingredients. *Food Chemistry*, 433, 137298. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137298>
- Lê, S., Josse, J., & Husson, F. (2008). FactoMineR : An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, 25, 1-18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Lechevalier, V., Jeantet, R., Arhaliass, A., Legrand, J., & Nau, F. (2007). Egg white drying : Influence of industrial processing steps on protein structure and functionalities. *Journal of Food Engineering*, 83, 404-413. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.03.033>

- Leeuwen, P., Kleef, D. J., Kempen, G. J. M., Huisman, J., & Verstegen, M. W. A. (1991). The Post Valve T-Caecum cannulation technique in pigs applicated to determine the digestibility of amino acid in maize, groundnut and sunflower meal. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 65(1-5), 183-193. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1991.tb00256.x>
- Levesque, C. L., Moehn, S., Pencharz, P. B., & Ball, R. O. (2010). Review of advances in metabolic bioavailability of amino acids. *Livestock Science*, 133(1), 4-9. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.06.013>
- Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (1996). Functional Properties of Veal Bone Hydrolysates. *Journal of Food Science*, 61(4), 712-716. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb12187.x>
- Liu, J., Klebach, M., Visser, M., & Hofman, Z. (2019). Amino Acid Availability of a Dairy and Vegetable Protein Blend Compared to Single Casein, Whey, Soy, and Pea Proteins : A Double-Blind, Cross-Over Trial. *Nutrients*, 11(11), 2613. <https://doi.org/10.3390/nu11112613>
- Loveday, S. M. (2019). Food Proteins : Technological, Nutritional, and Sustainability Attributes of Traditional and Emerging Proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1), 311-339. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121128>
- Lu, Y., Kang, W., Jiang, J., Chen, J., Xu, D., Zhang, P., Zhang, L., Feng, H., & Wu, H. (2017). Study on the stabilization mechanism of crude oil emulsion with an amphiphilic polymer using the β -cyclodextrin inclusion method. *RSC Adv.*, 7, 8156-8166. <https://doi.org/10.1039/C6RA28528G>
- Lynch, S. A., Álvarez, C., O'Neill, E. E., Keenan, D. F., & Mullen, A. M. (2018). Optimization of protein recovery from bovine lung by pH shift process using response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(5), 1951-1960. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8678>
- Lynch, S. A., Mullen, A. M., O'Neill, E., Drummond, L., & Álvarez, C. (2018). Opportunities and perspectives for utilisation of co-products in the meat industry. *Meat Science*, 144, 62-73. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.019>
- Lynch, S., Mullen, A., O'Neill, E., & Álvarez, C. (2017). Harnessing the Potential of Blood Proteins as Functional Ingredients : A Review of the State of the Art in Blood Processing: Blood processing and food applications.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12254>
- Ma, C.-Y., & Harwalkar, V. R. (1991). Thermal Analysis of Food Proteins. In J. E. Kinsella (Éd.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 35, p. 317-366). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(08\)60067-4](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60067-4)
- Ma, X., & Chatterton, D. E. W. (2021). Strategies to improve the physical stability of sodium caseinate stabilized emulsions: A literature review. *Food Hydrocolloids*, 119, 106853. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106853>
- Macfarlane, J. J., Schmidt, G. R., & Turner, R. H. (1977). Binding of Meat Pieces : A Comparison of Myosin, Actomyosin and Sarcoplasmic Proteins as Binding Agents. *Journal of Food Science*, 42(6), 1603-1605. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb08437.x>
- Magkos, F., Wang, X., & Mittendorfer, B. (2010). Metabolic actions of insulin in men and women. *Nutrition*, 26(7), 686-693. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.10.013>
- Mahan, D. C., & Shields, R. G., Jr. (1998). Essential and nonessential amino acid composition of pigs from birth to 145 kilograms of body weight, and comparison to other studies. *Journal of Animal Science*, 76(2), 513-521. <https://doi.org/10.2527/1998.762513x>
- Malva, A. della, Albenzio, M., Santillo, A., Russo, D., Figliola, L., Caroprese, M., & Marino, R. (2018). Methods for Extraction of Muscle Proteins from Meat and Fish Using Denaturing and Nondenaturing Solutions. *Journal of Food Quality*, 2018, e8478471. <https://doi.org/10.1155/2018/8478471>

