

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA**  
**RECHERCHE SCIENTIFIQUE**  
**ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE**  
**ELHARRACH, ALGER**

***THESE***

**En vue de l'obtention du diplôme de Magistère en Sciences**  
**Agronomiques**  
**Departement : Technologie Alimentaire et Nutrition Humaine**

***Thème***

**Influence des pectines sur les propriétés nutritionnelles**  
**et physico-chimiques d'une protéine allergène :**  
**La  $\beta$ -Lactoglobuline.**

**Présentée par : M<sup>me</sup> NACEF née**  
**AHMED-NACER Sanna**

**Jury :**

<b>M<sup>r</sup> YOUYOU.A.,</b>	<b>Professeur, ENSA</b>	<b>Président</b>
<b>M<sup>r</sup> MEKIMENE.L.,</b>	<b>Maitre de conférences, ENSA</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>M<sup>me</sup> OUNANE.G.,</b>	<b>Maitre de conférences, ENSA</b>	<b>Examineur</b>
<b>M<sup>r</sup> BENCHABANE.A.,</b>	<b>Maitre de conférences, ENSA</b>	<b>Examineur</b>
<b>M<sup>r</sup> AMIALI.M.,</b>	<b>Maitre de conférences, ENSA</b>	<b>Examineur</b>

**Année Universitaire : 2011-2012**

## REMERCIEMENTS

*Au terme de ce travail, il m'est agréable d'exprimer mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse.*

*Mes remerciements vont tout particulièrement à M' MEKIMENE.L., qui a bien voulu assurer mon encadrement, je lui dois une immense reconnaissance et un très grand respect.*

*Une pensée pour le défunt Monsieur Le Professeur AZZOUT.B., Allah ya rahmou et que Dieu l'accueille dans son vaste paradis.*

*Mes remerciements vont également à tous les membres de jury, pour avoir accepté d'en faire partie et pour l'intérêt qu'ils ont porté à cette thèse.*

*Je remercie M' YOUYOU. A., Professeur au département Technologie Alimentaire et Nutrition Humaine ENSA, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance.*

*Mes vives gratitude vont aussi à M<sup>me</sup> OUNANE. G., Mr BENCHAABANE. A. et M' AMIALI.M., Maîtres de conférences au département Technologie Alimentaire et Nutrition Humaine ENSA, qui ont bien voulu examiner ce travail.*

*Un grand merci et toute ma reconnaissance à mes parents, à mon époux, à ma petite fille, à mes frères et à mes sœurs, pour l'aide et le soutien qu'ils m'ont toujours apporté aussi bien dans les moments difficiles que radieux.*

## RESUME

La consommation de produits alimentaires manufacturés est en constante évolution. L'amélioration de la texture et de la stabilité de ces produits, nécessite l'utilisation d'additifs alimentaires.

Les polysaccharides et les protéines sont parmi les macromolécules les plus employées, ces derniers peuvent interagir et modifier le devenir des nutriments dans le tractus digestif.

La présente étude, cherche à mettre en évidence L'influence de trois types de pectines, la Pectine Légèrement Estérifiée (PLM), la Pectine Hautement Estérifiée (PHM) et La Pectine Légèrement Estérifiée Amidée (PA), sur la digestion gastrique *in vitro* de la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -LG).

Une mesure de la turbidité des mélanges  $\beta$ -lg-pectine a été réalisée lors de la protéolyse. L'effet des pectines sur l'activité enzymatique de la pepsine a également été évalué.

La présence des trois pectines à une concentration de 50%, provoque une augmentation du taux d'N quelque soit le pH considéré, malgré une inhibition significative de l'activité enzymatique de la pepsine avec les pectines.

La turbidité de  $\beta$ -lg pendant la protéolyse a été réduite par l'ajout de pectines, en raison de la formation de complexes électrostatiques entre cette protéine et les pectines.

L'augmentation du taux d'N pourrait être un résultat faux positif, en raison de la difficulté de précipiter les protéines par l'acide trichloracétique, et de la formation de complexes électrostatiques démontré par la diminution de la turbidité.

## ABSTRACT

The consumption of manufactured food products is constantly changing. Improving the texture and stability of these products requires the use of food additives. Polysaccharides and proteins are among the most commonly used macromolecules, which can interact and alter the fate of nutrients in the digestive tract.

The present study seeks to highlight the influence of three types of pectins, Slightly Esterified Pectin (PLM), Highly Esterified Pectin (PHM) and Slightly Esterified Amidate Pectin (PA), on *in vitro* gastric digestion of  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG). A turbidity measurement of  $\beta$ -lg-pectin mixtures was performed during proteolysis. The effect of pectins on pepsin enzymatic activity was also evaluated. The presence of the three pectins at a concentration of 50%, causes an increase in the level of N whatever the pH considered, despite a significant inhibition of the enzymatic activity of pepsin with pectins. The  $\beta$ -lg turbidity during proteolysis was reduced by the addition of pectins, due to the formation of electrostatic complexes between this protein and pectins. The increase in the N level could be a false positive result, due to the difficulty of precipitating proteins by trichloroacetic acid, and the formation of electrostatic complexes demonstrated by the decrease in turbidity.

## ملخص

إن استهلاك المنتجات الغذائية المصنعة في تغير مستمر. فتحسين الملمس والاستقرار لهذه المنتجات يتطلب استخدام الإضافات الغذائية. السكريات المتعددة و البروتينات هي من بين الجزيئات الأكثر استعمالاً، إذ أنها يمكن أن تتفاعل وتغير مصير المواد الغذائية في الجهاز الهضمي. هذه الدراسة تبحث عن توضيح تأثير ثلاثة أنواع من البكتينات : البكتين مؤسفرة قليلاً (PLM)، البكتين مؤسفرة عالياً (PMH) والبكتين أميدي مؤسفرة قليلاً (PA) ، على عملية الهضم في المعدة في المختبر لـ  $\beta$ -

كما تم إنجاز قياس العكارة لخلائط  $\beta$ -lg-البكتين خلال تحلل البروتين. إلى جانب تقييم تأثير البكتين على نشاط انزيم البيسين. وجود البكتينات الثلاثة في تركيز 50 % ، يسبب زيادة في معدل N بغض النظر عن درجة الحموضة، على الرغم من تثبيط واضح في نشاط انزيم البيسين على البكتينات.

تم تخفيض تعكر  $\beta$ -LG خلال التحلل البروتيني بإضافة البكتين، ويرجع ذلك إلى تكوين المجمعات الكهربائية الساكنة بين هذا البروتين والبكتينات. زيادة كمية N يمكن أن تكون نتيجة إيجابية كاذبة، وذلك بسبب صعوبة ترسيب البروتينات من طرف حمض التريكوراسيتيك، وتشكيل المجمعات الكهربائية الساكنة المبينة بانخفاض التعكر.

# SOMMAIRE

**Remerciements.**

**Sommaire.**

**Liste des abréviations.**

**Liste des tableaux.**

**Liste des figures.**

**INTRODUCTION.....1**

## **Chapitre I : Revue Bibliographique.**

I- La Béta-Lactoglobuline ( $\beta$ -lg).....	3
I- 1-Structure moléculaire de la $\beta$ -lg.....	3
I-1-1-Structure primaire. ....	3
I-1-2-Structures secondaire et tertiaire .....	4
I-1-3-Structure quaternaire.....	5
1- Effet du pH.....	5
2-Effet de la force ionique.....	6
3- Effet de la température.....	7
I- 2-Principales propriétés fonctionnelles de la $\beta$ -lg. ....	8
I- 3-Rôle biologique .....	9
I- 4-Hydrolyse et allergénicité de la $\beta$ -lg.....	11
II- Les Pectines. ....	12
II- 1-Structure et nature chimique des pectines.....	13
II- 2-Principales propriétés fonctionnelles des pectines.....	14
II- 3-Interactions protéines-pectines.....	16
II-4-Utilisation alimentaire.....	17
II- 5-Rôle Physiologique. ....	19

**Chapitre II : Matériel & Méthodes.**

I -Démarche expérimentale.....	21
II-Matériel.....	22
III- Protocole Expérimental.....	24
III- 1-Préparation des solutions $\beta$ -lg/polysaccharides.....	24
III- 2-Hydrolyse de la $\beta$ -lg par la pepsine .....	24
III- 3-Etude de la turbidité.....	26
III- 4-Mesure de l'activité enzymatique de la pepsine. ....	27
III- 5-Etude de la viscosité.....	28
IV- Traitement statistique.....	28

**Chapitre III : Résultats.**

I-Hydrolyse de la $\beta$ -lg par la pepsine.....	29
II-Etude de la turbidité.....	31
III-Etude de l'activité enzymatique de la pepsine.....	35
IV- -Etude de la viscosité.....	37

**Chapitre IV : Discussion.....**40**CONCLUSION.....**45**Références bibliographiques.....**46**Annexes.....**64

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical Chemists
<b>Asp</b>	Asparagine
<b><math>\beta</math>-lg</b>	Béta-lactoglobuline
<b>C°</b>	Degré Celsius
<b>Cys</b>	Cystéine
<b>DE</b>	Degré d'estérification
<b>DO</b>	Densité optique
<b><math>\epsilon</math></b>	Coefficient d'adsorption.
<b>E/S</b>	Rapport Enzyme/Substrat
<b>g</b>	Gramme
<b>Glu</b>	Glutamine
<b>Hemo</b>	Hémoglobine
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>Lys</b>	Lysine
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitre
<b><math>\mu</math>mole</b>	MicroMole
<b>mg</b>	Milligramme
<b>ml</b>	Millilitre
<b>min</b>	Minute
<b>M</b>	Molaire
<b>N</b>	Azote
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>N /m<sup>2</sup></b>	Newton par mètre carrée
<b>NTU</b>	Nephelometric Turbidity Units
<b>P</b>	Pectine
<b>PA</b>	Pectine Légèrement Estérifiée Amidée

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>PAS</b>	Pascal-seconde
<b>PHM</b>	Pectine Hautement Estérifiée
<b>PLM</b>	Pectine Légèrement Estérifiée
<b>Peps</b>	Pepsine
<b>pHi</b>	Point Isoélectrique
<b>P/P</b>	Rapport poids/poids
<b>TCA</b>	Acide Trichloroacétique
<b><math>\Delta A</math></b>	Variation de l'absorbance.
<b><math>\Delta t</math></b>	Variation du temps
<b>V/V</b>	Rapport Volume / Volume
<b>U</b>	Unité
<b>s</b>	Seconde

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1:** Applications des protéines du lactosérum en alimentation.

**Tableau 2:** Utilisation des pectines dans les confitures.

**Tableau 3:** Analyses physico-chimiques des poudres de  $\beta$ -lg (g/100 g de poudre).

**Tableau 4:** Caractéristiques des poudres de pectines (Degussa Texturant Systems).

**Tableau 5:** Influence des différentes concentrations de la PLM sur la digestibilité de la  $\beta$ -lg en présence de pepsine (%).

**Tableau 6:** Influence des différentes concentrations de la PHM sur la digestibilité de la  $\beta$ -lg en présence de pepsine (%).

**Tableau 7:** Influence des différentes concentrations de la PA sur la digestibilité de la  $\beta$ -lg en présence de pepsine (%).

**Tableau 8:** Variation de la Turbidité (NTU) de la  $\beta$ -lg à pH 3,8 en fonction du type de Pectines et de la présence ou non la Pepsine.

**Tableau 9:** Effet de la PLM, de la PHM et de la PA sur l'activité enzymatique de la pepsine ( $\mu$ moles /min).



## LISTE DES FIGURES

**Figure 1:** Structure primaire du monomère de la  $\beta$ -lg A.

**Figure 2:** Structure tridimensionnelle de la  $\beta$ -lg.

**Figure 3:** Représentation schématique d'un ligand lié dans la cavité hydrophobe de la  $\beta$ -lg.

**Figure 4:** Unité d'acide galacturonique composant la pectine.

**Figure 5:** Structure de la chaîne principale d'une molécule de pectine.

**Figure 6:** Répartition des charges sur la  $\beta$ -lg à pH 7.

**Figure 7:** Schéma du dispositif de digestion *in vitro*.

**Figure 8:** Turbidimètre portable NEP 160 ANALITE.

**Figure 9:** Evolution de la turbidité de la  $\beta$ -lg en fonction du pH.

**Figure 10:** Effet de la PLM sur l'évolution de la turbidité de la  $\beta$ -lg en fonction du pH.

**Figure 11:** Effet de la PHM sur l'évolution de la turbidité de la  $\beta$ -lg en fonction du pH.

**Figure 12:** Effet de la PA sur l'évolution de la turbidité de la  $\beta$ -lg en fonction du pH.

**Figure 13:** Evolution de l'absorbance en présence de la PLM en fonction du temps.

**Figure 14:** Evolution de l'absorbance en présence de la PHM en fonction du temps.

**Figure 15:** Evolution de l'absorbance en présence de la PA en fonction du temps.

**Figure 16:** Evolution de la viscosité de la  $\beta$ -lg en fonction de la vitesse de cisaillement.

**Figure 17:** Evolution de la viscosité de la PLM et de la  $\beta$ -lg-PLM en fonction de la vitesse de cisaillement.

**Figure 18:** Evolution de la viscosité de la PHM et de la  $\beta$ -lg-PHM en fonction de la vitesse de cisaillement.

**Figure 19:** Evolution de la viscosité de la PA et de la  $\beta$ -lg-PA en fonction de la vitesse de cisaillement.

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

La diversification alimentaire, l'évolution des technologies alimentaires et la production des aliments manufacturés sont à l'origine de quelques changements dans la structure des aliments et de leurs conséquences sur la santé.

En apport aux nutriments naturellement présents dans les aliments, d'autres éléments sont utilisés comme additifs alimentaires avec pour but principal, l'amélioration des qualités organoleptiques, de la conservation et de la texture des produits. Ces additifs peuvent être synthétiques ou naturellement présents dans les aliments. Parmi les additifs naturels les protéines et les polysaccharides jouent un rôle clé dans la structuration et la stabilisation des systèmes alimentaires à travers la gélification, l'épaississement et les propriétés fonctionnelles de stabilisation de surface.

la prévalence des maladies allergiques a doublé, dans les sociétés industrialisées (Marcouire *et al.*, 1998 ; Mairesse, 2002) actuellement l'Organisation Mondiale de la Santé classe les allergies au quatrième rang des maladies chroniques (Debry *et al.*, 2001).

L'allergie alimentaire est définie comme étant l'ensemble des manifestations cliniques liées à une réponse immunologique, dépendante des anticorps (immunoglobuline E, IgE) et dirigée contre un allergène (antigène) alimentaire (Mairesse, 2002).

La plupart des allergènes alimentaires sont de nature protéique. Les protéines du lait de vache sont à l'origine de réactions allergiques. Ces allergies représentent actuellement, par ordre de fréquence, la troisième allergie alimentaire chez les enfants en dessous de 15 ans avec 8,1 % des cas, derrière l'allergie à l'œuf (34,2%) et à l'arachide (22,9%) ( Debry *et al.*, 2001).

Le principal allergène du lait de vache est la Beta-lactoglobuline ( $\beta$ -lg) suivie dans une moindre mesure de l' $\alpha$ - Lactoglobuline et de quelques rares cas de la caséine (Yunginger ,1992).

Les protéines et les polysaccharides en solution peuvent interagir, dans la plupart des cas.

Les mélanges des biopolymères en solution sont instables et la séparation de phase peut se produire selon deux cas différents.

Dans un premier cas, les interactions entre les biopolymères peuvent être répulsives et les systèmes forment deux phases, chacune d'elle enrichie avec un biopolymère, c'est la

séparation de phase habituellement appelée incompatibilité thermodynamique ou séparation de phase ségrégative.

Dans l'autre cas, les interactions peuvent être attractives et le système présente deux phases avec les deux biopolymères concentrés dans une seule phase.

C'est la séparation de phase associative (Dickinson, 1998; Schmitt *et al.*, 1998), dans cette dernière phase, la formation des complexes est due à des interactions fortes et spécifiques (liaisons covalentes) ou à plusieurs interactions faibles et non spécifiques (liaisons électrostatiques, de Van der Waals, hydrogènes ou hydrophobes).

Les interactions électrostatiques dépendent du pH et de la force ionique de la solution, mais également de l'ionisation et de la densité de charges des macromolécules, du poids moléculaire du polysaccharide et du rapport protéine/polysaccharide (Dickinson, 1998; Schmitt *et al.*, 1998; Syrbe *et al.*, 1998).

La connaissance des interactions pouvant se produire dans les produits alimentaires, entre des polysaccharides et des protéines allergènes est un élément de compréhension des mécanismes visant à modifier éventuellement l'antigénicité des protéines alimentaires.

De nombreux produits laitiers tels que les glaces, les yaourts, les crèmes, les boissons lactées contiennent des polysaccharides (carraghénate, pectine, caroube, etc.), qui assurent la texture et la stabilité.

De nombreux travaux ont montré que les traitements technologiques sur les protéines alimentaires, qu'il s'agisse d'opérations culinaires domestiques ou des procédés industriels, sont à l'origine d'interactions avec les polysaccharides (anioniques ou cationiques: glucose, maltose, lactose, amidon), entraînant une faible digestibilité des protéines, mais aussi une baisse de l'allergénicité de la  $\beta$ -lg (Oste *et al.*, 1997; Hattori *et al.*, 1997, 2000).