- Marcotte, M., Taherian Hoshahili, A. R., & Ramaswamy, H. S. (2001). Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. *Food Research International*, 34(8), 695-703. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00091-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00091-6)
- Marinangeli, C. P. F., & House, J. D. (2017). Potential impact of the digestible indispensable amino acid score as a measure of protein quality on dietary regulations and health. *Nutrition Reviews*, 75(8), 658-667. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux025>
- Marín-García, P. J., Llobat, L., López-Lujan, M. C., Cambra-López, M., Blas, E., & Pascual, J. J. (2022). Urea Nitrogen Metabolite Can Contribute to Implementing the Ideal Protein Concept in Monogastric Animals. *Animals*, 12(18), 2344. <https://doi.org/10.3390/ani12182344>
- Mariotti, F., Tomé, D., & Mirand, P. P. (2008). Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(2), 177-184. <https://doi.org/10.1080/10408390701279749>
- Mat, D. J. L., Le Feunteun, S., Michon, C., & Souchon, I. (2016). 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*, 88, 226-233. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.002>
- Mathai, J. K., Liu, Y., & Stein, H. H. (2017). Values for digestible indispensable amino acid scores (DIAAS) for some dairy and plant proteins may better describe protein quality than values calculated using the concept for protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS). *British Journal of Nutrition*, 117(4), 490-499. <https://doi.org/10.1017/S0007114517000125>
- Matinong, A. M. E., Chisti, Y., Pickering, K. L., & Haverkamp, R. G. (2022). Collagen Extraction from Animal Skin. *Biology*, 11(6), 905. <https://doi.org/10.3390/biology11060905>
- McClements, D. J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(5), 305-313. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.003>
- McClements, D. J. (2007). Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, 47, 611-649. <https://doi.org/10.1080/10408390701289292>
- McClements, D. J. (2015). *Food Emulsions : Principles, Practices, and Techniques, Third Edition* (3^e éd.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18868>
- Meeker, D. L., & Hamilton, C. R. (2006). An overview of the rendering industry. *Essential Rendering. Meeker (Ed). National Renderers Association*, 17.
- Melcion, J. P. (2000). La granulométrie de l'aliment : Principe, mesure et obtention. *INRAE Productions Animales*, 13(2), 2. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2000.13.2.3770>
- Menard, O., Lesmes, U., Shani-Levi, C. S., Calahorra, A. A., Lavoisier, A., Morzel, M., Rieder, A., Feron, G., Nebbia, S., Mashiah, L., Andres, A., Bornhorst, G., Carrière, F., Egger, L., Gwala, S., Heredia, A., Kirkhus, B., Macierzanka, A., Portman, R., ... Dupont, D. (2023). Static in vitro digestion model adapted to the general older adult population : An INFOGEST international consensus. *Food & Function*, 14(10), 4569-4582. <https://doi.org/10.1039/D3FO00535F>
- Mengual, O., Meunier, G., Cayre, I., Puech, K., & Snabre, P. (1999). Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser : The TURBISCAN MA 1000. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152(1), 111-123. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00680-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00680-3)
- Micha, P. (2011). *Physical properties of food powders*. <https://www.semanticscholar.org/paper/PHYSICAL-PROPERTIES-OF-FOOD-POWDERS-Micha/f024a05b638bb155c630ede3d6d8e0711f55f7dd>
- Michon, C., Cuvelier, G., & Launay, B. (1993). Concentration dependence of the critical viscoelastic properties of gelatin at the gel point. *Rheologica Acta*, 32(1), 94-103. <https://doi.org/10.1007/BF00396681>

- Milan, A. M., Samuelsson, L. M., Shrestha, A., Sharma, P., Day, L., & Cameron-Smith, D. (2020). Circulating Branched Chain Amino Acid Concentrations Are Higher in Dairy-Avoiding Females Following an Equal Volume of Sheep Milk Relative to Cow Milk : A Randomized Controlled Trial. *Frontiers in Nutrition*, 7, 553674. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.553674>
- Millward, D. J. (1999). The nutritional value of plant-based diets in relation to human amino acid and protein requirements. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 58(2), 249-260. <https://doi.org/10.1017/s0029665199000348>
- Millward, D. J., Layman, D. K., Tomé, D., & Schaafsma, G. (2008). Protein quality assessment : Impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health1. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5), 1576S-1581S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.5.1576S>
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodtkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—An international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113-1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Mokrejš, P., Gál, R., Pavlačková, J., & Janáčková, D. (2021). Valorization of a By-Product from the Production of Mechanically Deboned Chicken Meat for Preparation of Gelatins. *Molecules*, 26(2), 2. <https://doi.org/10.3390/molecules26020349>
- Mondino, A., Bongiovanni, G., Fumero, S., & Rossi, L. (1972). An improved method of plasma deproteination with sulphosalicylic acid for determining amino acids and related compounds. *Journal of Chromatography A*, 74(2), 255-263. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)86154-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)86154-9)
- Montgomery, D. C. (2013). *Design and analysis of experiments* (Eighth edition). John Wiley & Sons, Inc.
- Montoya, C. A., Rutherford, S. M., Olson, T. D., Purba, A. S., Drummond, L. N., Boland, M. J., & Moughan, P. J. (2014). Actinidin from kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) increases the digestion and rate of gastric emptying of meat proteins in the growing pig. *The British Journal of Nutrition*, 111(6), 957-967. <https://doi.org/10.1017/S0007114513003401>
- Moore, Stanford., Spackman, D. H., & Stein, W. H. (1958). Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins. An Improved System. *Analytical Chemistry*, 30(7), 1185-1190. <https://doi.org/10.1021/ac60139a005>
- Mosca, A. C., & Chen, J. (2016). Food oral management : Physiology and objective assessment. *Current Opinion in Food Science*, 9, 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.03.003>
- Moughan, P. J. (2003). Amino acid availability: Aspects of chemical analysis and bioassay methodology. *Nutrition Research Reviews*, 16(2), 127-141. <https://doi.org/10.1079/NRR200365>
- Mudunkotuwa, I. A., Anthony, T. R., Grassian, V. H., & Peters, T. M. (2016). Accurate quantification of tio2 nanoparticles collected on air filters using a microwave-assisted acid digestion method. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 13(1), 30-39. <https://doi.org/10.1080/15459624.2015.1072278>
- Mujumdar, A. S. (2014). *Handbook of Industrial Drying, Fourth Edition*. CRC Press.
- Mulet-Cabero, A.-I., Egger, L., Portmann, R., Ménard, O., Marze, S., Minekus, M., Le Feunteun, S., Sarkar, A., Grundy, M. M.-L., Carrière, F., Golding, M., Dupont, D., Recio, I., Brodtkorb, A., & Mackie, A. (2020). A standardised semi-dynamic *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 11(2), 1702-1720. <https://doi.org/10.1039/C9FO01293A>
- Mullen, A. M., & Álvarez, C. (2016). Offal : Types and Composition. In *Encyclopedia of Food and Health* (p. 152-157). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00501-8>

- Mullen, A. M., Álvarez, C., Zeugolis, D. I., Henchion, M., O'Neill, E., & Drummond, L. (2017). Alternative uses for co-products : Harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains. *Meat Science*, *132*, 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.243>
- Musse, M., Le Feunteun, S., Collewet, G., Ravilly, M., Quellec, S., Ossemond, J., Morzel, M., Challos, S., Nau, F., & Lucas, T. (2023). Quantitative magnetic resonance imaging of in vitro gastrointestinal digestion of a bread and cheese meal. *Food Research International*, *169*, 112821. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112821>
- Nair, M. N., Li, S., Beach, C. M., Rentfrow, G., & Suman, S. P. (2017). Changes in the Sarcoplasmic Proteome of Beef Muscles with Differential Color Stability during Postmortem Aging. *Meat and Muscle Biology*, *2*(1), 1. <https://doi.org/10.22175/mmb2017.07.0037>
- Nath, P. C., Debnath, S., Sridhar, K., Inbaraj, B. S., Nayak, P. K., & Sharma, M. (2023). A Comprehensive Review of Food Hydrogels: Principles, Formation Mechanisms, Microstructure, and Its Applications. *Gels*, *9*(1), 1. <https://doi.org/10.3390/gels9010001>
- National Research Council. (2012). *Nutrient Requirements of Swine : Eleventh Revised Edition*. <https://doi.org/10.17226/13298>
- Neumann, C., Bwibo, N. O., Gewa, C., & Drorbaugh, N. (2014). Animal source foods as a food-based approach to improve diet and nutrition outcomes. *Improving Diets and Nutrition: Food-based Approaches*, 157-172. <https://doi.org/10.1079/9781780642994.0157>
- Neumann, C. G., Murphy, S. P., Gewa, C., Grillenberger, M., & Bwibo, N. O. (2007). Meat Supplementation Improves Growth, Cognitive, and Behavioral Outcomes in Kenyan Children. *The Journal of Nutrition*, *137*(4), 1119-1123. <https://doi.org/10.1093/jn/137.4.1119>
- Nørgaard, J. V., Florescu, I. C., Krogh, U., & Nielsen, T. S. (2021). Amino Acid Absorption Profiles in Growing Pigs Fed Different Protein Sources. *Animals*, *11*(6), 1740. <https://doi.org/10.3390/ani11061740>
- Nosworthy, M. G., Neufeld, J., Frohlich, P., Young, G., Malcolmson, L., & House, J. D. (2017). Determination of the protein quality of cooked Canadian pulses. *Food Science & Nutrition*, *5*(4), 896-903. <https://doi.org/10.1002/fsn3.473>
- Nowson, C., & O'Connell, S. (2015). Protein Requirements and Recommendations for Older People : A Review. *Nutrients*, *7*(8), 6874-6899. <https://doi.org/10.3390/nu7085311>
- Nuss, E. T., & Tanumihardjo, S. A. (2011). Quality protein maize for Africa : Closing the protein inadequacy gap in vulnerable populations. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, *2*(3), 217-224. <https://doi.org/10.3945/an.110.000182>
- Oberli, M., Marsset-Baglieri, A., Airinei, G., Santé-Lhoutellier, V., Khodorova, N., Rémond, D., Foucault-Simonin, A., Piedcoq, J., Tomé, D., Fromentin, G., Benamouzig, R., & Gaudichon, C. (2015). High True Ileal Digestibility but Not Postprandial Utilization of Nitrogen from Bovine Meat Protein in Humans Is Moderately Decreased by High-Temperature, Long-Duration Cooking. *The Journal of Nutrition*, *145*(10), 2221-2228. <https://doi.org/10.3945/jn.115.216838>
- OECD & FAO. (2022). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031*. OECD. <https://doi.org/10.1787/f1b0b29c-en>
- O'Flaherty, E. A. A., Tsermoula, P., O'Neill, E. E., & O'Brien, N. M. (2019). Co-products of beef processing enhance non-haem iron absorption in an in vitro digestion/caco-2 cell model. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(4), 1256-1264. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14049>
- Olivares, M., Peirotti, M., & Deiber, J. (2006). Analysis of gelatin chain aggregation in dilute aqueous solutions through viscosity data. *Food Hydrocolloids*, *20*, 1039-1049. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.10.019>
- Osorio, F. A., Bilbao, E., Bustos, R., & Alvarez, F. (2007). Effects of Concentration, Bloom Degree, and pH on Gelatin Melting and Gelling Temperatures Using Small Amplitude Oscillatory