L'objectif de notre travail est d'étudier l'influence de polysaccharides d'origine végétale, notamment trois types de pectines : une Pectine Légèrement Estérifiée (PLM), une Pectine Hautement Estérifiée (PHM) et une Pectine Légèrement Estérifiée et Amidée (PA), sur les propriétés nutritionnelles (la digestibilité) et physico-chimiques d'une protéine allergène du lait de vache la Béta-lactoglobuline ( $\beta$ -lg) et des mélanges protéines-polysaccharides en présence de la pepsine, ainsi que l'activité enzymatique de cette dernière.

# **Revue bibliographique**

*Premier chapitre*



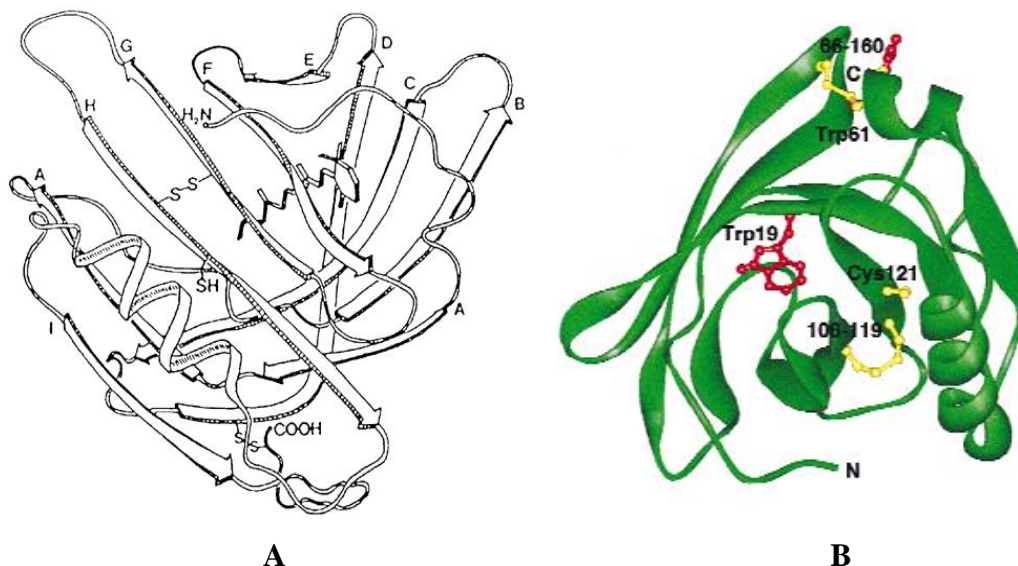
Elle est riche en acides aminés sulfatés, d'où sa grande valeur nutritionnelle, elle contient 5 résidus cystéine (Cys) (Amiot *et al.*, 2002 ; Sava *et al.*, 2005). Dont quatre engagés dans deux ponts disulfures, un localisé entre les résidus Cys 66 et Cys 160, et un autre entre les résidus Cys 106 et Cys 119 ou Cys 121 et un groupement thiol (-SH) libre dont la position est variable (Cys 119 ou Cys 121) (Eigel *et al.*, 1984 ; Hambling *et al.*, 1992. ; Paterson *et al.*, 1995 ; Roufik *et al.*, 2005).

Il existe sept variants génétiques dont les plus fréquents sont les variants A et B, la différence entre les deux se situe au niveau du résidu d'acide aminé 64 (Asparagine pour le variant A et Glycine pour le variant B) et du résidu de l'acide aminé 118 (Valine pour le variant A, Alanine pour le variant B).

### **I-1-2-Structures secondaire et tertiaire :**

Cette protéine possède un haut degré de structuration, avec une structure secondaire (figure 2) majoritairement formée par des feuillets plissés  $\beta$  (43 à 50 %) et des coudes  $\beta$  (10 à 20 %) et en faibles proportions des hélices  $\alpha$  (10 à 15 %) (Timasheff *et al.*, 1966 ; Townend, *et al.*, 1969 ; Cayot et Lorient, 1997).

La première présentation de la structure tridimensionnelle de la  $\beta$ -lg (Figure 2) a été proposée par Sawyer *et al.* (1985) et Papiz *et al.* (1986).



**Figure 2 :** Structure tridimensionnelle de la  $\beta$ -lg.

**A :** (Papiz *et al.*, 1986).

**B :** (Protein Data Bank).

Celle-ci montre 2 zones de feuillets  $\beta$  antiparallèles, dont les 9 brins (A à I) se regroupent en 2 plaques presque perpendiculaires, formant une cavité centrale hydrophobe en forme de calice, ces brins comprennent les résidus 16-27, 39-44, 47-58, 62-76, 80-84, 89-97, 102-109, 115-124 et 145-150.

La structure en hélice  $\alpha$  se compose des résidus 130-140, elle se retrouve vers l'extrémité (-COOH) de la molécule (résidus 130 - 140), est stabilisée par des interactions hydrophobes et renforcée par des interactions entre les résidus Lysine et les résidus acides qui se trouvent dans l'entourage, les coudes  $\beta$  sont localisés au niveau des résidus 44-47, 78-81 et 84-85.

Le pont disulfure reliant les 2 feuillets à cœur (Cys 106 et Cys 119 ou Cys 106 et Cys 121), se situe au cœur de la protéine, le second pont disulfure (Cys 66 et Cys 160) formerait une boucle disposée en direction du milieu environnant (Papiz *et al.*, 1986), celle-ci serait flexible, facilement accessible et relativement peu stable.

Le groupement thiol (-SH) libre très réactif en position 121 est à l'intérieur de ce cœur et serait donc difficilement accessible, ce dernier est responsable de la saveur du lait chauffé. La structure secondaire est stabilisée par des liens hydrogènes et les 2 ponts disulfures stabilisent la structure tertiaire (Brownlow *et al.*, 1997).

### **I-1-3-Structure quaternaire :**

La  $\beta$ -lg possède la particularité de pouvoir s'associer ou se dissocier et ceci est fonction de différents paramètres environnementaux, dont les plus importants sont le pH, la force ionique du milieu et la température (Mac Kenzie, 1967 ; Iametti *et al.*, 1998), elle possède ainsi une large gamme de structures quaternaires.

#### **1-Effet du pH :**

La  $\beta$ -Lg présente une large gamme de structures quaternaires traduites par différents stades d'oligomérisation en fonction du pH du milieu. Les molécules de la  $\beta$ -lg peuvent s'associer par des interactions non covalentes et réversibles suivant le pH.

A pH physiologique, la  $\beta$ -lg existe sous forme de dimère (36 kDa), elle est stable entre pH 5,2 (Mac Kenzie, 1967) et pH 6,6 (Cayot et Lorient, 1997 ; Fox, 2003), grâce à 12 liaisons hydrogènes (Brownlow *et al.*, 1997), ainsi qu'aux pH compris entre 2 et 3,5.



La dimérisation de la protéine serait dû principalement à des interactions intermoléculaires non covalentes, qui sont plus efficaces près du point isoélectrique, entre les résidus Asp 130 et Glu 134 d'un monomère et les résidus Lys d'un second monomère (Green et Aschaffenburg, 1959 ; Timasheff et Townend, 1964).

Aux pH inférieurs à 2 ou supérieurs à 6,5 ; elle est sous forme de monomère (18-18,4 kDa) ; cette dissociation devient appréciable au dessous de pH 3,5 (Kelly et Reithel, 1971 ; Aymard *et al.*, 1996 ; Joss et Ralston , 1996) et au dessus de pH 6,6 (Cheftel *et al.*, 1985 ; Fox, 1989).

Cette monomérisation serait dû à l'augmentation de la charge nette de la protéine, du fait des forces électrostatiques répulsives. Elle s'effectue sans changement majeur de conformation (Swaisgood, 1982).

Entre 3,5 et 5,5 elle forme des octamères (Mc Kenzie, 1971 ; Aymard *et al.*, 1996), avec un poids moléculaire de 144 kDa , le phénomène d'octamérisation implique l'intervention de liaison hydrogène entre les groupements carboxyles des résidus Asp 64 localisés à l'interface d'association des dimères.

À des pH supérieurs à 8,0 ; il y a une dénaturation et une augmentation de la réactivité des groupements thiols qui induisent une agrégation par la formation de liens disulfures intermoléculaires.

La  $\beta$ -lg résiste à la dénaturation jusqu'à pH 2 (Hambling *et al.*, 1992 ; Verheul *et al.*, 1998).

## **2-Effet de la force ionique :**

La force ionique joue un rôle important dans la stabilité thermique de la  $\beta$ -lg.

En général tous les sels, au dessus d'une certaine concentration, favorisent l'agrégation en incitant les interactions hydrophobes par une diminution des répulsions électrostatiques (Cayot et Lorient, 1997).

Le point isoélectrique de la  $\beta$ -lg est influencé par la force ionique du milieu, le pHi diminue lorsque la concentration en KCl ou CaCl<sub>2</sub> augmente (Nozaki *et al.*, 1959 ; Tanford *et al.*, 1959).

Aux pH acides, une augmentation de la force ionique (0,5 – 1,0 M), prévient selon le type de sel, la dénaturation par un effet stabilisant (salting-in), de la conformation dimérique (Renard, 1994) ; mais à des concentrations trop élevées (> 2 M), l'agrégation est favorisée (salting-out) (Cayot et Lorient, 1997 ; Verheul *et al.*, 1998).

A pH 7, la  $\beta$ -lg évolue de la forme monomérique vers un degré d'association supérieur. Lorsque le milieu est enrichi en NaCl (Renard, 1994).

Lors du chauffage de la  $\beta$ -lg en présence de calcium, les ions calcium se fixent sur des sites spécifiques de la molécule, réduisant sa charge négative nette à zéro et provoquant la précipitation isoélectrique.

Il est probable que dans la zone de pH 6 à 8, les ions calcium se fixant sur la protéine, annulent les charges et la répulsion électrostatique, favorisant de ce fait une agrégation de type isoélectrique.

### **3-Effet de la température :**

La  $\beta$ lg possède des propriétés d'agrégation et de gélification thermique. Ces propriétés d'agrégation résident dans le changement de conformation de la protéine induite par la modification thermique des interactions, qui maintiennent la structure de la  $\beta$ lg native (Mulvihill et Donovan, 1987 ; Mulvihill et Kinsella, 1988).

Le mécanisme de dénaturation thermique de la  $\beta$ -lg est très différent selon le pH auquel le traitement thermique est effectué.

Dans une gamme de PH 5,2 à 7,4 ; lors du chauffage d'une solution  $\beta$ -lg, il se produit au dessus de 30°C une dissociation du dimère de la  $\beta$ -lg en monomère et jusqu'à 65-70°C, le changement de conformation est rapide et réversible ; cette transformation devient irréversible au dessus de 70°C (Dupont, 1963, 1965 ; Qi *et al.*, 1995).

Aux températures supérieures à 70°C à pH 7, il apparaît une agrégation de la protéine (Sawyer, 1967 ; Dumay *et al.*, 1999). Ce processus d'agrégation thermique irréversible semble reposer sur l'établissement d'interactions hydrophobes et de ponts disulfures (Shimada et Cheftel, 1989 ; Mc Swiney *et al.*, 1994 ; Matsuura et Manning, 1994 ; Gezimati *et al.*, 1996 ; Qi *et al.*, 1997).

Autour de 20°C, la  $\beta$ -lg existe essentiellement sous forme de monomère (Mac Kenzie, 1971), avec un changement progressif de la conformation de la protéine.

Chauffée à 90°C durant 30 minutes à pH 2,5 ; la  $\beta$ -lg existe à plus 55 % sous forme quasi-native (Cayot et Lorient, 1998).

La résistance à la dénaturation thermique est plus élevée à pH acide, même si les protéines sont dénaturées, on n'observe pas de formation de gros agrégats.

Ce changement progressif de la conformation de la protéine serait probablement dû à des répulsions électrostatiques.

## **I-2-Principales propriétés fonctionnelles de la $\beta$ -lg :**

Le terme « propriété fonctionnelle » est défini comme étant les propriétés non nutritionnelles qui leur permettent de contribuer à des caractéristiques désirées de l'aliment.

Outre la présence naturelle de la  $\beta$ -lg, dans les produits laitiers, celle-ci est également retrouvée de façon masquée dans de nombreuses préparations alimentaires, où elle est utilisée pour ses propriétés fonctionnelles qui sont : la gélification, l'émulsification et la capacité moussante, elle contribue ainsi à la stabilité et à la texture des aliments.

De nombreux produits alimentaires sont des émulsions comme le lait, la crème, la crème glacée, le beurre etc. ; et les constituants protéiques jouent souvent un rôle prépondérant dans la stabilisation de ces systèmes colloïdaux.

Le tableau 1 présente les principales applications alimentaires des protéines du lactosérum.

**Tableau 1** : Applications des protéines du lactosérum en alimentation (Linden et Lorient, 1994).

<b>Produits</b>	<b>Fonctions</b>
Produits de boulangerie-biscuiterie.	Apport protéique, rétention d'eau, gélifiant, texture (interaction avec le gluten).
Pâtes alimentaires.	Apport protéique, texture.
Confiserie (caramel, nougats...). Chocolat au lait.	Emulsifiant, arôme, texture, dispersibilité.
Potages, sauces.	Epaississant (interactions avec amidon), émulsifiant.
Plats cuisinés.	Epaississant, émulsifiant, rétention d'eau.
Farines lactées.	Apport protéique, solubilité.
Boissons lactées ou fruitées.	Soluble à chaud ou /et pH acide, épaississant.
Aliments diététiques et infantiles (Aliments entérales).	Apport protéique, épaississant, gélifiant.
Fromages naturels et fondus.	Emulsifiant, épaississant, gélifiant.
« Imitation cheeses, dips », pâtes à tartiner, coffee whitner , crèmes glacées.	Emulsifiant, épaississant
Crèmes, desserts, flancs, yoghourts.	Emulsifiant, épaississant, gélifiant
Produits carnés (saucisse, pâtés, hamburgers.	Emulsifiant, épaississant, liant, gélifiant, rétention d'eau et de matières grasses.

La gélification est l'une des propriétés les plus importantes des macromolécules dans un système alimentaire (Samant *et al.*, 1993). Elle joue un rôle important dans la préparation de nombreux aliments.

La gélification protéique est utilisée non seulement pour la formation des gels solides viscoélastiques, mais aussi pour améliorer l'absorption de l'eau, l'épaississement, la liaison des particules et pour stabiliser les émulsions et les mousses (Cheftel *et al.*, 1985).

La formation du réseau protéique est le résultat d'un équilibre entre les interactions protéine-protéine, les interactions protéine-solvant et les forces attractives et répulsives entre chaînes polypeptidiques adjacentes (Cheftel *et al.*, 1985 ; Bryant et McClements, 2000).

L'effet de différents paramètres (concentration protéique, pH, force ionique, nature des ions, et température), notamment sur la gélification a été largement étudié (Clark, 1998).

La  $\beta$ -lg est une des principales protéines gélifiantes présente dans le lactosérum (Cheftel *et al.*, 1985 ; Fox, 2003).

Les molécules de  $\beta$ -lg forment des gels thermiques irréversibles, qui résultent de la condensation des macromolécules par la formation de nouvelles liaisons (des ponts disulfures intra-protéiques).

La  $\beta$ -lg peut former des gels par des interactions avec des agents polysaccharidiques gélifiants (Lin, 1977).

La gélification de la  $\beta$ -lg induite par la chaleur peut être divisée en quatre étapes : la dissociation en monomères, l'activation des molécules par un dépliement partiel, la formation d'agrégats, et la fixation du réseau par des interactions non covalentes (Cayot et Lorient, 1997).

A la deuxième étape, les protéines commencent à s'agréger pour former des agrégats primaires de forme globulaire qui s'associeront finalement en un réseau tridimensionnel, piégeant un grand volume de liquide (Cheftel *et al.*, 1985 ; Relkin *et al.*, 1998 ; Ikeda, 2003).

Les protéines globulaires comme la  $\beta$ -lg possèdent une structure stable, une hydrophobicité et sont de médiocres agents émulsifiants (Halling, 1981).

### **I-3-Rôle biologique :**

La  $\beta$ -lg fait partie (Figure 3) des lipocalines (molécules fixant des ligands hydrophobes).



**Figure3** : Représentation schématique d'un ligand lié dans la cavité hydrophobe de la  $\beta$ -Lg (Flower *et al.*, 2000).

La présence d'un cœur hydrophobe dans sa structure, lui confère une forte parenté structurale avec la protéine sanguine transporteur de rétinol, (Sawyer *et al.*, 1985 ; Godovac-Zinnerman, 1988).

En effet, cette protéine lie les acides gras et le rétinol, d'ailleurs dans le lait des ruminants, elle fixe environ une mole d'acide gras par mole de protéine dimérique (Pérez *et al.*, 1989).

La présence, en outre de récepteurs spécifiques de la  $\beta$ -lg au niveau de l'intestin du veau (Kitabatake et Kinekawa, 1998) laisse penser que cette protéine serait un transporteur spécifique du rétinol, issu du lait de la vache vers les récepteurs duodénaux chez le veau (Papiz *et al.*, 1986 ; Godovac-Zimmermann, 1988).

La résistance de la  $\beta$ -lg à la digestion gastrique est également en faveur de son rôle de transporteur de la vitamine A (Papiz *et al.*, 1986).

L'implication de la  $\beta$ -lg a été suggérée dans le métabolisme lipidique de la glande mammaire, en jouant un rôle dans le transport de quelques acides gras comme le palmitate (Spector et Fletcher 1970), des lipides et plus généralement des molécules aromatiques ou le toluène (Robilllard et Wishnia, 1972).

Récemment, il a été découvert que la  $\beta$ -lg se lie aux acides gras omega-3 DHA (Zimet et Livney, 2009).

Il a été démontré que la  $\beta$ -lg augmente l'activité de la lipase prégastrique chez les ruminants, probablement en fixant les acides gras libérés du site de réaction et qui pourraient inhiber l'activité enzymatique (Pérez *et al.*, 1992 ; Debry, 2001).

Cette protéine aurait un effet régulateur sur le métabolisme des phosphates dans la glande mammaire, par un contrôle de l'activité de la phosphoprotéine phosphatase (Farrel et Thompson, 1971).

Des peptides à activités opiacée ( $\beta$ -lactorphines) et hypertensive (lactokinines) ont été identifiés dans la séquence de la  $\beta$ -lg (Chiba et Yoshikawa, 1986 ; Mullaly *et al.*, 1997), elles auraient un rôle antibactérien, car leur fixation sur les fimbriae des bactéries inhibe leur adhésion sur la paroi des entérocytes, ce qui est entièrement bénéfique pour le nouveau-né (Ouwehand *et al.*, 1997).

Des peptides bioactifs de courtes séquences ont été identifiés également dans la structure primaire des protéines du lactosérum (Clare et Swaisgood, 2000 ; Shah, 2000 ; Smacchi et Gobetti, 2000).

Ces peptides pouvant être libérés par hydrolyse à l'aide de protéases spécifiques (Antila *et al.*, 1991 ; Mullaly *et al.*, 1997 ; Pihlanto-Leppälä *et al.*, 2000), soulèvent un intérêt croissant en raison de leur valeur thérapeutique pour le traitement ou la prévention de diverses maladies, particulièrement la séquence 142-148 de la  $\beta$ -lg, qui est un peptide bioactif reconnu pour son inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (ACE), lui conférant un potentiel thérapeutique pour le traitement de l'hypertension chez l'humain.

#### **I-4-Hydrolyse et allergénicité de la $\beta$ -lg :**

La  $\beta$ -lg constitue un allergène majeur du lait (Bahna, 1978), aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte, même si elle est considérée comme exceptionnelle chez ce dernier. (Monoret-Vautrin, 1983), le mécanisme envisagé pour une telle intolérance retient l'idée d'une résistance aux enzymes digestives gastriques et pancréatiques (Schmidt et Van Markwijk, 1993; Schmidt *et al.*, 1995 ; Sawyer et Kontopodis, 2000 ; El-Zahar *et al.*, 2005), entraînant une moindre digestibilité de la protéine et une modification de la perméabilité de la muqueuse intestinale vis à vis du transport épithélial (Caillard et Tomé, 1995 ; Heyman et Desjeux, 1996 ; Maier *et al.*, 2006), en raison d'une structure globulaire très compacte de la  $\beta$ -lg, et la présence des ponts disulfures, rendant cette protéine très résistante à l'hydrolyse par les enzymes digestives (pepsine, chymotrypsine), vérifié *in vitro* par une très faible libération de peptides au cours de la digestion (Iung, 1988 ; Reddy *et al.*, 1988 ; Closs, 1990 ; Schmidt et

Poll,1991 ; Kinekawa et Kitabatake, 1996), même si l'acidité chlorhydrique du milieu gastrique la solubilise.

D'autres études utilisant des enzymes d'origine végétale (bromélaïne et papaïne) ou bactériennes (corolase, pronase) ont également démontré une faible digestibilité de cette protéine (Schmidt et Poll, 1991).

Les traitements thermiques, la stérilisation, les hautes pressions et autres traitements telle que la sulfitoxyse provoquent une rupture des ponts disulfures augmentent l'hydrolyse de la  $\beta$ -lg (Reddy *et al.*, 1988 ; Schmidt et Van Markwigh, 1993 ; Hayakawa *et al.*,1992 ; Van Camp et Huyghebaert, 1995 ; Kananen *et al.*, 2000).

## **II-Les Pectines :**

Les polysaccharides, comme la pectine, possèdent des propriétés fonctionnelles qui sont largement utilisées en industries alimentaires.

Les pectines possèdent la propriété de se disperser aisément dans l'eau, pour aboutir à une augmentation assez conséquente de la viscosité et quelques fois à un effet gélifiant.

En plus du pouvoir gélifiant et/ou épaississant, ces biopolymères peuvent également être employés pour d'autres propriétés : stabilisation des suspensions et émulsion, pouvoir de rétention d'eau, pouvoir liant, formation de complexe avec les protéines.

Ces macromolécules sont classées comme hydrocolloïdes pour leur pouvoir de rétention de l'eau et font partie aussi de la famille des fibres alimentaires. Sous ce terme, on désigne différents constituants végétaux figurants dans l'alimentation mais qui ne sont pas dégradés par les enzymes propres de l'homme.

C'est Braconnat, en 1825 qui isola pour la première fois la pectine, et lui donna ce nom en référence au mot grec « Pektos » (ferme/rigide).

La pectine est un polysaccharide de structure présent chez tous les végétaux supérieurs, elle joue un rôle important dans la couche moyenne des cellules végétales ou en association avec la cellulose, l'hémicellulose et les glycoprotéines, elle maintient la cohésion cellulaire.

Malgré sa présence dans de nombreux végétaux, seules quelques sources servent à extraire la pectine commerciale utilisée par l'industrie agroalimentaire.

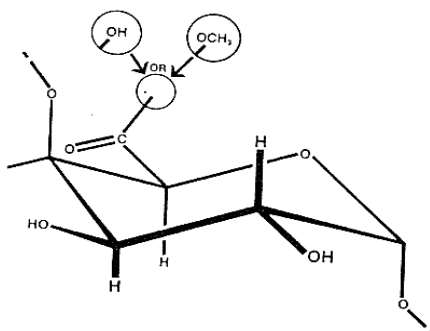
Ainsi, les principales sources industrielles de pectine sont à l'heure actuelle les marcs de pomme et les écorces d'agrumes (citron et orange), tous deux étant des sous-produits de la production de cidre ou de jus de fruits, respectivement.

Les marcs de pomme contiennent 10 à 15 % de pectine et les écorces d'agrumes, 20 à 30 % (Rolin, 1993). Les pulpes de betteraves et les graines de tournesol sont d'autres sources potentielles de pectine (May, 1992 ; Rolin, 1993 ; Sakai *et al.*, 1993 ; Kar et Arslan 1999 ; Yapo *et al.*, 2007).

Les pectines diffèrent par leur composition mais possèdent la même structure de base, la composition varie selon la source et les conditions appliquées lors de leurs extractions, et n'ont donc pas les mêmes propriétés fonctionnelles.

## **II-1-Structure et nature chimique des pectines :**

La pectine est un polymère complexe et hétérogène. Elle est formée d'une chaîne linéaire ayant un ose principal, l'acide D-galacturonique ([figure 4](#)), lié en  $\alpha$ -(1,4) et de conformation  ${}^4C_1$ , interrompu par des unités de L-rhamnose qui se lient à la chaîne principale par des liaisons  $\alpha$ -(1,2).

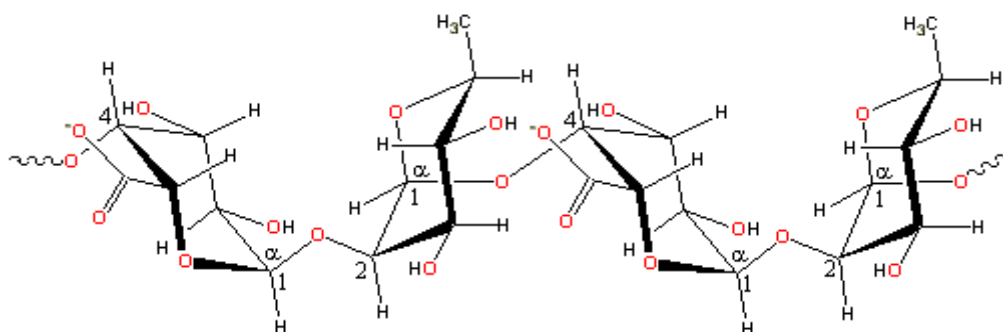


**Figure 4 :** Unité d'acide galacturonique composant la pectine (May, 1992).

Les chaînes latérales composées d'oses neutres (arabinose, galactose) sont branchées sur les unités de rhamnose ([figure5](#)). Les groupements carboxyliques de l'acide galacturonique confèrent à la pectine son caractère anionique.

La pectine est un hétéropolysaccharide anionique ramifié avec un poids moléculaire situé entre 50 et 150 kDa (Voragen *et al.*, 1995), son pHi est aux alentours de 3 (Rolin,1993), le caractère anionique de la pectine la rend susceptible aux interactions avec les protéines (Tolstoguzov, 1991).





**Figure 5** : Structure de la chaîne principale d'une molécule de pectine.

Les fonctions acides des résidus d'acide D-galacturonique peuvent être estérifiées par du méthanol. Le degré d'estérification (DE) qui représente le nombre de groupements carboxyliques estérifiés sur le total des unités d'acides galacturoniques de la chaîne principale (100 motifs) permet de classer les pectines commerciales en deux groupes (Moll et Moll, 1998) :

- Les pectines hautement estérifiées (PHM) dont le degré d'estérification (DE) est compris entre 50–75 %.
- Les pectines faiblement estérifiées (PLM) avec un DE inférieur à 45–50 %. Au sein des PLM, on peut distinguer également les pectines non amidées (PNA) et les PLM amidées (PA). Ces dernières sont obtenues par hydrolyse alcaline des PA en milieu ammoniacal, par estérification, puis amidation de la fonction acide.

## **II-2-Principales propriétés fonctionnelles des pectines :**

Les principales propriétés fonctionnelles des pectines sont essentiellement liées aux interactions que ces macromolécules établissent avec l'eau, elles fournissent des dispersions colloïdales en phase aqueuse et sont appelées pour cela hydrocolloïdes.

La viscosité et/ou le pouvoir gélifiant sont les propriétés les plus souvent recherchées, reposant sur le comportement de ces macromolécules en milieu aqueux.

La pectine est soluble dans l'eau pure et insoluble dans la plupart des solvants organiques, la solubilité de la pectine est fonction de l'état ionique, sous forme saline, elle est facilement solubilisée grâce aux répulsions électrostatiques, tandis que sous forme acide, elle est pratiquement insoluble.

La présence de chaînes latérales (glucides neutres), mais aussi de groupes galacturoniques, contribue à l'écartement des chaînes et facilite l'hydratation des pectines, et plus le DE est élevé, plus celle-ci est facilement soluble à froid.

Il subsiste souvent dans les solutions des agrégats ou des microgels ce qui nécessite un chauffage pour améliorer la solubilité (May, 1992).

La pectine, comme de nombreux hydrocolloïdes, a la propriété d'augmenter considérablement la viscosité du milieu aqueux, même à de très faibles concentrations (Doublier et Thibault, 1984).

Les molécules pectiques portent des charges négatives dont l'effet est, d'une part d'augmenter la viscosité de la solution en étirant les chaînes, et d'autre part d'entraîner une répulsion des chaînes entre elles (Cheftel et Cheftel, 1992).

La viscosité et la solubilité des pectines sont affectées par les cations polyvalents et le pH, les pectines gélifient dans des conditions différentes selon leurs DE.

Les PHM forment des gels en présence de sucre et en milieu acide, les chaînes s'associent sous la forme d'empilement, par des liaisons hydrogènes dont la formation est favorisée par la réduction de l'activité de l'eau (addition de sucre) et par des interactions électrostatiques (Cheftel et Cheftel, 1992 ; Lapsin et Pricl., 1995 ; Tombs., 1998), créées par rétrogradation de la dissociation des groupes carboxyliques (acidification).

Les PLM gélifient en présence de cation divalent ( $\text{Ca}^{+2}$ ) (Moll et Moll, 1998), selon le modèle de la «boîte à œufs» suggéré pour les alginates par Grant *et al.* (1986).

Grâce aux liaisons ioniques assurées par le  $\text{Ca}^{+2}$ , les ions se fixent sur les pectines au niveau des groupements carboxyliques ionisés ( $\text{COO}^-$ ), favorisant la cohésion des chaînes (Rees, 1986 ; Cheftel et Cheftel, 1992).

L'amidation des pectines permet leur gélification à haute température, et à des taux de  $\text{Ca}^{+2}$  plus faibles que dans le cas des PLM.

### **II-3-Interactions protéines-pectines :**

Lorsque les protéines et les polysaccharides sont mélangés en solution, ils interagissent de différentes façons selon les conditions du milieu. Il en résulte une diversification de leurs propriétés mécaniques et texturales, de gélification, de solubilité, de co-solubilité, ainsi que de leur comportement aux interfaces.

En fait, les propriétés fonctionnelles des mélanges de biopolymères sont souvent très différentes des propriétés des solutions des polymères purs (Dickinson, 1993 ; Samant *et al.*, 1993 ; Ledward, 1994 ; Tolstoguzov, 1997).

Les pectines peuvent interagir avec les protéines dans différentes conditions de pH. Les pectines sont des molécules chargées négativement (polyanions) à pH neutre.

Les protéines sont des molécules amphotères dont la charge varie en fonction du pH et de part et d'autre de leurs points isoélectriques.

Les pectines interagissent avec les protéines par des liaisons électrostatiques qui se produisent à des pH où les deux macromolécules portent des charges opposées ( $pH_{\text{pectines}} < pH < pH_{\text{protéines}}$ ).

Ceci est à la base de leur utilisation dans les produits laitiers acides où ils sont utilisés pour la stabilisation des micelles de caséine.

L'hydrocolloïde de choix appliqué dans les boissons lactées acides est la pectine fortement estérifiée (Glahn, 1982), sa faible densité de charge provoque de faibles interactions électrostatiques, par rapport à la pectine légèrement estérifiée, mais avec une plus grande efficacité dans la stabilisation des dispersions des caséines.

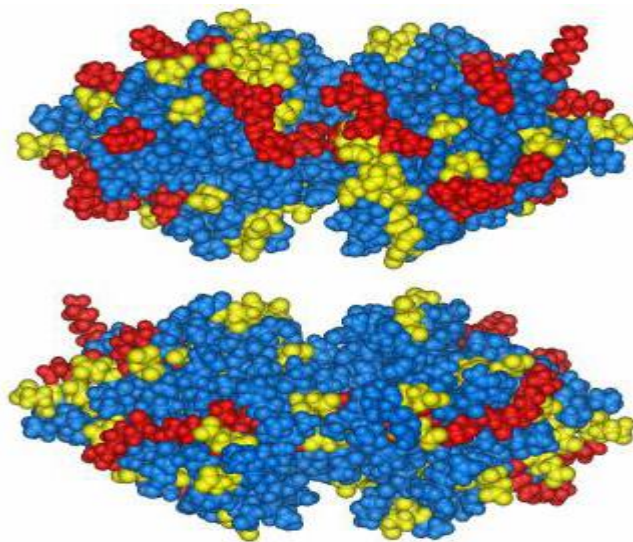
Des interactions dues aux liaisons hydrogènes ont été démontrées dans la formation des complexes entre la gélatine et la pectine.

Dans cette étude, il a été montré que les complexes solubles entre la gélatine et la pectine pourraient être obtenus dans une large gamme de valeurs de pH, incluant des pH  $>$  au  $pH_{\text{Hi}}$  de la gélatine (4,75).

De plus, l'importance des groupes esters dans la formation de ces complexes a été confirmée en prouvant la dépendance des complexes du degré d'estérification de la pectine (Schmitt *et al.*, 1998).

La distribution de charges sur la  $\beta$ -lg (Figure 6) est représentée par plusieurs régions peptidiques, riches en acides aminés chargés positivement (Asparagine, Histidine et Lysine) et négativement (Acide Glutamique et Acide Aspartique), responsables des zones chargées à la surface de la protéine.

Plusieurs études effectuées sur les interactions entre la  $\beta$ -lg et des polysaccharides anioniques ont démontré la présence d'interactions électrostatiques au-dessus du point isoélectrique de la protéine, lorsque les deux macromolécules portaient des charges nettes opposées (Weinbreck *et al.*, 2003 ; Girard *et al.*, 2004).



**Figure 6:** Répartition des charges sur la  $\beta$ -lg à pH 7 ( Protein Data Bank).

En jaunes les acides aminés chargés négativement (Asparagine, Acide Glutamique).

En rouge les acides aminés chargés positivement (Histidine, Lysine, Arginine).

En bleu les zones neutres.