- Rheology. *International Journal of Food Properties*, 10(4), 841-851. <https://doi.org/10.1080/10942910601128895>
- Pang, Z., Deeth, H., Sopade, P., Sharma, R., & Bansal, N. (2014). Rheology, texture and microstructure of gelatin gels with and without milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 35, 484-493. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.007>
- Parés, D., Toldrà, M., Camps, E., Geli, J., Sagner, E., & Carretero, C. (2020). RSM Optimization for the Recovery of Technofunctional Protein Extracts from Porcine Hearts. *Foods*, 9(12), 1733. <https://doi.org/10.3390/foods9121733>
- Pearce, K. L., Rosenvold, K., Andersen, H. J., & Hopkins, D. L. (2011). Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes—A review. *Meat Science*, 89(2), 111-124. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.007>
- Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins : Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 716-723. <https://doi.org/10.1021/jf60217a041>
- Pearson, A. M., & Young, R. B. (1989). *Muscle and Meat Biochemistry*. Academic Press.
- Pennings, B., Groen, B. B. L., van Dijk, J.-W., de Lange, A., Kiskini, A., Kuklinski, M., Senden, J. M. G., & van Loon, L. J. C. (2013). Minced beef is more rapidly digested and absorbed than beef steak, resulting in greater postprandial protein retention in older men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(1), 121-128. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.051201>
- Pereira, P. M. de C. C., & Vicente, A. F. dos R. B. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, 93(3), 586-592. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.018>
- Phillips, L. G., Whitehead, D. M., & Kinsella, J. (1994). *Structure–Function Properties of Food Proteins*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02425-8>
- Phillips, S. M. (2017). Current Concepts and Unresolved Questions in Dietary Protein Requirements and Supplements in Adults. *Frontiers in Nutrition*, 4, 13. <https://doi.org/10.3389/fnut.2017.00013>
- Pion, R., & Belsunce, C. de. (1963). Composition en acides aminés de quelques farines de viande et sous-produits animaux. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, 3(Hors-série 1), 65-65. <https://doi.org/10.1051/rnd:19630511>
- Polhemus, D. N. W. (2005). How To : Perform an Optimization Experiment Using STATGRAPHICS Centurion. *StatPoint*.
- Potani, I., Spiegel-Feld, C., Brix, G., Bendabenda, J., Siegfried, N., Bandsma, R. H. J., Briend, A., & Daniel, A. I. (2021). Ready-to-Use Therapeutic Food (RUTF) Containing Low or No Dairy Compared to Standard RUTF for Children with Severe Acute Malnutrition : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Advances in Nutrition*, 12(5), 1930-1943. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab027>
- Prokop, W. H. (1985). Rendering systems for processing animal by-product materials. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62(4), 805-811. <https://doi.org/10.1007/BF03028757>
- R Core Development Team. (2020). *R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/.* (4.0.0) [R]. <https://www.R-project.org/>.
- Rahman, M. S., & Al-Mahrouqi, A. I. (2009). Instrumental texture profile analysis of gelatin gel extracted from grouper skin and commercial (bovine and porcine) gelatin gels. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(sup7), 229-242. <https://doi.org/10.1080/09637480902984414>

- Rasnani, N. M., & Mirhosseini, H. (2011). Effect of pH on physicochemical properties and stability of sodium caseinate-pectin stabilized emulsion. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 9(1), 129-135. <https://doi.org/10.1234/4.2011.1921>
- Rémond, D. (2019). Les protéines de la viande, intérêt pour la nutrition des seniors. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 13(3), 252-256. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(19\)30070-7](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(19)30070-7)
- Rémond, D., Machebeuf, M., Yven, C., Buffière, C., Mioche, L., Mosoni, L., & Mirand, P. P. (2007). Postprandial whole-body protein metabolism after a meat meal is influenced by chewing efficiency in elderly subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(5), 1286-1292. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1286>
- Rémond, D., Shahar, D. R., Gille, D., Pinto, P., Kachal, J., Peyron, M.-A., Dos Santos, C. N., Walther, B., Bordoni, A., Dupont, D., Tomás-Cobos, L., & Vergères, G. (2015). Understanding the gastrointestinal tract of the elderly to develop dietary solutions that prevent malnutrition. *Oncotarget*, 6(16), 13858-13898.
- Rérat, A., Chayvialle, J. A., Kandé, J., Vaissade, P., Vaugelade, P., & Bourrier, T. (1985). Metabolic and hormonal effects of test meals with various protein contents in pigs. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 63(12), 1547-1559. <https://doi.org/10.1139/y85-255>
- Réséda. (2017). *Gisements et valorisations des coproduits des industries agroalimentaires*. (p. 121).
- Réséda, & ADEME. (2008). *Enquête sur les gisements et la valorisation des coproduits issus de l'agro-industrie*. (p. 164).
- Romero de Ávila, D., Cambero, I., Ordóñez, J. A., de la Hoz, L., & Herrero, A. M. (2014). Rheological behaviour of commercial cooked meat products evaluated by tensile test and texture profile analysis (TPA). *Meat Science*, 98(2), 310-315. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.003>
- Rondeau, P., & Bourdon, E. (2011). The glycation of albumin: Structural and functional impacts. *Biochimie*, 93(4), 645-658. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.12.003>
- Roy, B. C., Omana, D. A., Betti, M., & Bruce, H. L. (2017). Extraction and Characterization of Gelatin from Bovine Lung. *Food Science and Technology Research*, 23(2), 255-266. <https://doi.org/10.3136/fstr.23.255>
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1960). The Principles of Humane Experimental Technique. *Medical Journal of Australia*, 1(13), 500-500. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x>
- Sadaka, C. (2011). *Composition chimique et intérêt nutritionnel de la viande de bœuf à partir de l'analyse des données INRA 2007 pour le Centre d'Informations des Viandes* (p. 89) [Other, Centre d'information des viandes, 207 rue de Bercy, 75587 Paris cedex 12]. <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01076976>
- Saha, D., & Bhattacharya, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: A critical review. *Journal of food science and technology*, 47(6), 587-597. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0162-6>
- Sangnim, T., Sriamornsak, P., Singh, I., & Huanbutta, K. (2021). Swallowing Gel for Patients with Dysphagia: A Novel Application of Chitosan. *Gels*, 7(3), 108. <https://doi.org/10.3390/gels7030108>
- Santé-Lhoutellier, V., Astruc, T., Daudin, J.-D., Kondjoyan, A., Scislawski, V., Duchène, C., Gaudichon, C., & Rémond, D. (2017). *Digestion des protéines des viandes en fonction de la cuisson*. La revue Viandes et produits carnés, articles scientifiques. <https://www.viandesetproduitscarnes.com:443/index.php/fr/854-digestion-des-protéines-des-viandes-en-fonction-de-la-cuisson>
- Sase, H., Watanabe, M., Arai, S., & Ogawa, Y. (1987). Functional and Sensory Properties of Meat Emulsions Produced by using Enzymatically Modified Gelatin. *Journal of Food Science*, 52(4), 893-895. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb14236.x>