#### **II-4-Utilisation alimentaire :**

Au niveau industriel, la pectine possède une position de choix quant à son utilisation comme agent texturant (gélifiant, épaississant et stabilisant), en raison de sa grande stabilité aux effets du pH acide et du traitement thermique.

La pectine est utilisée comme additif alimentaire sous le numéro E440.

Bien que de nombreuses préparations alimentaires contiennent des pectines, les produits les plus courants sont les produits à base de fruits et les produits laitiers.

Le pouvoir gélifiant des pectines est utilisé dans les produits alimentaires depuis que les premières conserves de fruits ont été élaborées, les confitures, gelées et marmelades sont des mélanges de sucre et fruits dont les composants permettent l'épaississement ou la gélification, généralement par chauffage.

En effet, le processus de chauffage détruit les enzymes des fruits, extrait la pectine, concentre le produit au point où, l'augmentation de l'acidité et la diminution de l'activité de l'eau font en sorte qu'il s'auto préserve.

Dans les préparations traditionnelles, la consistance varie considérablement d'un produit à l'autre, en fonction de la nature des fruits, de leur variété et de leur maturité, pour obtenir la même texture, (gélification, distribution des fruits dans le produit final), l'addition de pectine est nécessaire.

Le choix du type de pectine est déterminant et dépend du type de produits et du processus de préparation, car il influence la texture du produit final et le choix de la température de gélification.

Le tableau 2 présente quelques exemples d'utilisation des pectines dans les confitures, gelées et marmelades.

**Tableau 2** : Utilisation des pectines dans les confitures (Rolin, 1993).

Produit	Substances solubles %	pH	Quantité de pectine
<b><u>Confiturerie</u></b>			
Confiture à teneur élevée en sucre.	65-75	3,0-3,5	PHM 0,2-0,5%
Confiture à teneur faible en sucre.	30-75	3,1-5,5	PLM ou PA 0,5-0,8%
Gelée à teneur élevée en sucre.	65	2,9-3,2	PHM 0,4-0,8%
Préparation de fruit pour yaourt.	40-95	3,6-4,0	PLM ou PA 0,3-0,5%
Coulis de fruit.	55-65	3,0-4,0	PLM ou PA 0,3-0,6%
Confiture et Gelée résistantes au chauffage.	65-75	3,3	PHM
	45-70	3,2-3,6	PLM ou PA 0,8-1,3%
<b><u>Confiserie</u></b>			
Confiserie à base de fruits.	78	3,5	PHM 1,5%
Confiserie sans fruits.	78	4,2-4,8	PLM 2,0-2,5%

Les produits laitiers sont un autre domaine où les pectines sont souvent utilisées.

Dans les laits acidifiés tels que les yaourts à boire, les yaourts fruités, les yaourts aromatisés, etc., les caséines ont tendance à s'agréger et à précipiter du fait du pH proche de leur minimum de solubilité provoquant une synérèse (Glahn, 1982).

L'addition de la pectine stabilise la suspension des caséines (et des protéines du lactosérum), et les produits ainsi stabilisés peuvent être traités à la chaleur.

Le pH de stabilisation est compris entre les pH 3,5 et 4,2 où la pectine et la caséine ont suffisamment de charges opposées (Copenhagen Pectin Booklet B14), pour cette application, seule la PHM est appropriée (Glahn, 1982 ; Copenhagen Pectin Booklet B14).

De fortes concentrations de pectine sont nécessaires pour une bonne stabilisation, un ratio pectine-protéine de 1:5 semble être la limite de sécurité, ce qui correspond à une concentration total de 0,5 % de pectine (Copenhagen Pectin Booklet B14).

## **II-5- Rôle Physiologique :**

La pectine est un polysaccharide soluble qui n'est pas digéré par les enzymes digestives de l'homme dans la mesure où celui-ci ne les possède pas.

Elle entre ainsi dans la définition des fibres alimentaires solubles, elle possède par conséquent, les propriétés physiologiques communes à ses fibres.

Comme de nombreuses fibres alimentaires solubles, la pectine réduit le temps de vidange gastrique des repas, favorise le transit intestinal (Anderson *et al.*, 2009). Elle semble néanmoins constituer une barrière à l'action des mécanismes de digestion sur les macromolécules qu'elle fixe, empêchant leur hydrolyse et par conséquent, l'absorption des nutriments comme le glucose, certains acides aminés et des minéraux (Jenkins *et al.*, 1978 ; Torsodottir *et al.*, 1991 ; Mouecoucou *et al.*, 1993 ; Mosenthin *et al.*, 1994 ; Lamghari *et al.*, 2000 ; Blackwood *et al.*, 2000).

Ces observations ont été vérifiées par Mouecoucou (1995) par des expériences sur la digestion *in vitro*.

Une augmentation de l'excrétion azotée a également été obtenue chez les animaux ingérant des régimes contenant la pectine, ce qui se traduit par une moindre croissance des animaux (Bernier *et al.*, 1988).

La pectine possède un effet hypoglycémiant et/ou hypoinsulinémiant (Jenkins *et al.*, 1977), la consommation de grandes quantités de pectine permet une minoration des réponses

glycémique et insulémique post prandiales, favorisant à long terme un meilleur contrôle du diabète.

Il a été montré que ce hydrocolloïde agissait au niveau du métabolisme lipidique, en abaissant le taux du cholestérol sanguin (Endress, 1991), les gels pectiques entraînent une séquestration des acides biliaires, diminuant ainsi leur disponibilité, ce qui réduit la formation des micelles nécessaires à l'absorption des acides gras (Sable-Amplis et Sicart, 1990).

Une réduction de la biodisponibilité des minéraux a été observée *in vitro* et chez l'homme (Blackwood *et al*, 2000).

D'ailleurs, la capacité de la pectine à fixer les métaux hautement toxiques a été utilisée pour traiter les personnes exposées aux isotopes hautement radioactifs (Rolin, 1993).

La diminution de la digestibilité des macromolécules et de l'absorption des nutriments seraient dues à plusieurs mécanismes agissant individuellement ou conjointement.

Une augmentation de la viscosité du bol alimentaire et de l'épaisseur de la couche de mucus (couche d'eau non agitée) qui tapisse la paroi intestinale, empêcherait l'arrivée des enzymes sur leurs substrats et l'absorption des nutriments.

Une inhibition de l'activité enzymatique a plusieurs fois été démontrée, particulièrement celle des protéases digestives (pepsine, trypsine et chymotrypsine) (Schneeman et Gallaher, 1985).

Des hypothèses ont été émises sur les effets des interactions entre les polysaccharides et les protéines (substrats ou enzymes) qui limiteraient l'hydrolyse des liaisons et/ou la disponibilité de l'enzyme (Anderson, 1961; Arnal-Peyrot et Adrian, 1977).

La consommation à long terme de la pectine peut entraîner une altération de la bordure en brosse de l'intestin et une diminution de la teneur en enzymes de cette dernière.

Dans le côlon les pectines sont fermentées en acides gras volatiles, sources d'énergie pour les bactéries du côlon (Blackwood *et al*, 2000).

# **Matériels & Méthodes**

## *Deuxième chapitre*



## **I-DEMARCHE EXPERIMENTALE :**

Les études ont porté sur les effets de trois différentes pectines (PLM, PHM et PA) sur la digestibilité *in vitro* de la  $\beta$ -lg, sur l'activité de la pepsine et ainsi que sur les propriétés physico-chimiques (étude des interactions protéines-polysaccharides).

La protéolyse de la  $\beta$ -lg par la pepsine a été réalisée en présence de différentes concentrations de pectine.

Cette hydrolyse a été effectuée en reproduisant les conditions dans lesquelles se déroule la digestion gastrique *in vivo* à savoir, une diminution progressive du pH de 7 à 2 en deux heures, par addition continue de l'acide chlorhydrique.

*In vivo*, l'évolution du pH gastrique dépend du bol alimentaire et de la production acide gastrique.

Les composants du bol alimentaire neutralisent l'acidité gastrique, celle-ci diminuant progressivement (Bernier *et al.*, 1988).

Le comportement des deux macromolécules en solution durant cette évolution du pH, a été mis en évidence par une étude turbidimétrique des mélanges  $\beta$ -lg-pectines, au cours de la digestion par la pepsine.

La turbidité étant la mesure de la « limpidité relative de l'eau », n'est pas une mesure directe des matières en suspension dans la solution.

La mesure de la turbidité est proportionnelle à l'absorbance, elle correspond à la perte de lumière incidente suite à la diffusion de la lumière de l'échantillon (Kleinzen *et al.*, 1995).

La variation de la turbidité peut nous renseigner quant aux éventuelles interactions entre la  $\beta$ -lg et les pectines.

L'intérêt de la diminution progressive du pH, pendant la digestion peptique, est de suivre le comportement de la protéine et du polysaccharide à différents pH.

Une mesure de l'activité de la pepsine en présence de pectines a été opérée dans le but de vérifier toute modification de l'activité enzymatique par la présence des pectines.

## **II-Matériels :**

La  $\beta$ -Lg sous forme de poudre a été fournie par le centre de recherche de Bresnier-Bridel (Retiers, France).

La composition de cette poudre (Tableau 3) a été déterminée par des analyses physico-chimiques :

- La teneur en protéines par la méthode standard de dosage de Kjeldahl (AOAC). Le calcul de la teneur en protéines à partir de la teneur en azote a été réalisé en multipliant la teneur en azote par un facteur de conversion de 6,38 pour la  $\beta$ -lg.
- La teneur en lactose a été évaluée par la méthode Polarimétrique, après défécation à l'aide du ferrocyanure de potassium et de l'acétate zinc et l'estimation de la teneur en lactose par une lecture (rotation optique), réalisée avec un Polarimètre ATAGO POLAX-2L.
- L'humidité est mesurée par pesée et étuvage à 103°C jusqu'à obtention d'une masse de poudre constante.
- Le taux de cendres a été obtenu par calcination des poudres dans des creusets de porcelaine placés au four à mouffles durant une nuit à 550°C.

**Tableau 3 :** Analyses physico-chimiques des poudres de  $\beta$ -lg (g/100 g de poudre).

	<b>Humidité</b>	<b>Protéine</b>	<b>Lactose</b>	<b>Cendres</b>
<b><math>\beta</math>-lg</b>	<b>4,75</b>	<b>90,92</b>	<b>3,85</b>	<b>0,4</b>

Les pectines sous forme de poudre proviennent du Laboratoire Degussa Texturant Systems (Boulogne-Billancourt, France), leurs principales caractéristiques sont présentées dans le tableau 4 (fiche technique en annexe).

**Tableau 4:** Caractéristiques des poudres de pectines (Degussa Texturant Systems).

	<b>Pectine Hautement Estérifiée <i>HMP</i></b>	<b>Pectine Faiblement Estérifiée <i>LMP</i></b>	<b>Pectine Amidée Faiblement Estérifiée <i>PA</i></b>
<b>Référence</b>	<b>AYD 250</b>	<b>OB 800</b>	<b>AMP 805</b>
<b>Degré d'estérification</b>	<b>69 à 74%</b>	<b>37 à 41%</b>	<b>30 à 37%</b>
<b>Degré d'amidation</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>14 à 18 %</b>
<b>Composition (g/100 g de poudre)</b>			
<b>Taux d'humidité</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>11</b>
<b>Protéines</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>Polysaccharides</b>	<b>88</b>	<b>87</b>	<b>47</b>
<b>Lipides</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

La pepsine provient de la muqueuse gastrique de porc : EC 3.4.23.1, 1 : 60000, activité : 2500 U/mg de protéine (Sigma, P-7012).

L'hémoglobine bovine (Hemo) et le thimerosal sont des produits Sigma (H-2625 et T5125 respectivement).

### **III-Protocole Expérimental :**

#### **III-1-Préparation des solutions $\beta$ -lg-Polysaccharide :**

La  $\beta$ -lg est dissoute dans du tampon phosphate (0,17 M ; pH 7), à raison de 1,7 g/100 ml soit 250 mg de protéine.

Les pectines sont également dissoutes dans le tampon phosphate (0,17 M, pH 7) à la même concentration (1,7 g/100 ml).

Les solutions sont laissées au repos à 4°C pendant une nuit pour permettre une bonne hydratation des macromolécules.

Le mélange protéine-pectines est ensuite réalisé de manière à obtenir des solutions à 0 ( $\beta$ -lg seule), 1, 10, 20, 30 et 50 % (p/p) en concentrations de pectines.

Pour les études turbidimétrique et de la viscosité les solutions de  $\beta$ -lg et/ou de pectines sont préparées selon le même protocole cité auparavant, mais avec une concentration de 0,85 g/100 ml de  $\beta$ -lg ou de pectine dissoute dans du tampon phosphate (0,17 M, pH 7).

Le mélange protéine- pectines est ensuite réalisé de façon à obtenir des solutions à 0 et 50 % (1 :1, p/p) de pectines.

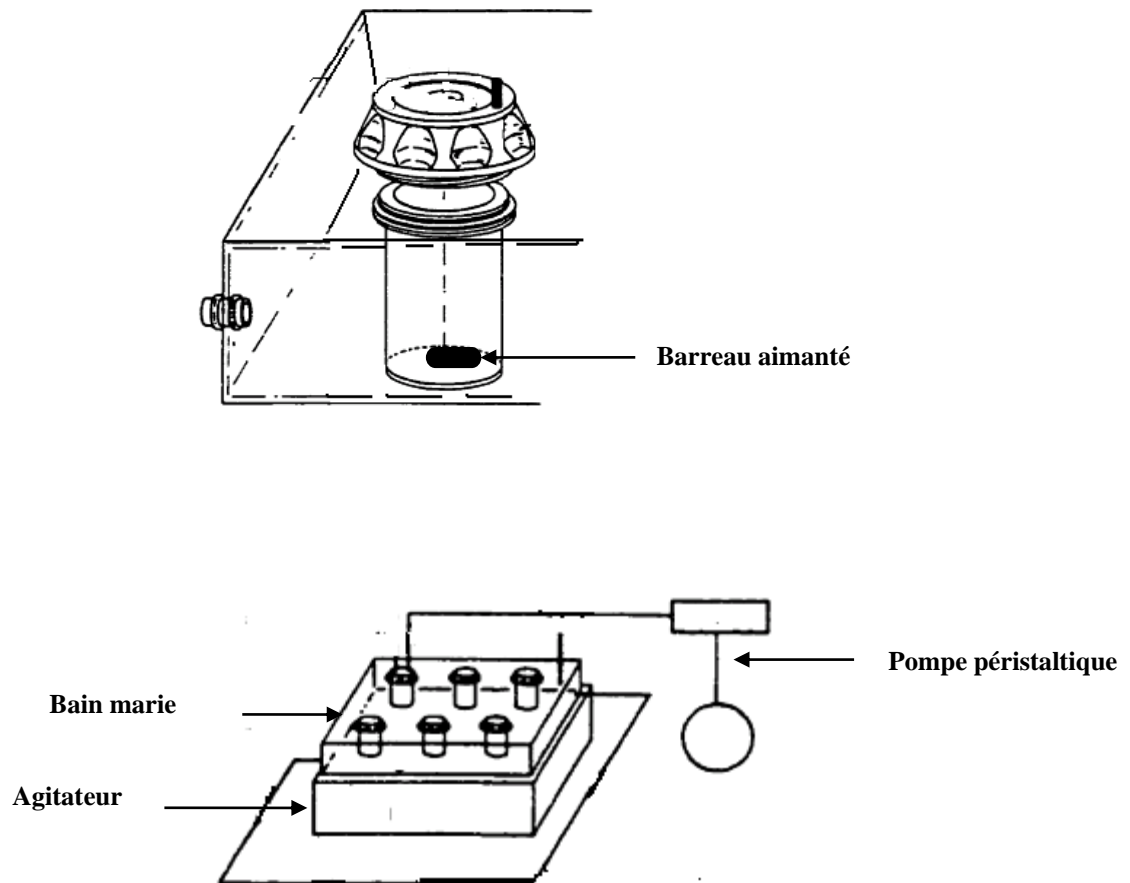
Le thimerosal est ajouté à l'ensemble des préparations (50 $\mu$ g/l), pour prévenir toute contamination bactérienne.

#### **III-2-Hydrolyse de la $\beta$ -lg par la pepsine :**

Des échantillons de 15 ml de solution décrites précédemment, sont ajustés à pH 7 à l'aide de NaOH 2N ou HCl 1N, puis est ajouté 1ml de pepsine dissoute dans du HCl 0,02N (1 mg/ ml) (E/S, 1/250).

Afin de reproduire *in vitro* (Figure 7) la digestion gastrique, les échantillons sont mis au bain marie à 37°C et la baisse progressive du pH observée «*in vivo* » dans l'estomac de 7 à 2, est réalisée par l'addition continue d'une solution de HCl à 0,02N à l'aide d'une pompe péristaltique Ecoline, avec un débit de 80  $\mu$ l/min;et avec agitation constante.

La digestion est arrêtée à différents pH (5, 4, 3 et 2), en précipitant les protéines avec de l'acide trichloracétique (TCA) 30 % (v/v).



**Figure 7** : Schéma du dispositif de digestion *in vitro*.

Après une centrifugation à 5000 g pendant 20 min, à l'aide d'une centrifugeuse Beckman Coulter.

10 ml du surnageant sont récupérés pour effectuer le dosage de l'azote soluble par la méthode de Kjeldhal, suivant la méthode standard de l'AOAC.

Le pourcentage (%) d'azote (N) dans le surnageant est obtenu par le calcul suivant:

$$\% \text{ d'azote dans le surnageant} = \frac{\text{N dans le surnageant (mg)}}{\text{N dans l'échantillon de protéine (mg)}} \times 100$$

### **III-3-Etude de la turbidité :**

Un volume de 150 ml de solution de  $\beta$ -lg et de pectine seule (PLM, PHM, PA) ou de mélange  $\beta$ -lg-pectine, préalablement ajusté à pH 7 est placé dans un bécher, celui-ci est mis dans un bain marie à 37°C, avec agitation constante assurée par un agitateur magnétique.

L'addition de 5 ml de pepsine est réalisée dans certains échantillons.

Le pH du mélange est amené progressivement de 7 à 2 en deux heures par l'apport continu d'une solution de HCl 0,02 N, grâce à une pompe péristaltique Ecoline, avec un débit de 80  $\mu$ l/min.

Une sonde turbidimétrique NEP 160 ANALITE (Figure 8) est plongée dans la solution, l'enregistrement de la variation de la turbidité est en fonction du temps (chaque 10 s pendant 2 heures) et du pH.



**Figure 8** : Turbidimètre portable NEP 160 ANALITE.

L'expérimentation est arrêtée lorsque le milieu atteint le pH 2. La mesure de la turbidité au cours de la diminution progressive du pH (de pH 7 à 2) est effectuée sur les échantillons suivants :

- $\beta$ -lg seule en présence ou non de pepsine.
- Pectines (PLM, PHM et PA) en présence ou non de pepsine.
- Mélanges  $\beta$ -lg-pectines (1 : 1) en présence ou non de pepsine.

### **III-4-Mesure de l'activité enzymatique de la pepsine :**

La mesure de l'activité de l'enzyme est réalisée selon la méthode de Ryle (1984), en utilisant l'hémoglobine bovine comme substrat.

L'hémoglobine (2g) est dissoute dans un volume de 100 ml contenant 75 ml de tampon phosphate (0,17M ; pH 7) et 25 ml de HCl 0,007N ; le pH est alors ajusté à 2 à l'aide de NaOH 2N ou HCl 1N.

La pectine (PLM, PHM, PA) est dissoute dans la même solution (75 ml de tampon phosphate et 25 ml de HCl), à la même concentration (2 g/100 ml de solution).

Les mélange Hemo et Hemo-polysaccharide sont effectués de façon à obtenir des solutions d'hémoglobine seule (0), à 1 et 50 % de pectine (p/p).

Un volume de 0,2 ml de pepsine (0,003 mg/100 ml de HCl 0,03N) est ajouté à 1ml de solution Hemo et Hemo-polysaccharide, après agitation, les échantillons sont placés au bain-marie à 37°C.

Des prélèvements sont effectués toutes les minutes pendant 10 minutes, puis à 15min, la réaction d'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine est arrêtée par l'addition de 5 ml TCA à 4 %.

Après une centrifugation de 10 minutes à 1000 g, la lecture de l'absorbance du surnageant est faite à 280 nm contre un blanc (eau), grâce à un spectromètre Beckman.

Le calcul de l'activité enzymatique a été effectué comme suit :

$$\text{Activité enzymatique } (\mu\text{mol/min}) = \frac{\Delta A}{\epsilon \Delta t}$$

$\Delta A$  : Variation de l'absorbance.

$\epsilon$  : Coefficient d'adsorption.

$\Delta t$  : Variation du temps (min).

**III-5-Etude de la viscosité :**

Les mesures de la viscosité des solutions de  $\beta$ -lg, de pectine (PLM, PHM, PA) ou de mélange  $\beta$ -lg-pectine, préalablement ajusté à pH 2 (préparées selon le même protocole que celui de l'étude turbidimétrique), sont effectuées à l'aide d'un rhéomètre à contrainte imposée avec une contrainte allant de  $1764 \cdot 10^{-5}$  à  $1,697 \text{ N/m}^2$ .

**IV-Traitement statistique :**

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. Ils sont comparés par une analyse de variance à une voie (ANOVA, Statview V).

La différence entre les moyennes a été faite à l'aide du test de Fisher à  $p < 0,05$ .



# Résultats

*Troisième chapitre*

## **I-Hydrolyse de la $\beta$ -lg par la pepsine :**

Les tableaux 5, 6 et 7 représentent le pourcentage d'azote dans le surnageant après hydrolyse de la  $\beta$ -lg associée ou non à différents types de pectine (PLM, PHM, PA) en fonction du pH du milieu.

L'hydrolyse de la  $\beta$ -lg seule, en absence de pectine, par la pepsine libre dans le surnageant de l'azote soluble ce qui correspond au taux d'hydrolyse de cette protéine.

La digestibilité de la  $\beta$ -lg seule par la pepsine est très faible et croit en fonction du pH du milieu.

Le taux d'hydrolyse est significativement plus élevé ( $P < 0,001$ ) à pH 2, par rapport à ceux obtenus aux autres pH.

L'ajout des pectines a modifié le taux d'azote dans le surnageant, selon la nature et la concentration de la pectine dans mélange.

Nous avons émis l'hypothèse que cet azote n'est pas de l'azote soluble. Pour cette raison nous parlerons d'azote dans le surnageant quand l'hydrolyse a été effectuée en présence de polysaccharides.

La PLM (tableau 5) provoque une diminution significative ( $P < 0,001$ ) de l'azote dans le surnageant, quand elle est présente à 1 et 10 %.

A 20 et 30 % de PLM, le taux N dans le surnageant est plus élevé à pH 5, puis diminue à partir de pH 4, reste plus faible que la valeur obtenue avec la  $\beta$ -lg seule.

Le % d'N dans le surnageant obtenu quand la pectine est présente à 50 % est significativement élevé ( $P < 0,001$ ) quelque soit le pH, par rapport à la  $\beta$ -lg seule.

**Tableau 5 :** Influence des différentes concentrations de la PLM sur la digestibilité de la  $\beta$ -lg en présence de pepsine (%).

<b>Concentrations de la Pectine Faiblement Estérifiée (PLM) (%)</b>						
<b>pH</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>1,3 ± 0,15</b>	<b>0,98 ± 0,09</b>	<b>1,05 ± 0,01</b>	<b>1,91 ± 0,08</b>	<b>2,43 ± 0,02</b>	<b>2,24 ± 0,02</b>
<b>4</b>	<b>1,32 ± 0,04</b>	<b>1,00 ± 0,05</b>	<b>1,23 ± 0,06</b>	<b>0,78 ± 0,01</b>	<b>0,83 ± 0,02</b>	<b>2,42 ± 0,02</b>
<b>3</b>	<b>1,61 ± 0,04</b>	<b>1,28 ± 0,05</b>	<b>1,12 ± 0,01</b>	<b>1,19 ± 0,09</b>	<b>1,48 ± 0,04</b>	<b>3,58 ± 0,03</b>
<b>2</b>	<b>2,07 ± 0,14</b>	<b>1,36 ± 0,02</b>	<b>1,31 ± 0,01</b>	<b>1,15 ± 0,02</b>	<b>1,85 ± 0,05</b>	<b>4,44 ± 0,09</b>

L'addition de 1, 10 et 30 % de la PHM à la  $\beta$ -lg (tableau 6) ne présente pas de différence significative de l'azote dans le surnageant par rapport à la  $\beta$ -lg seule quelque soit le pH.

En revanche, une augmentation de l'azote dans le surnageant est observée à des taux de 20 et 50 % de PHM, et ce à partir de pH 5.

Le taux d'azote dans le surnageant augmente fortement aux pH 4, 3 et 2 en présence de 50 % de PHM.

**Tableau 6** : Influence des différentes concentrations de la PHM sur la digestibilité de la  $\beta$ -lg en présence de pepsine (%).

Concentrations de la Pectine Hautement Estérifiée (PHM) (%)						
pH	0	1	10	20	30	50
5	1,3±0,15	1,96±0,44	1,52±0,25	1,29±0,07	1,47±0,21	2,04±0,08
4	1,32±0,04	1,55±0,05	1,19±0,10	1,25±0,04	1,43±0,03	2,68±0,20
3	1,61±0,04	1,25±0,16	1,52±0,14	1,64±0,24	1,81±0,63	3,94±1,13
2	2,07±0,14	1,85±0,03	1,71±0,11	2,81±0,46	1,97±0,31	5,22±0,24

La pectine amidée (PA) associée à la  $\beta$ -lg à des concentrations de 1 et 10 % entraîne une baisse du taux d'azote dans le surnageant (tableau 6), cependant des concentrations de PA à 20, 30 et 50 %, provoquent une augmentation des taux d'azote dans le surnageant, significative ( $P < 0,001$ ) uniquement pour 30 et 50 %.

**Tableau7** : Influence des différentes concentrations de la PA sur la digestibilité de la  $\beta$ -lg en présence de pepsine (%).

Concentrations de la Pectine Amidée Faiblement Estérifiée (PA) (%)						
pH	0	1	10	20	30	50
5	1,3±0,15	1,29±0,13	1,53±0,09	1,94±0,16	2,78±0,43	3,90 ± 0,08
4	1,32±0,04	1,20±0,04	1,44±0,04	1,86± 0,11	2,34±0,06	3,83 ± 0,35
3	1,61±0,04	1,21±0,07	1,58±0,09	1,91 ± 0,16	2,62± 0,13	4,51± 0,27
2	2,07±0,14	1,61±0,14	2,05±0,05	2,33±0,07	3,10±0,21	6,65± 0,82

D'une manière générale, la présence des trois pectines à des concentrations de 1 et 10 % n'a aucun effet sur le taux d'azote dans le surnageant.

A 20 et 30 %, seule la PA provoque une augmentation de l'azote dans le surnageant quelque soit le pH.

Pour l'ensemble des pectines, l'azote dans le surnageant augmente en présence de 50 % de pectines, quelque soit le pH considéré.

La diminution ou l'augmentation du taux d'azote et l'importance de ces phénomènes sont étroitement liées au type de pectine.

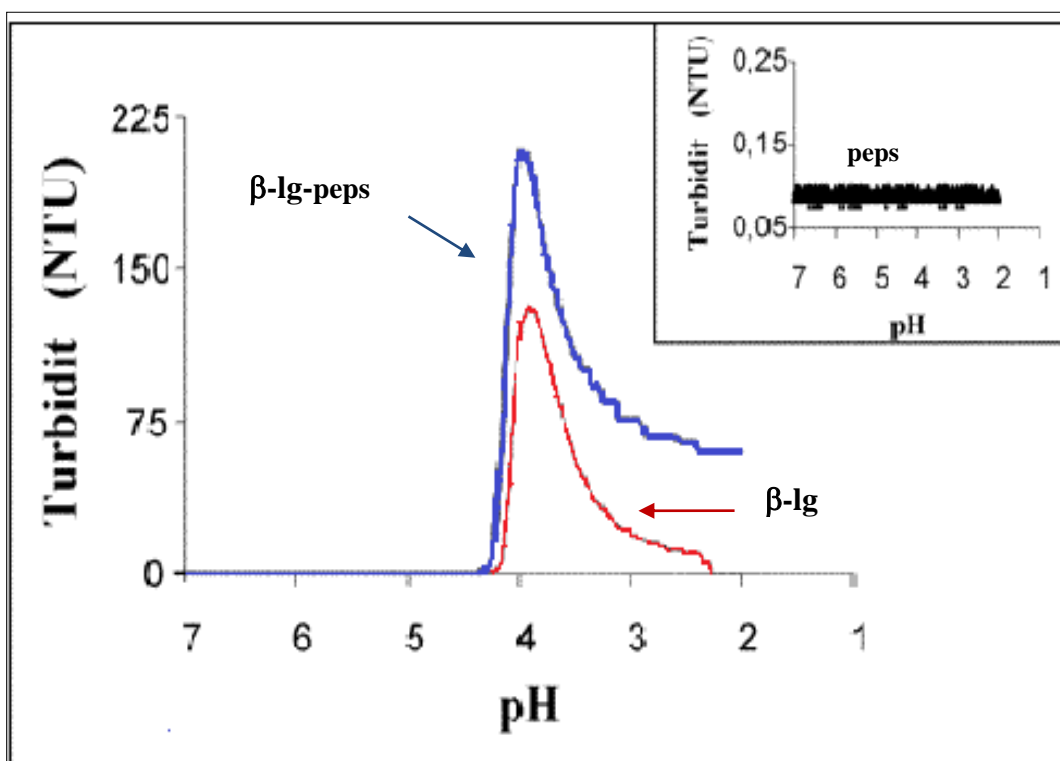
La baisse de libération de l'azote par la PLM est plus importante que celle pour la PHM et la PA.

Inversement proportionnelle l'augmentation de libération est plus importante de pour la PA qu'avec la PHM et la PLM.

## **II-Etude de la turbidité :**

Le but de l'étude est de mettre en évidence si réellement, il y a interactions entre la  $\beta$ -lg et Les différentes pectines (PHM, PLM, PLA).

Les figures 9, 10,11 et 12 représentent la variation de la turbidité en fonction du pH.



**Figure 9:** Evolution de la turbidité de la  $\beta$ -lg en fonction du pH.

Nous constatons que le comportement de la  $\beta$ -lg en présence ou en absence de pectines (PHM, PLM, PA) est le même, et que les courbes obtenues ont la même allure quelque soit la pectine ajoutée à la  $\beta$ -lg, soit une augmentation jusqu'à atteindre un pic à pH 3,8 ; par la suite les courbe amorcent une chute progressive jusqu'à pH 2.

De pH 7 à 5, la turbidité de la solution de  $\beta$ -lg en présence ou non de pepsine est nulle, celle-ci augmente en dessous de pH 5, pour atteindre rapidement un maximum aux alentours de pH 3,8.

Le pic de turbidité de la solution de  $\beta$ -lg sans pepsine (125 NTU) est beaucoup moins important, que celui de la solution de  $\beta$ -lg au cours de la digestion par la pepsine (208 NTU).

En dessous de pH 3,8 ; la turbidité diminue, quand la  $\beta$ -lg est digérée par la pepsine (51NTU à pH 2), en revanche, en absence de pepsine, la turbidité de la solution de  $\beta$ -lg retrouve sa valeur de départ avant d'atteindre le pH 2.

La turbidité de la solution de la pepsine seule ne présente aucune variation quelque soit le pH considéré

La présence des pectines modifie l'évolution de la turbidité des solutions contenant la  $\beta$ -lg, à pH inférieur à 5, la turbidité des mélanges est très faible comparée à celle de la  $\beta$ -lg avec ou sans pepsine.

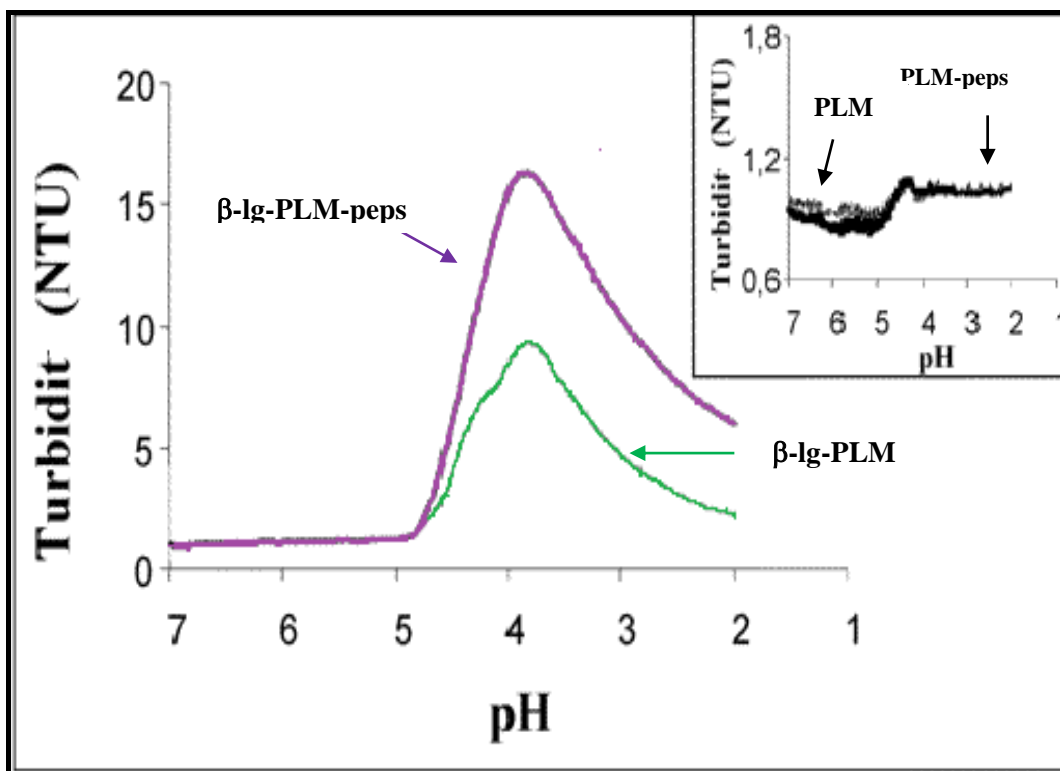
Le maximum de turbidité pour les mélanges  $\beta$ -lg-pectine avec/ou sans pepsine, est significativement plus bas ( $P < 0,001$ ), en comparaison avec la turbidité de la solution de  $\beta$ -lg sans pectine avec/ ou sans digestion par la pepsine (Tableau 8).