- Sathe, S. K. (2012). Chemistry and Implications of Antinutritional Factors in Dry Beans and Pulses. In *Dry Beans and Pulses Production, Processing and Nutrition* (p. 359-377). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118448298.ch15>
- Schmidt, H., Komerowski, M. R., Steemburgo, T., & de Oliveira, V. R. (2021). Influence of thickening agents on rheological properties and sensory attributes of dysphagic diet. *Journal of Texture Studies*, 52(5-6), 587-602. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12596>
- Schuck, P., Davenel, A., Mariette, F., Briard, V., Méjean, S., & Piot, M. (2002). Rehydration of casein powders: Effects of added mineral salts and salt addition methods on water transfer. *International Dairy Journal*, 12(1), 51-57. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00090-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00090-5)
- Schuck, P., Dolivet, A., & Jeantet, R. (2012). *Analytical Methods for Food and Dairy Powders*. John Wiley and Sons. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01209392>
- Selmane, D., Vial, C., & Djelveh, G. (2010). Production and functional properties of beef lung protein concentrates. *Meat Science*, 84(3), 315-322. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.03.007>
- Sha, X.-M., Hu, Z.-Z., Ye, Y.-H., Xu, H., & Tu, Z.-C. (2019). Effect of extraction temperature on the gelling properties and identification of porcine gelatin. *Food Hydrocolloids*, 92, 163-172. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.059>
- Sherman, P. (1995). A critique of some methods proposed for evaluating the emulsifying capacity and emulsion stabilizing performance of vegetable proteins. *Italian Journal of Food Science*. <https://www.semanticscholar.org/paper/A-critique-of-some-methods-proposed-for-evaluating-Sherman/6456b8ca101c7de00d9229d9d7890f621e4465d3>
- Shirsath, A. P., & Henchion, M. M. (2021). Bovine and ovine meat co-products valorisation opportunities: A systematic literature review. *Trends in Food Science & Technology*, 118, 57-70. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.015>
- SifCO. (2021). *Rapport d'activité 2021* (p. 44). <https://www.sifco.fr/news/rapport-dactivite-2021>
- Sikorski, Z. E. (2001). *Chemical and Functional Properties of Food Proteins*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781482279047>
- Silvester, K. R., & Cummings, J. H. (1995). Does digestibility of meat protein help explain large bowel cancer risk? *Nutrition and Cancer*, 24(3), 279-288. <https://doi.org/10.1080/01635589509514417>
- Silvipriya, K., Kumar, K., Bhat, A., Kumar, B., John, A., & Lakshmanan, P. (2015). Collagen: Animal Sources and Biomedical Application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 123-127. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50322>
- Singh, H., & Gallier, S. (2014). Chapter 2—Processing of Food Structures in the Gastrointestinal Tract and Physiological Responses. In M. Boland, M. Golding, & H. Singh (Éds.), *Food Structures, Digestion and Health* (p. 51-81). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404610-8.00002-5>
- Sojoudi, A., & C. Saha, S. (2013). Shear Thinning and Shear Thickening Non-Newtonian Confined Fluid Flow over Rotating Cylinder. *American Journal of Fluid Dynamics*, 2(6), 117-121. <https://doi.org/10.5923/j.ajfd.20120206.04>
- Song, D.-H., Ham, Y.-K., Noh, S.-W., Chin, K. B., & Kim, H.-W. (2020). Evaluation of NaCl and KCl Salting Effects on Technological Properties of Pre- and Post-Rigor Chicken Breasts at Various Ionic Strengths. *Foods*, 9(6), 721. <https://doi.org/10.3390/foods9060721>
- Song, S., Li, S., Fan, L., Hayat, K., Xiao, Z., Chen, L., & Tang, Q. (2016). A novel method for beef bone protein extraction by lipase-pretreatment and its application in the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 208, 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.062>
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering*. Freeman Press.
- Stein, H. H., Fuller, M. F., Moughan, P. J., Sève, B., Mosenthin, R., Jansman, A. J. M., Fernández, J. A., & de Lange, C. F. M. (2007). Definition of apparent, true, and standardized ileal digestibility