**Tableau 8:** Variation de la Turbidité (NTU) de la  $\beta$ -lg à pH 3,8 en fonction du type de Pectines et de la présence ou non la Pepsine.

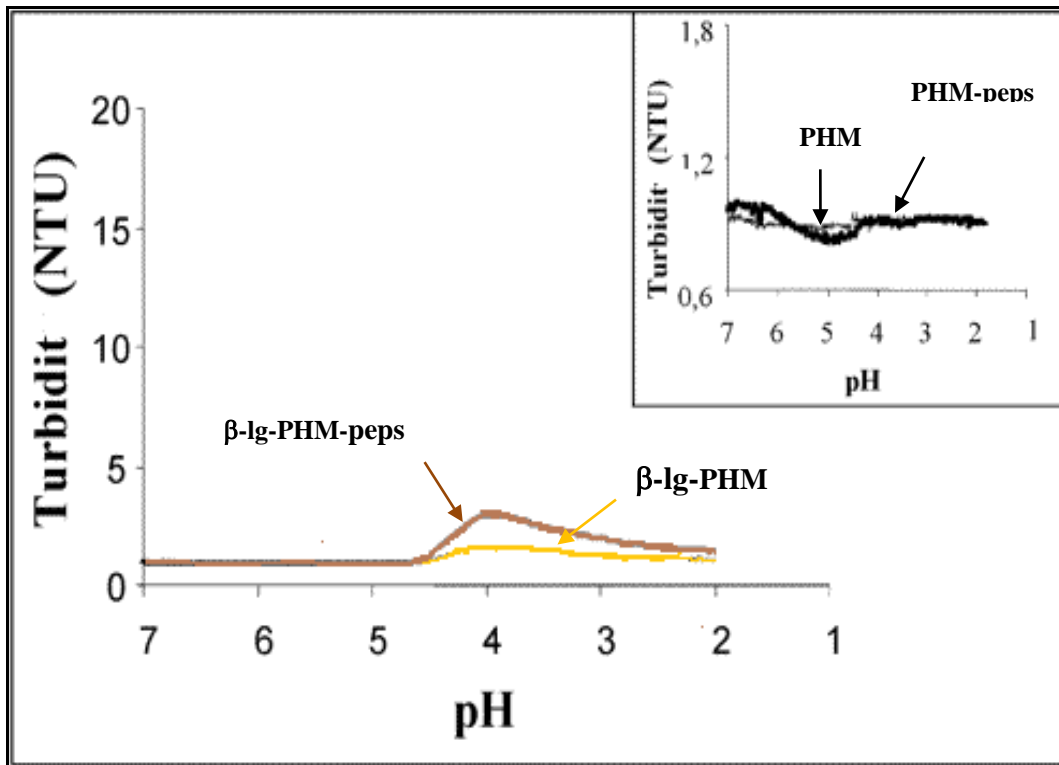
		PLM	PHM	PA
$\beta$ -lg	125±10,46	9,3±0,53	1,7±0,11	8,01±0,44
$\beta$ -lg-pepsine	208±39,6	16,32±0,22	2,98±0,04	8,84±0,5

En présence de l'enzyme, le mélange  $\beta$ -lg-pectine (PLM, PHM ou PLA), on note une diminution de la turbidité à pH 3,8; plus importante avec la PHM, suivie de la PA, puis de la PLM, mais pour les mêmes associations sans pepsine, la turbidité reste inférieure à celles en présence de la pepsine.

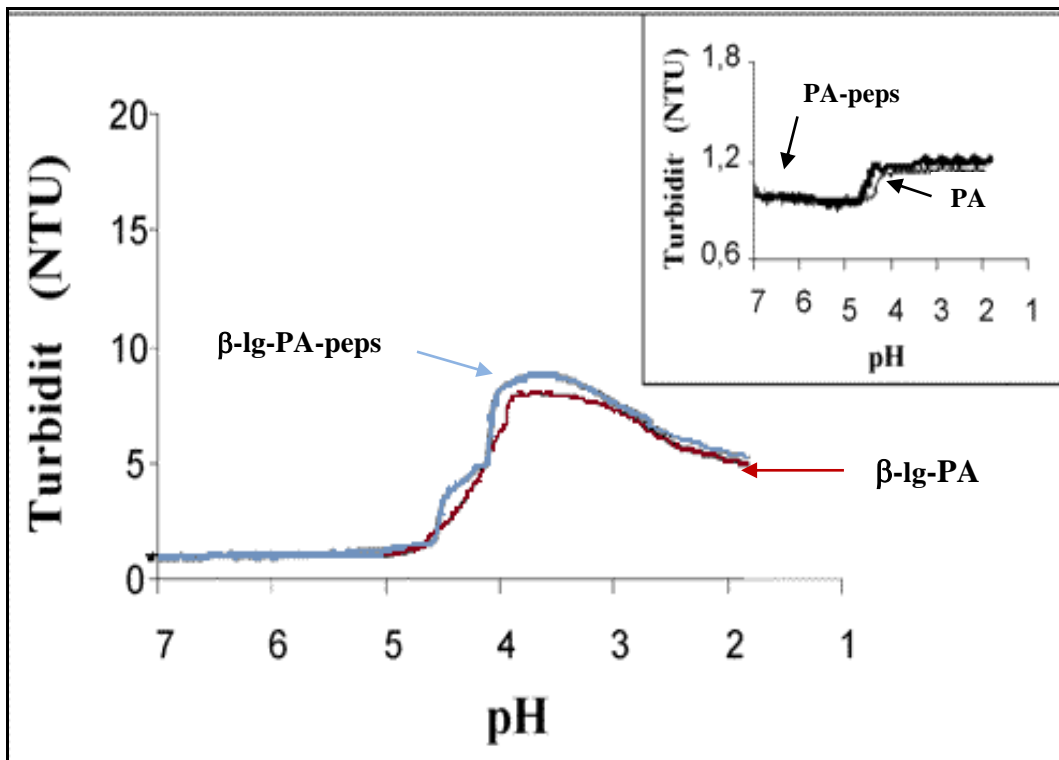
Les pectines seules ou en présence de pepsine ne modifient pas de manière significative la turbidité de la solution quelque soit le pH ; donnant des courbes linéaires avoisinantes le 1, ceci indique que la turbidité ne change pas entre pH 7 et 2 quelque soit la pectine étudiée.



**Figure 10 :** Effet de la PLM sur l'évolution de la turbidité de la  $\beta$ -lg en fonction du pH.



**Figure11** : Effet de la PHM sur l'évolution de la turbidité de la  $\beta$ -lg en fonction du pH.



**Figure12**: Effet de la PA sur l'évolution de la turbidité de la  $\beta$ -lg en fonction du pH.

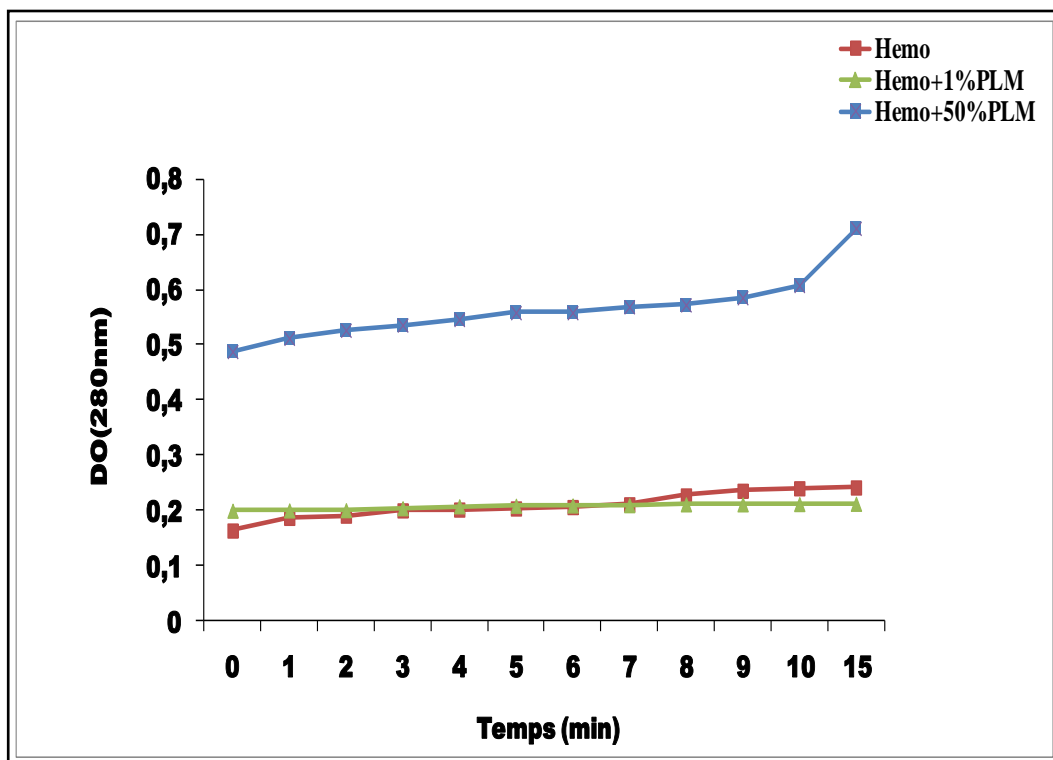
### III-Etude de l'activité enzymatique de la pepsine :

Les résultats représentés dans les figures 13 ,14 et 15, montrent que les courbes de la DO augmentent progressivement.

Pour les pectines PLM, PHM et PA, l'addition de 1% à l'hémoglobine, ne semble pas modifier la DO, en effet les DO obtenues pour 1% se rapprochent de celles obtenues pour les essais réalisés avec l'hémoglobine seule.

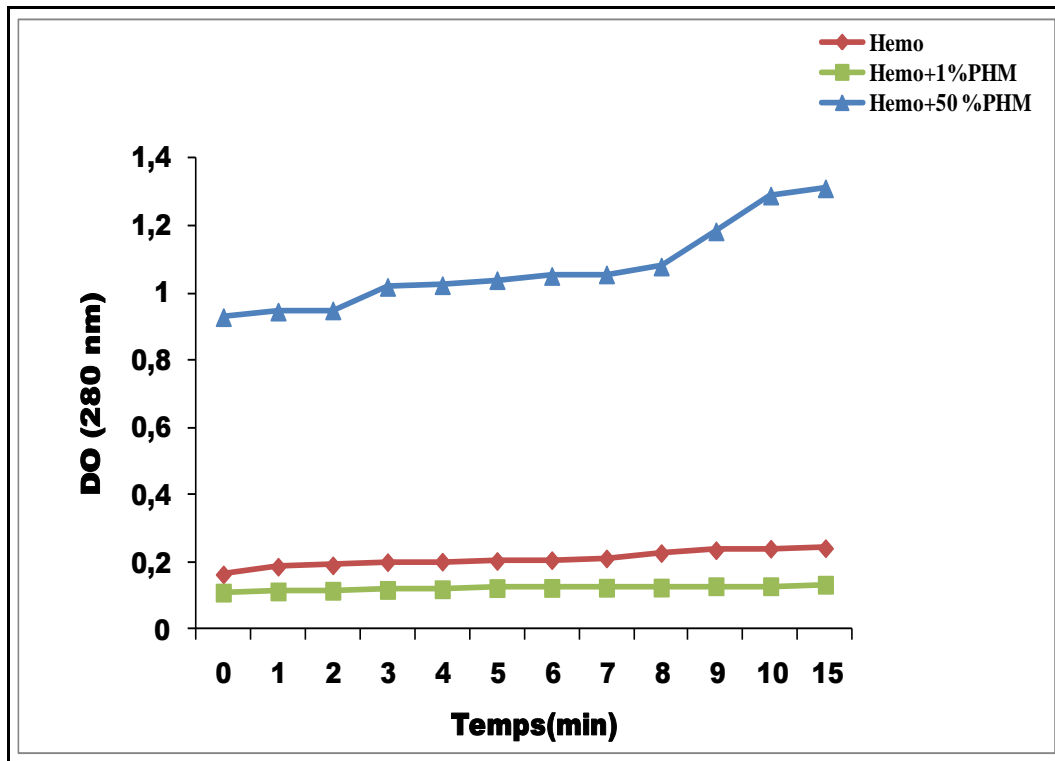
Néanmoins lorsque l'hémoglobine est associée à 50% de pectine (PHM et PLM) les DO sont supérieures aux DO obtenues pour l'hémoglobine seule et pour 1% de PHM et de PLM, avec des valeurs plus importantes pour la PHM.

Mais pour la pectine PA à 50%, les DO sont légèrement supérieures aux DO mesurées pour l'hémoglobine.

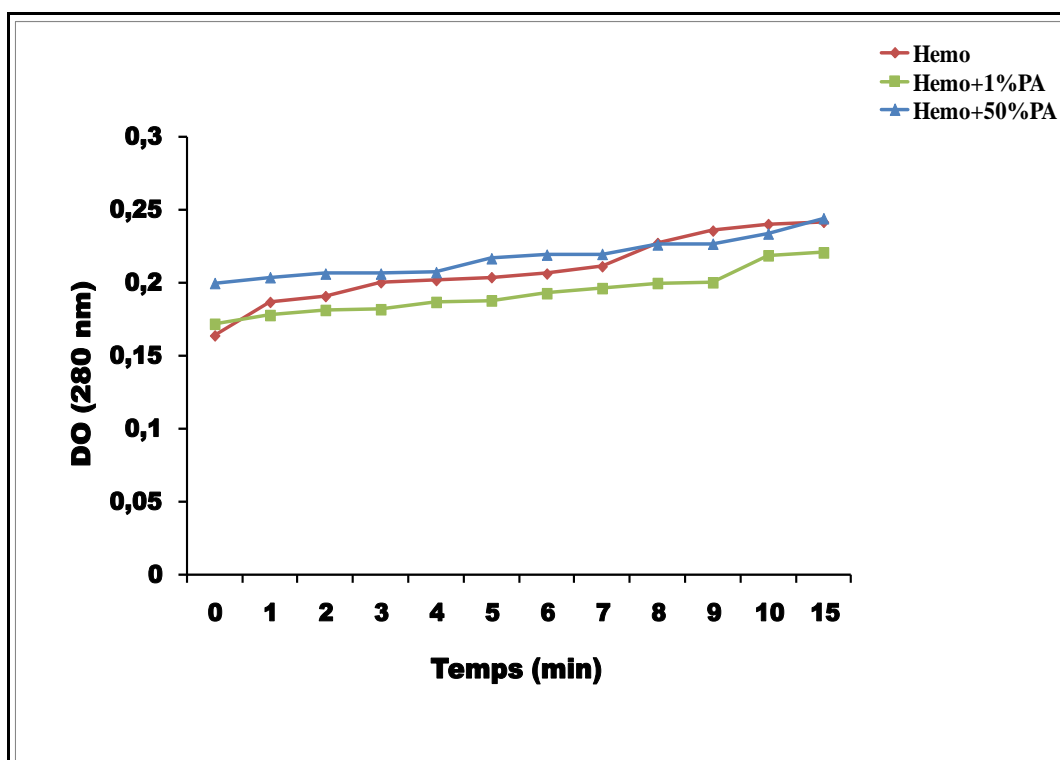


**Figure13 : Evolution de l'absorbance en présence de la PLM en fonction du temps.**





**Figure14** : Evolution de l'absorbance en présence de la PHM en fonction du temps.



**Figure15** : Evolution de l'absorbance en présence de la PA en fonction du temps.

L'influence des pectines sur l'activité enzymatique de la pepsine est rapportée dans le tableau 9.

**Tableau 9 :** Effet de la PLM, de la PHM et de la PA sur l'activité enzymatique de la pepsine ( $\mu\text{moles /min}$ ).