- of amino acids in pigs. *Livestock Science*, 109(1), 282-285. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.01.019>
- Struijk, E. A., Banegas, J. R., Rodríguez-Artalejo, F., & Lopez-Garcia, E. (2018). Consumption of meat in relation to physical functioning in the Seniors-ENRICA cohort. *BMC Medicine*, 16(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1036-4>
- Sun, X. D., & Holley, R. A. (2011). Factors Influencing Gel Formation by Myofibrillar Proteins in Muscle Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(1), 33-51. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00137.x>
- Surh, J. (2009). Comparison of Emulsion-stabilizing Property between Sodium Caseinate and Whey Protein Concentrate : Susceptibility to Changes in Protein Concentration and pH. *Milk Protein*.
- Suwareh, O., Causeur, D., Jardin, J., Briard-Bion, V., Le Feunteun, S., Pezenec, S., & Nau, F. (2021). Statistical modeling of in vitro pepsin specificity. *Food Chemistry*, 362, 130098. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130098>
- Szwiega, S., Pencharz, P. B., Rafii, M., Lebaron, M., Chang, J., Ball, R. O., Kong, D., Xu, L., Elango, R., & Courtney-Martin, G. (2021). Dietary leucine requirement of older men and women is higher than current recommendations. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 113(2), 410-419. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa323>
- Tcholakova, S., Denkov, N. D., Sidzhakova, D., Ivanov, I. B., & Campbell, B. (2003). Interrelation between Drop Size and Protein Adsorption at Various Emulsification Conditions. *Langmuir*, 19(14), 5640-5649. <https://doi.org/10.1021/la034411f>
- Tessier, R., Calvez, J., Airinei, G., Khodorova, N., Kapel, R., Quinsac, A., Galet, O., Piedcoq, J., Benamouzig, R., Tomé, D., & Gaudichon, C. (2022). The True Amino Acid Digestibility of ¹⁵N-Labelled Sunflower Biscuits Determined with Ileal Balance and Dual Isotope Methods in Healthy Humans. *The Journal of Nutrition*, 152(3), 698-706. <https://doi.org/10.1093/jn/nxab423>
- Tessier, R., Calvez, J., & Gaudichon, C. (2021). Les « dessous » du PD-CAAS et du DIAAS, deux critères en apparence simples de qualité nutritionnelle des protéines. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 56(2), 102-110. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2021.02.002>
- Toldrá, F., Aristoy, M.-C., Mora, L., & Reig, M. (2012). Innovations in value-addition of edible meat by-products. *Meat Science*, 92(3), 290-296. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.04.004>
- Toldrá, F., Mora, L., & Reig, M. (2016). New insights into meat by-product utilization. *Meat Science*, 120, 54-59. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.021>
- Toldrá, F., Reig, M., & Mora, L. (2021). Management of meat by- and co-products for an improved meat processing sustainability. *Meat Science*, 181, 108608. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108608>
- Toldrà, M., Parés, D., Saguer, E., & Carretero, C. (2019). Recovery and Extraction of Technofunctional Proteins from Porcine Spleen Using Response Surface Methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 12(2), 298-312. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2208-0>
- Tomé, D. (2013). Digestibility Issues of Vegetable versus Animal Proteins : Protein and Amino Acid Requirements—Functional Aspects. *Food and Nutrition Bulletin*, 34(2), 272-274. <https://doi.org/10.1177/156482651303400225>
- Tornberg, E., & Hermansson, A.-M. (1977). Functional Characterization of Protein Stabilized Emulsions : Effect of Processing. *Journal of Food Science*, 42(2), 468-472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb01524.x>
- Trommelen, J., Tomé, D., & van Loon, L. J. C. (2021). Gut amino acid absorption in humans : Concepts and relevance for postprandial metabolism. *Clinical Nutrition Open Science*, 36, 43-55. <https://doi.org/10.1016/j.nutos.2020.12.006>