Concentrations de pectines	PLM	PHM	PA
0%	0,383±0,021	0,383±0,021	0,383±0,021
1%	0,327±0,041	0,408±0,037	0,361±0,037
50%	0,206±0,023	0,274±0,032	0,315±0,019

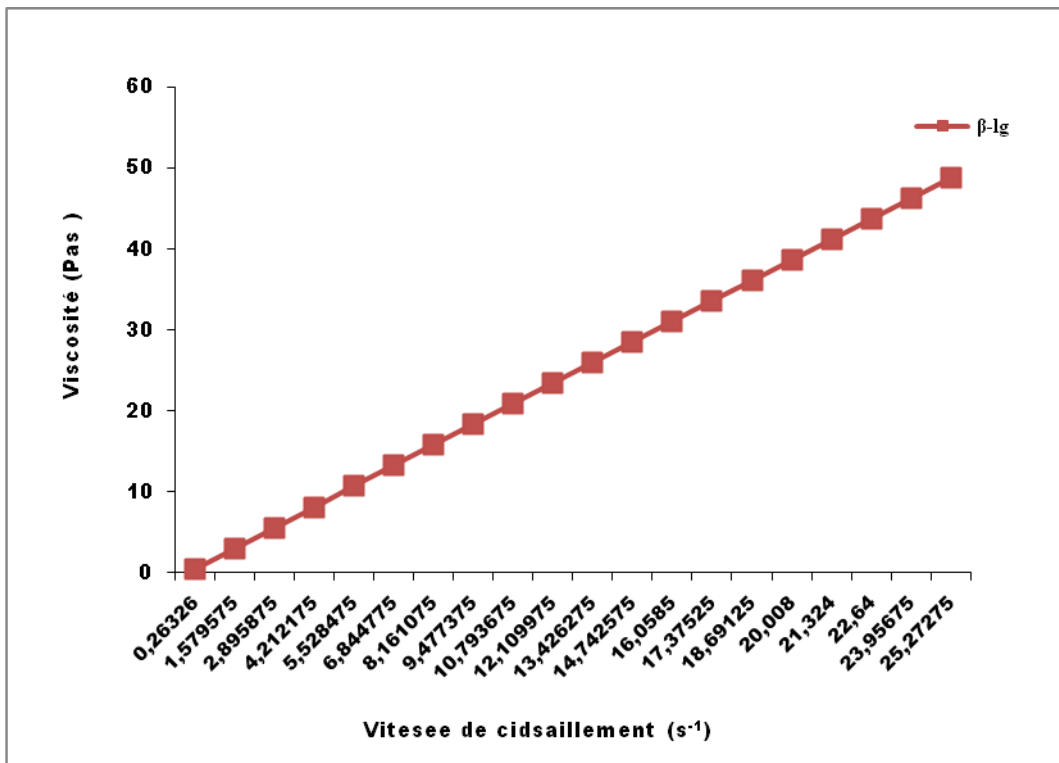
L'activité enzymatique de la pepsine est de 0,383  $\mu\text{mol/min}$  pour la digestion de l'hémoglobine seule, l'addition de 1% de pectine (PLA, PHM et PA) à l'hémoglobine, n'affecte pas l'activité enzymatique de la pepsine, cependant l'activité de l'enzyme est inhibée ( $P < 0,05$ ) lorsque l'hémoglobine est associée à 50% de pectine (PHM et PLM, PA).

La réduction de l'activité de la pepsine était plus importante avec PLM suivi de la PHM et enfin de la PA

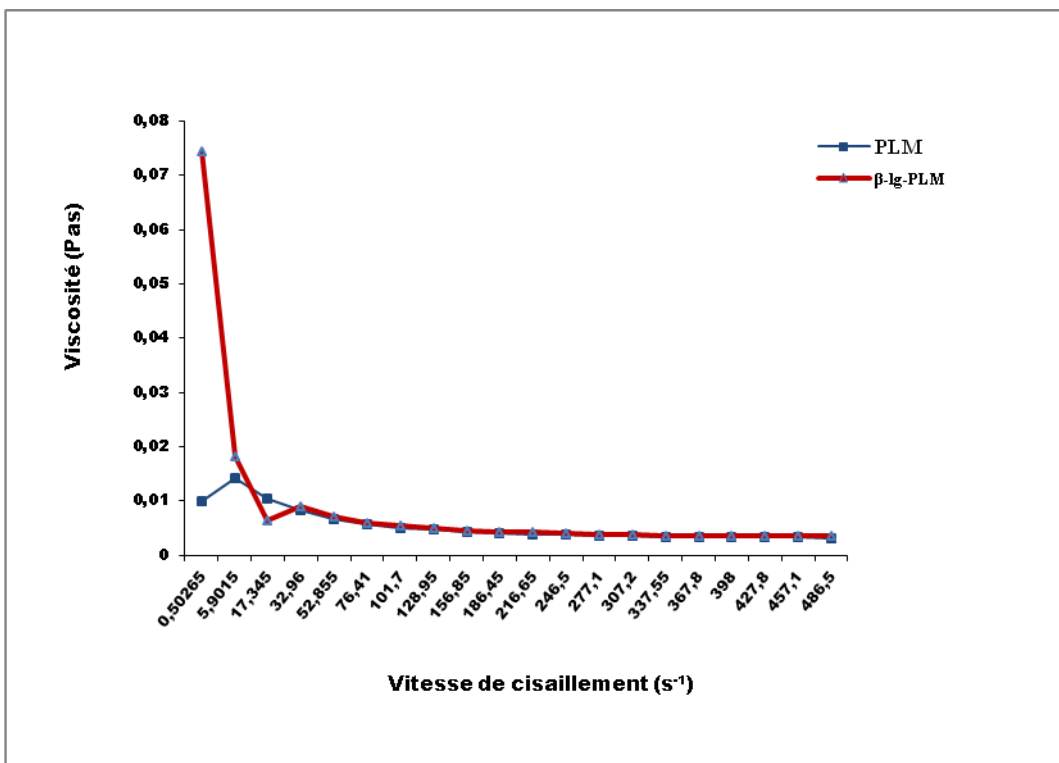
#### **IV- Etude de la viscosité :**

Les résultats obtenus (Figures16, 17,18 et 19), lors de l'étude du comportement d'écoulements des solutions  $\beta$ -lg et/ou pectine (PLM, PHM, PA) ont révélé une viscosité qui diminue lorsque la vitesse de cisaillement augmente ,soit un caractère rhéofluidifiants des mélanges  $\beta$ -lg et/ ou pectine (PLM,PHM,PA) ou des solutions de pectine seule.

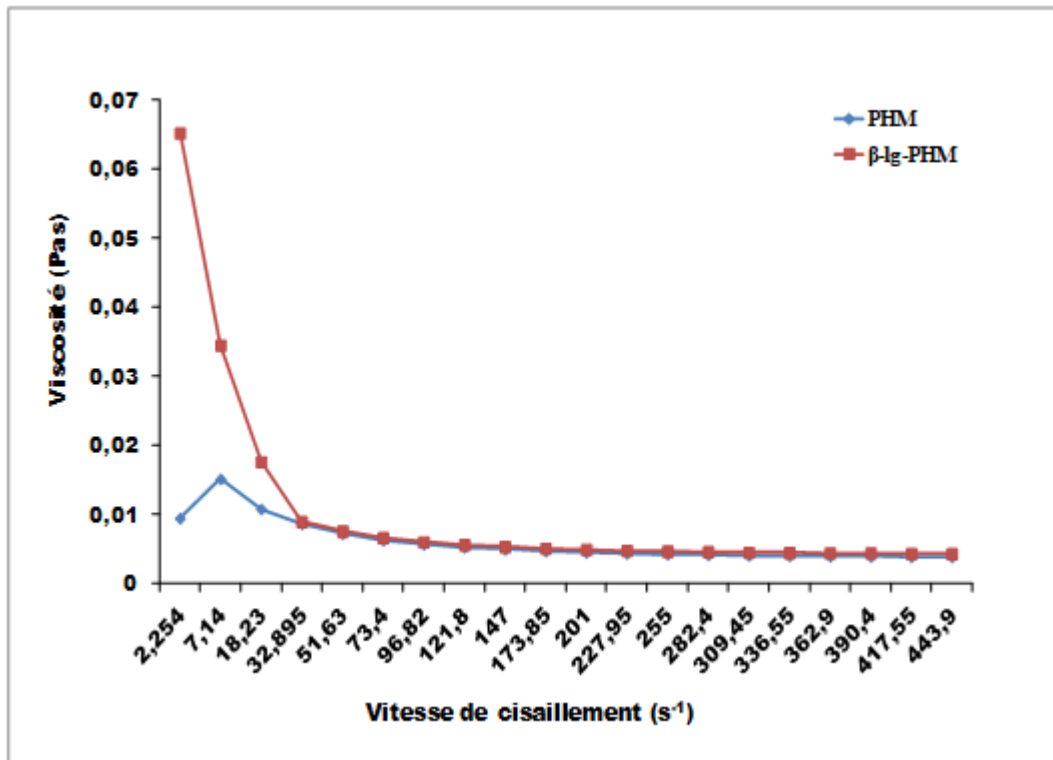
Tandis que pour la protéine seule, la courbe est sous forme d'une droite indiquant que la viscosité augmente au même titre que la vitesse de cisaillement ce qui reflète le caractère newtonien de la solution.



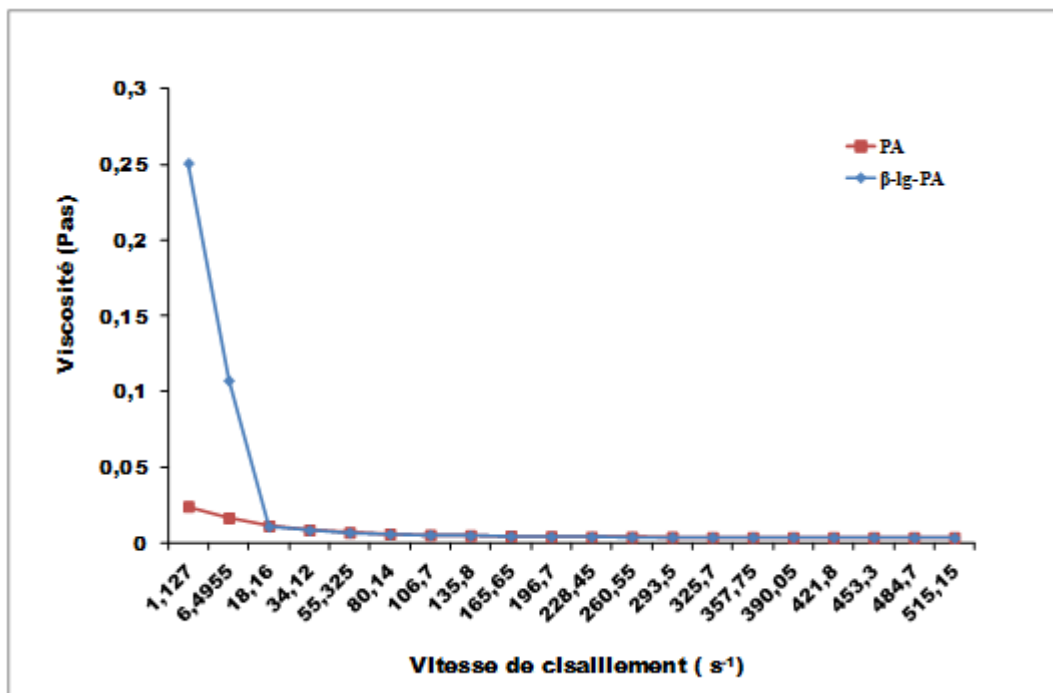
**Figure16** : Evolution de la viscosité de la  $\beta$ -Ig en fonction de la vitesse de cisaillement.



**Figure17** : Evolution de la viscosité de la PLM et de la  $\beta$ -Ig-PLM en fonction de la vitesse de cisaillement



**Figure18 :** Evolution de la viscosité de la PHM et de la β-Ig-PHM en fonction de la vitesse de cisaillement.



**Figure19 :** Evolution de la viscosité de la PA et de la β-Ig-PA en fonction de la vitesse de cisaillement.

# **Discussion**

*Quatrième chapitre*

## DISCUSSION

Nos résultats montrent une faible hydrolyse de la  $\beta$ -lg par la pepsine en absence de polysaccharides, avec une activité maximum, sous sa forme monomérique à pH 2, et sont en accord avec ceux obtenus par différents auteurs, Reddy *et al.*, (1988), Asselin *et al.*, (1988), Schmidt et Poll, (1991), qui ont montré *in vitro*, une résistance de la  $\beta$ -lg à l'hydrolyse par la pepsine en utilisant d'autres méthodes expérimentales.

*In vivo*, des auteurs ont retrouvé chez l'homme et chez l'animal que la  $\beta$ -lg est intacte après son passage dans l'estomac, ce qui prouve encore la résistance de cette protéine à l'hydrolyse par la protéase gastrique (Miranda et Pelissier, 1983 ; Yvon *et al.*, 1984).

La pepsine est une protéase acide avec un pH optimum d'activité à 2, elle hydrolyse les liaisons entre deux acides aminés aromatiques la tyrosine et la phénylalanine.

La  $\beta$ -lg contient environ 50 liaisons de ce type, mais celles-ci sont localisées dans le cœur hydrophobe de la protéine et sont donc inaccessibles à l'enzyme (Chobert *et al.*, 1995).

Kella et Kinsella (1988) suggèrent aussi que la stabilité de la  $\beta$ -lg aux pH acides serait due à une augmentation des liaisons hydrogènes internes entre deux groupes carboxyles ou entre un carboxyle et un groupe amide, ce qui expliquerait aussi la faible hydrolyse pepsique (stabilité de la conformation à pH 2).

La présence de pectines à faible concentration a peu d'effet sur l'hydrolyse de la  $\beta$ -lg. En revanche, le taux d'azote dans le surnageant augmente quand les pectines sont présentes à une concentration de 50 % et ce dès le pH 5.

Nous pensons que cette augmentation n'est pas due à une meilleure hydrolyse de la  $\beta$ -lg mais plutôt à une mauvaise précipitation de la protéine par le TCA, en présence de concentration élevée de pectines, en raison des possibles interactions entre protéine et polysaccharide

A pH 5, la pepsine est peu active, l'augmentation de l'azote dans le surnageant ne peut donc s'expliquer par ce mécanisme.

La  $\beta$ -lg et les pectines peuvent former des interactions électrostatiques à différents pH et des expériences ont montré un maximum d'interactions à des taux de 50 % (ratio 1 :1) (Schmitt *et al.*, 1998).

Ces interactions sont pH dépendants et on observe une augmentation de l'azote dans le surnageant avec l'acidité.

Le pHi de la  $\beta$ -lg est 5,2 et notre expérience est réalisée en dessous de ce pHi où la protéine présente un excès de charges positives.

Le pHi des pectines est aux alentours de 3. Aux  $\text{pH} > 3$ , les pectines, polysaccharides anioniques ayant des charges négatives, des interactions électrostatiques peuvent donc se produire dans la gamme de pH où les deux macromolécules portent des charges opposées ( $\text{pHi protéine} > \text{pH} > \text{pHi pectines}$ ) ( $\text{pH } 5-3$ ), formant ainsi des complexes  $\beta$ -lg-pectines.

A  $\text{pH} < 3$ , la densité de charges des pectines baisse et les interactions électrostatiques sont faibles, ainsi à pH 2, il y a moins de complexes et la pepsine pourrait agir sur les sites qui lui sont accessibles, ce qui expliquerait l'augmentation de l'azote à ce pH, malgré la présence de fortes concentrations de polysaccharides.

La mesure de la turbidité des solutions contenant la  $\beta$ -lg ou les mélanges  $\beta$ -lg-pectines fournit des informations supplémentaires quant aux éventuelles interactions pouvant se produire entre les deux macromolécules.

Pour l'ensemble des mesures turbidimétriques, nos résultats indiquent une augmentation à partir de pH 4,7 avec un maximum atteint à pH 3,8.

L'augmentation de la turbidité de la  $\beta$ -lg en dessous de son pHi est due au fait que la protéine présente un minimum de solubilité à pH 4,75 (Schmitt *et al.*, 1999), et il se forme des agrégats qui précipitent.

La forte turbidité de la  $\beta$ -lg seule est une excellente indication de la formation des agrégats entre les protéines, pouvant s'expliquer par le fait que la charge nette de la protéine soit proche du zéro, impliquant une absence de répulsion et donc une précipitation de la protéine (Owen *et al.*, 2010).

Aux pH supérieurs au pHi de la  $\beta$ -lg, cette dernière est chargée négativement, induisant une répulsion électrostatique entre les molécules de protéine, empêchant l'agrégation de ces dernières et donc une diminution de la turbidité.

La turbidité de la  $\beta$ -lg seule, revient à sa valeur initiale à pH 2.

La turbidité de la solution de pepsine seule ne présente aucune variation ; les valeurs élevées de la turbidité de la  $\beta$ -lg en présence de la pepsine sont probablement liées à une co-agrégation des peptides issus de l'hydrolyse de la protéine par l'enzyme et des molécules

non hydrolysées, induisant un moindre accès de l'enzyme aux sites de clivage, entraînant la faible digestibilité de la protéine.

Cependant, la réversibilité de la turbidité de la solution  $\beta$ -lg est incomplète à pH 2.

La présence des pectines réduit considérablement la précipitation de la  $\beta$ -lg, ce qui se traduit par une diminution de la turbidité de la solution aux pH en dessous du pHi de la  $\beta$ -lg et au dessus du pHi des pectines.

Ce phénomène est dépendant du pH, mettant en évidence le caractère électrostatique du complexe insoluble formé entre la  $\beta$ -lg et la pectine, qui porte des charges opposées (Dickinson, 1998 ; Girard *et al.*, 2002 ; Girard *et al.*, 2003a ; Girard *et al.*, 2003b ; Weinbreck *et al.*, 2004 ; Sperber *et al.*, 2009), empêchant l'agrégation des molécules de  $\beta$ -lg, réduisant ainsi la turbidité de la solution

Le pH est responsable de l'ionisation de ces deux macromolécules. Il contrôle l'ionisation des groupements des chaînes latérales, des groupements aminés et carboxyliques des protéines et des groupements carboxyliques des polysaccharides.