- Troutt, E. S., Hunt, M. C., Johnson, D. E., Claus, J. R., Kastner, C. L., Kropf, D. H., & Stroda, S. (1992). Chemical, Physical, and Sensory Characterization of Ground Beef Containing 5 to 30 Percent Fat. *Journal of Food Science*, 57(1), 25-29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05416.x>
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, & Population Division. (2019). *World population prospects Highlights, 2019 revision*.
- van der Pols-Vijlbrief, R., Wijnhoven, H. A. H., Schaap, L. A., Terwee, C. B., & Visser, M. (2014). Determinants of protein–energy malnutrition in community-dwelling older adults : A systematic review of observational studies. *Ageing Research Reviews*, 18, 112-131. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.09.001>
- Vernooij, A. (2012). The return of animal by-product. *Rabobank Industry Note*, 355, 8.
- Walsh, C. (2014). The use of Animal By-products. *AHDB Beef & Lamb. EBLEX*. <https://doi.org/ArticleID:130514>
- Walter, T., Hertrampf, E., Pizarro, F., Olivares, M., Llaguno, S., Letelier, A., Vega, V., & Stekel, A. (1993). Effect of bovine-hemoglobin-fortified cookies on iron status of schoolchildren : A nationwide program in Chile. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(2), 190-194. <https://doi.org/10.1093/ajcn/57.2.190>
- Wang, X., Xia, M., Zhou, Y., Wang, L., Feng, X., Yang, K., Ma, J., Li, Z., Wang, L., & Sun, W. (2020). Gel properties of myofibrillar proteins heated at different heating rates under a low-frequency magnetic field. *Food Chemistry*, 321, 126728. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126728>
- Wu, G. (2009). Amino acids : Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37(1), 1-17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>
- Wu, G., Cross, H. R., Gehring, K. B., Savell, J. W., Arnold, A. N., & McNeill, S. H. (2016). Composition of free and peptide-bound amino acids in beef chuck, loin, and round cuts 1,2. *Journal of Animal Science*, 94(6), 2603-2613. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0478>
- Wu, P., Deng, R., Wu, X., Wang, Y., Dong, Z., Dhital, S., & Chen, X. D. (2017). In vitro gastric digestion of cooked white and brown rice using a dynamic rat stomach model. *Food Chemistry*, 237, 1065-1072. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.081>
- Wu, S., Fitzpatrick, J., Cronin, K., Maidannyk, V., & Miao, S. (2020). Effects of spraying surfactants in a fluidised bed on the rehydration behaviour of milk protein isolate powder. *Journal of Food Engineering*, 266, 109694. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109694>
- Wubben, J. E., Smiricky, M. R., Albin, D. M., & Gabert, V. M. (2001). Improved procedure and cannula design for simple-T cannulation at the distal ileum in growing pigs. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 40(6), 27-31.
- Wulansari, R., Mitchell, J. R., Blanshard, J. M. V., & Paterson, J. L. (1998). Why are gelatin solutions Newtonian? *Food Hydrocolloids*, 12(2), 245-249. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(98\)00038-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(98)00038-1)
- Xiao, Y., Liu, Y., Wang, Y., Jin, Y., Guo, X., Liu, Y., Qi, X., Lei, H., & Xu, H. (2020). Heat-induced whey protein isolate gels improved by cellulose nanocrystals : Gelling properties and microstructure. *Carbohydrate Polymers*, 231, 115749. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115749>
- Xiong, Y. L. (1994). Myofibrillar protein from different muscle fiber types : Implications of biochemical and functional properties in meat processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(3), 293-320. <https://doi.org/10.1080/10408399409527665>
- Xiong, Y. L. (2018). Muscle proteins. In *Proteins in Food Processing (Second Edition)* (p. 127-148). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00006-1>

- Yamane, K., Nakagawa, M., Altobelli, S. A., Tanaka, T., & Tsuji, Y. (1998). Steady particulate flows in a horizontal rotating cylinder. *Physics of Fluids*, *10*(6), 1419-1427. <https://doi.org/10.1063/1.869858>
- Yasui, T., Ishioroshi, M., & Samejima, K. (1980). Heat-Induced Gelation of Myosin in the Presence of Actin. *Journal of Food Biochemistry*, *4*(2), 61-78. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1980.tb00646.x>
- Yasui, T., & Samejima, K. (1990). *Recent Advances in Meat Science in Japan : Functionality of Muscle Proteins in Gelation Mechanism of Structured Meat Products*. 24, 10.
- Zayas, J. F. (1997). *Functionality of Proteins in Food*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-59116-7>
- Zhang, M., Zhao, D., Zhu, S., Nian, Y., Xu, X., Zhou, G., & Li, C. (2020). Overheating induced structural changes of type I collagen and impaired the protein digestibility. *Food Research International*, *134*, 109225. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109225>
- Zhang, Z., Yang, Y., Tang, X., Chen, Y., & You, Y. (2015). Chemical forces and water holding capacity study of heat-induced myofibrillar protein gel as affected by high pressure. *Food Chemistry*, *188*, 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.129>
- Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2007). Comparison of Water Gel Desserts from Fish Skin and Pork Gelatins Using Instrumental Measurements. *Journal of Food Science*, *72*(4), C196-C201. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00320.x>
- Zhu, Z., Fang, R., Ali, I., & Huang, M. (2020). Impact of methylglyoxal modification of chicken sarcoplasmic protein emulsions on emulsifying properties, rheological behavior and advanced glycation end products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(11), 4208-4216. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10460>
- Ziegler, G. R., & Foegeding, E. A. (1990). The Gelation of Proteins. In J. E. Kinsella (Éd.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 34, p. 203-298). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(08\)60008-X](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60008-X)
- Zorba, O., Gokalp, H. y., Yetim, H., & Ockerman, H. w. (1993). Salt, Phosphate and Oil Temperature Effects on Emulsion Capacity of Fresh or Frozen Meat and Sheep Tail Fat. *Journal of Food Science*, *58*(3), 492-496. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb04308.x>
- Zorba, Ö., & Kurt, Ş. (2006). Optimization of emulsion characteristics of beef, chicken and turkey meat mixtures in model system using mixture design. *Meat Science*, *73*(4), 611-618. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.02.017>

Titre : Caractérisation de coproduits d'origine bovine pour l'enrichissement protéique d'aliments : propriétés fonctionnelles et qualité nutritionnelle

Mots clés : Coproduit animal, protéine de bœuf, gélification, émulsification, digestibilité, qualité protéique

Résumé : La valorisation des coproduits peut être une voie prometteuse pour relever le double défi de l'augmentation de la demande en ressources alimentaires mondiales et de la durabilité des systèmes alimentaires. En particulier, les coproduits carnés peuvent constituer des ressources protéiques intéressantes, s'ils offrent des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles en accord avec les applications alimentaires. Dans ce but, deux coproduits bovins, issus du processus de fonte des graisses (creton gras et protéines récupérées de l'eau -GGRP/WRP), ont été caractérisés en termes de propriétés physico-chimiques, de propriétés techno-fonctionnelles (gélifiantes, émulsifiantes et épaississantes) et de qualité nutritionnelle.

Les effets de la concentration en protéines, du pH et de l'ajout de NaCl sur les propriétés techno-fonctionnelles ont été testés à partir d'un plan d'expériences et de la méthodologie de surface de réponse. Les conditions optimales (concentration protéique, pH, ajout de NaCl) dans lesquelles les deux coproduits bovins innovants peuvent imiter les propriétés gélifiantes et émulsifiantes des gélatines commerciales et du caséinate de sodium (NaCas), respectivement, ont été déterminées par le calcul de la désirabilité. La qualité nutritionnelle des deux co-produits a été évaluée sur un modèle *in vivo* (porc en croissance) via la mesure de la digestibilité iléale vraie (DIV), du score d'acides aminés indispensables digestibles (DIAAS) et le suivi cinétique des acides aminés (AAs) dans le plasma sanguin. Des échantillons de digestas et de sang ont été pour cela prélevés pendant 9 h postprandiales.

La concentration en protéines des deux coproduits s'avère être le seul paramètre influant significativement leurs fonctionnalités, ce qui laisse présager une utilisation possible de ces ingrédients dans de nombreuses applications alimentaires. WRP est le plus adapté pour imiter les gélatines commerciales, à condition de se placer à concentration protéique plus élevée (9 % vs. 5 % pour une gélatine 150 Bloom). Les deux coproduits sont des alternatives efficaces au NaCas comme émulsifiant, notamment pour leur capacité à stabiliser les émulsions. GGRP peut même être considéré comme plus efficace que le NaCas, car les mêmes performances sont atteintes avec une concentration plus faible en protéines (11 % vs. 12,5 %).

La digestibilité des protéines de WRP et GGRP est modérée (81-84 %). Le DIAAS est en revanche beaucoup plus élevé pour le GGRP (74 %) que pour le WRP (18 %) sur la base des besoins des enfants > 3 ans, des adolescents et des adultes, le principal AA limitant étant le tryptophane. La cinétique de libération des AAs permet de qualifier les deux coproduits de sources protéiques « lentes », avec toutefois un pic de la concentration en AAs plasmatiques plus précoce avec WRP qu'avec GGRP. Les concentrations plasmatiques en AAs totaux et essentiels sont par ailleurs plus élevées avec le repas GGRP pendant toute la phase postprandiale.

Ainsi, alors que le WRP affiche essentiellement des propriétés fonctionnelles valorisables, la qualité nutritionnelle du GGRP peut être soulignée.

Title: Characterization of bovine co-products for protein enrichment of foods: functional properties and nutritional quality

Keywords: Animal co-product, beef protein, gelation, emulsification, digestibility, protein quality

Abstract: The valorization of co-products can be a promising way to meet the dual challenge of increasing demand for global food resources and the sustainability of food systems. In particular, meat co-products may be interesting protein resources, if they offer functional and nutritional properties in line with food applications. For this purpose, two bovine co-products (greasy greaves and water recovered proteins-GGRP/WRP) resulting from the fat melting process, were characterized in terms of physicochemical properties, functional properties (gelling, emulsifying and thickening) and nutritional quality.

The effect of protein concentration, pH and NaCl addition on the functional properties were tested using an experimental design and response surface methodology. The optimal conditions (protein concentration, pH, NaCl addition) in which the two bovine co-products can mimic the gelling and emulsifying properties of commercial gelatins and sodium caseinate (NaCas), respectively, were determined by calculating desirability. The nutritional quality of the two co-products was assessed in an *in vivo* model (growing pig) by measuring true ileal digestibility (TID), the digestible essential amino acid score (DIAAS) and the kinetics monitoring of amino acids (AAs) into blood plasma. Digesta and blood samples were collected for 9 h postprandial.

The protein concentration of the two co-products proved to be the only parameter significantly influencing their functionality, pointing to the possible use of these ingredients in a wide range of food applications. WRP is the most suitable for mimicking commercial gelatins, provided it is at a higher protein concentration (9 % vs. 5 % for a 150 Bloom gelatin). Both co-products are effective alternatives to NaCas as emulsifier, notably for their ability to stabilize emulsions. GGRP can even be considered more effective than NaCas, as the same performance is achieved with less protein (11 % vs. 12.5 %).

Protein digestibility of WRP and GGRP is moderate (81-84 %). DIAAS, on the other hand, is much higher for GGRP (74 %) than for WRP (18 %), based on the needs of children > 3 years, adolescents and adults, the main limiting AA being tryptophan. AA release kinetics qualify both co-products as "slow" protein sources, with an earlier peak in plasma AA concentration with WRP than with GGRP. Plasma concentrations of total and essential AAs are higher with the GGRP meal throughout the postprandial phase.

So, while WRP essentially displays valuable functional properties, the nutritional quality of GGRP can be highlighted.