La formation de complexes électrostatiques entre les pectines et les protéines du lait a déjà été démontrée. Elle est à l'origine de leur application comme agents stabilisants (Glahn, 1982).

Girard *et al.*, (2002, 2003a) ont mis en évidence que la formation des complexes  $\beta$ -lg-HMP ou  $\beta$ -lg-LMP est due aux interactions électrostatiques mais également aux liaisons hydrogène à pH 4, ces auteurs ont démontré que les complexes se forment en deux étapes passant de l'état moléculaire à l'état agrégat. La première étape correspondrait à la formation de complexes intra polymères solubles entre la  $\beta$ -lg et les molécules de pectine et la deuxième étape impliquerait l'agrégation des ces complexes intra polymères formant des complexes d'inter polymères insolubles.

Les pectines utilisées dans notre expérimentation, diffèrent par le degré d'estérification et donc par la densité de charges.

La compatibilité de ces deux macromolécules est sensible au degré d'estérification de la pectine (Antonov et Soshinsky, 2000).

La PLM a une densité de charge plus importante (une plus grande proportion de groupements carboxyliques chargés négativement) que la PHM et la PA, mais une moins bonne diminution de la formation des agrégats est observée (Hattori *et al.*, 2000), ce qui se



traduit en pratique par une turbidité plus élevée et un moindre effet stabilisant, en raison d'une faible viscosité (Rolin et de Vries, 1990 ; Syrbe, 1998).

L'effet de la PHM sur la stabilisation des caséines est connu (Glahn, 1982 ; Rolin et de Vries, 1990 ; Dickinson, 1998), son effet stabilisant est plus important que pour les autres pectines. Les auteurs supposent que, compte tenu de sa faible densité de charge, la PHM établit de faibles interactions électrostatiques avec la protéine, par conséquent la portion de pectine libre peut donc interagir avec le solvant, ce qui a pour effet d'augmenter la viscosité, et par conséquent des dispersions plus résistantes à la sédimentation des protéines (Glahn, 1982 ; Pereyra *et al.*, 1997 ; Dickinson, 1998).

Cette explication est valable pour la PA qui est légèrement plus chargée que la PHM.

Quant à la LMP elle possède une densité de charge plus élevée et provoque une turbidité élevée due à plus d'interactions avec les protéines et un peu d'effet stabilisateur en raison d'une basse viscosité (Rolin, 1990 ; Syrbe, 1998).

L'augmentation de la viscosité des solutions induite par les pectines aux pH acides est la conséquence d'une diminution des interactions, due à une réduction des groupements carboxyles dissociés (environ 50 % à pH 3,5 et 25 % à pH 3), ce qui se traduit par une meilleure interaction des groupes neutres avec le solvant (Glahn, 1982).

Ce phénomène expliquerait l'augmentation de l'azote dans le surnageant obtenu après hydrolyse de la  $\beta$ -lg en présence de fortes concentrations de pectines. Cette augmentation est en fonction de l'acidité de la solution.

Pour tous les cas où les pectines sont seules ou en présence de pepsine, aucune variation de la turbidité des solutions n'a été relevée.

La mesure de l'activité de la pepsine indique son inhibition par la pectine (PLM, PHM, PA) quand elle est présente à 50 %, alors que le taux de 1 %, n'a aucune influence sur l'activité de l'enzyme.

En revanche, une élévation de l'absorbance est observée quand la pectine est présente à 50 %. Ce résultat rejoint celui obtenu précédemment qui montre une hausse de l'azote dans le surnageant et nous permet de dire que dans un cas comme dans l'autre, il n'y a pas amélioration de l'activité enzymatique de la pepsine mais plutôt, une augmentation de l'azote dans le surnageant qui serait due à une élévation de la viscosité, ce qui empêcherait une précipitation totale des protéines non digérées.

Les propriétés d'écoulement des mélanges  $\beta$ -lg-pectine et de la  $\beta$ -lg sont différentes en raison de leurs natures moléculaires différentes.

Les polysaccharides augmentent la viscosité des solutions à de faibles concentrations, alors que les protéines de lactosérum la haussent faiblement même à concentrations élevées.

La  $\beta$ -lg possède un faible pouvoir viscosifiant mais elle est apte à la gélification, cependant les pectines favorisent l'augmentation de la viscosité des solutions.

L'effet inhibiteur des pectines (baisse de l'activité enzymatique) est probablement dû à la grande viscosité, empêchant l'association de l'enzyme et son substrat (Schneeman et Gallaher, 1985 ; Polovic et al., 2007), ou à des interactions directes entre les pectines et les enzymes (Langhout et Schutte, 1996).

L'inhibition de l'activité enzymatique digestive par les polysaccharides à viscosités élevées a été démontrée (Shah et al., 1982 ; Larsen et al., 1994), ces auteurs relient les effets des pectines sur l'activité enzymatique à leur De.

# **CONCLUSION**

## CONCLUSION

Ce travail a associé des méthodes biochimiques et physico-chimiques, dans le but d'interpréter et de comprendre les mécanismes expliquant les effets des polysaccharides sur la digestibilité des protéines.

Dans le cas de la  $\beta$ -lg et des pectines, les résultats obtenus ont montré :

- La faible digestibilité de la  $\beta$ -lg par la pepsine.
- Des comportements différents des pectines en fonction de leurs types.
- Un effet du ratio sur la digestibilité de la protéine, les fortes concentrations de mélange  $\beta$ -lg-pectine, induisent des valeurs plus importantes d'N dans le surnageant.
- La présence d'interactions électrostatiques entre les différentes pectines et la  $\beta$ -lg au cours de la diminution de pH, lors de la digestion par la pepsine. L'étude turbidimétrique a mis en évidence la formation d'agrégats entre les différentes macromolécules.
- Une inhibition de l'activité enzymatique de la pepsine par la pectine, mais dans l'état actuel de notre recherche, il nous est impossible d'expliquer le mécanisme de cette inhibition, cependant l'étude de la viscosité semble apporter une première interprétation à nos hypothèses.

En vue d'une application dans le domaine alimentaire, et si l'on considère que le potentiel d'application de la complexation entre la  $\beta$ -lg et la pectine pourrait représenter un moyen de diminuer l'allergénicité de la  $\beta$ -lg, en modifiant l'accessibilité des zones allergènes aux anticorps du sérum humain, tout en l'utilisant les complexes comme ingrédient alimentaire, il serait intéressant de compléter notre étude par :

- La mesure de l'activité enzymatique de la pepsine pour les mélanges  $\beta$ -lg-pectine, sachant que la turbidité augmente dans toutes les solutions.
- La mise en évidence de l'évolution de la viscosité en fonction du pH.
- L'analyse des peptides issus de l'hydrolyse par la pepsine des différents mélanges  $\beta$ -lg - pectine, pour vérifier leurs potentiels allergènes.
- L'évaluation de la digestibilité des acides aminés, en complément de notre recherche par une digestion iléale *in vitro* ou *in vivo*.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AMIOT, J., FOURNIER, S., LEBEUF, Y., PAQUIN, P. et SIMPSON, R., 2002.  
Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologiques et techniques d'analyses du lait, 1-73, Dans : Sciences et technologie du lait, Presses internationales Polytechnique Montréal.

ANDERSON, W., 1961.  
The antipeptic activity of sulphated polysaccharides.  
*J. Pharm. Pharmacol.*, **13**, 139-147.

ANDERSON, J. W., BAIRD, P., DAVIS, R. H., JR., FERRERI, S., KNUDTSON, M. et KORAYM, A., 2009.  
Health benefits of dietary fiber.  
*Nutri. Rev.*, **67**, 188-205.

ANTILA, P. I., PAAKKARI, A., JÄRVINEN, M. J., MATTILA, M., LAUKKANEN, A., PIHLANTO-LEPPÄLÄ, P., MÄNTSÄLÄ, A. et HELLMAN, J., 1991.  
Opioid peptides derived from in-vitro proteolysis of bovine whey proteins.  
*Int. D. J.*, **1**, 215-229.

ANTONOV, Y.A. et SOSHINSKY, A.A., 2000.  
Interactions and compatibility of ribuloso-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from alfalfa with pectin in aqueous medium.  
*Int. J. Biol. Macromol.*, **27**, 279-285.

ARNAL-PEYROT, F. et ADRIAN, J., 1977.  
Note sur l'activité de la papaïne en présence d'hydrocolloïdes alimentaires.  
*Méd. Nutr.*, **3**, 49-51.

ASSELIN J., HERBERT J. et AMIOT J., 1989.  
Effects of in vitro on the allergenicity of major whey proteins  
*J. Food Sci.*, **54**, 1307-1314.

AYMARD P., DURANT D. et NICOLARI T., 1996.  
The effect of temperature and ionic strength on the dimerisation of beta-lactoglobulin  
*Int. J. Biol. Macromol.*, **19**, 213-212.

BAHNA, L., 1978.

Control of Milk Allergy: A Challenge for Physicians, Mothers and Industry.

*Ann.Allerg.*, **41**,1-12.

BERNIER, J. J., ADRIAN, J. et VIDON N., 1988.

Les aliments dans l'estomac : La sécrétion gastrique. In : *Les aliments dans le tube digestif*, 57-68. Ed. Doin, Paris.

BLACKWOOD, A. D., SALTER, J., DETTMAR, P. W. et CHAPLIN, M. F., 2000.

Dietary fibre, physicochemical properties and their relationship to health.

*J. Roy. Soc. for the Prom. of Health.*,**120**, 242-247.

BROWNLOW, S., MORAIS, CABRAL, J. H., COOPER, R., FLOWER, D. R., YEWDALL, S. J., POLIKARPOV, I., NORTH, A.C. et SAWYER, L., 1997.

Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still an enigmatic lipocalin.

*Structure.*, **5**, 481-495.

BRYANT, C.M. et MC CLEMENTS, D.J., 2000.

Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels.

*Food. Hydrocolloids.*, **14**,383-390.

CAILLARD, I. et TOMÉ, D., 1995.

Transport of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin in enterocyte-like Cacao-2 cells.

*Reprod.Nutr.Dey.*, **35**,179-188 .

CAYOT, P. et LORIENT, D., 1997.

Structure-Function Relationship of Whey Proteins. In: *Food Proteins and Their Applications*, 225-256. Damodaran S. & Paraf A. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York.

CAYOT, P. et LORIENT D.,1998.

Structure et technofonction des protéines du lait. Ed Lavoisier, Paris.

CHEFTEL, J.C., CUQ, J.L. et LORIENT, D., 1985.

Protéines alimentaires, Technique et Documentation Lavoisier.

CHEFTEL, J.C. et CHEFTEL, H., 1992.

Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments, technique et documentation-Lavoisier, Paris.

CHEANG, B. et ZYDNEY, A.L., 2003.

Separation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin using membrane ultrafiltration.

*Biotechnology. Bioengineering.*, **83** ,201-209.

CHIBA, H. et YOSHIKAWA, M.,1986.

Biologically functional peptides from food proteins: New opioid peptides from milk protein.  
In: *Protein tailoring for food and medical uses*. Eds Feeney R. E., Whitaker J. J., Marcel Dekker, New York.

CHOBERT, J. M., BRIAND, L., GRINBERG, V. et HAERTLE, T., 1995.

Impact of esterification on the folding and the susceptibility to peptic proteolysis of  $\beta$ -lactoglobulin.

*Biochimica. Biophysica. Acta.*,**1248**, 170-176.

CIARE, D. A. et SWAISGOOD, H. E.,2000.

Bioactive milk peptides: A prospectus.

*J. Dairy. Sc.*, **83**, 1187-1195.

CLARK, A.H. ,1998.

Gelation of globular proteins. In: *Functional properties in food macromolecules*. Mitchell J.R. (Ed.), Elsevier Applied Science, London.

CLOSS, B. ,1990.

Influence de la structure sur les propriétés de surface des protéines du lactosérum.

Thèse de Doctorat en Science des aliments, Université de Bourgogne.

COPENHAGEN PECTIN BOOKLET B14

Stabilisation of fermented and sour milk drinks.The Copenhagen Pectin Factory Ltd., Lille Skensved, Denmark.

DEBRY, G., AYERBE, A. et BARD, D.,2001.

Lait, nutrition et santé. TEC & DOC éd, Paris.

DE KRUIF, C.G., WEINBRECK, F. et DE VRIES, R., 2004.

Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides.

*Cur.Op. Colloid. Interface. Sc.*, 9, 340–349.

DICKINSON, E. ,1993.

Protein - Polysaccharide Interactions in Food Colloids. In: *Food Colloids & Polymers: Stability & Mechanical Properties*, 77-93, Dickinson E. & Walstra P. (Eds.), Royal Society of Chemistry.

DICKINSON, E., 1998.

Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharides interactions.

*Tr. food. Sc. Tec.*, **9**,347-354.



DOUBLIER J. L. et THIBAUT J. F., 1984

Les agents gélifiants et épaississants de nature glucidique. In : *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agro-alimentaires*, 305-341. Ed. MULTON J.L., Lavoisier, Paris.

DUMAY, E., LALIGANT, A., ZASYPKIN, D., et CHEFTEL, J.C., 1999.

Pressure- and heat-induced gelation of mixed [beta]-lactoglobulin/polysaccharide solutions: scanning electron microscopy of gels.

*Food. Hydrocolloids.*, **13**, 339–351

DUPONT, M., 1963.

Effets des variations de pH sur l'équilibre primaire de la thermodénaturation de la  $\beta$ -lactoglobuline bovine.

*Compt.Rend. Acad.Sci. Paris.*, **257**, 3495-3498.

DUPONT, M., 1965.

A study of reversibility in the thermodénaturation of bovine  $\beta$ - lactoglobulin A.

*Biochim. Biophys. Acta.*, **102**, 500-513.

EIGEL, W. N., BUTTLER, J. E., ERNSTROM, C. A., HARWALKER, V. R., JENNES, R. et WHITNEY, R., 1984.

Nomenclature of proteins of cow's milk fifth revision.

*J. Dairy Sci.*, **67**, 1599-1631.

EL-ZAHAR, K., SITOBY, M., CHOISSET, Y., METRO, F., HAERTLE, T. et CHOBERT, J.M., 2005.

Peptic hydrolysis of ovine  $\beta$ -lactoglobulin. Exceptional susceptibility of native ovine  $\beta$ -lactoglobulin to pepsinolysis.

*Int. Dairy J.*, **15**, 17–27.

ENDRESS, H. U., 1991.

Nonfood uses of pectin. In Walter, R. (Ed.), *The Chemistry and Technology of Pectin*, Academic Press, New York.

FARRELL, H.M. et THOMPSON, M.P., 1971.

Biological significance of milk protein polymorphism.

*J. Dairy Sci.*, **54**, 1219-1225.

FLOWER, D. R., NORTH A. C. T. et SANSOM C. E., 2000.

The lipocalins protein family: Structural and sequence overview.

*Biochimica et Biophysica Acta*, **1482**, 9-24.

FOX, P.F., 1989.

The milk protein system. In: *Developments in Dairy Chemistry - 4. Functional Milk Proteins*, 1-53. Fox P.F. (Ed.), Applied Science Publishers. New York.

FOX, P.F., 2003.

Milk Proteins: general and historical aspects. In: *Advanced Dairy Chemistry: Proteins Part A*, Vol. 1, Chap. 1. 3<sup>rd</sup> edition. Fox P.F. & McSweeney P.L.H. (Eds.), Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.

GEZIMATI, J., CREAMER, L. K. et SINGH, H., 1996.

Heat-induced interactions and gelation of mixtures of bovine  $\beta$ -lactoglobulin and serum albumin.

*J. Agric. Food. Chem.*, **44**, 804-810.

GIRARD, M., TURGEON, S.L. et GAUTHIER, S.F., 2002.

Interbiopolymer complexing between  $\beta$ -lactoglobulin and low- or high-methoxyl pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration.

*Food. Hydrocoll.*, **16**, 585-591.

GIRARD, M., TURGEON, S.L. et GAUTHIER, S.F., 2003a.

Thermodynamic parameters of  $\beta$ -lactoglobulin/pectin complexes assessed by isothermal titration calorimetry.

*J. Agric. Food. Chem.*, **51**, 4450-4455.

GIRARD, M., TURGEON, S.L. et GAUTHIER, S.F., 2003b.

Quantification of the interactions between  $\beta$ -lactoglobulin and pectin through capillary electrophoresis analysis.

*J. Agric. Food. Chem.*, **51**, 6043-6049.

GIRARD, M., SANCHEZ, C., LANEUVILLE, S. L., TURGEON, S. L. et GAUTHIER, S. F., 2004.

Associative phase séparation of  $\beta$ -lactoglobulin/pectin solutions: a kinetic study by small angle static light scattering.

*Colloids. Surfaces.*, **35**, 15-22.

GLAHN, P. E., 1982.

Hydrocolloid stabilization of protein suspensions at low pH.

*Progr. Food. Nutr. Sci.*, **6**, 171-177.

GRALA, W., VERSTEGEN, M.W.A., JANSMAN, A.J.M., HUISMAN, J., VAN LEEUWEN, P. et TAMMINGA, S., 1999.  
Effects of ileal endogenous nitrogen losses and dietary amino acid supplementation on nitrogen retention in growing pigs.  
*Animal. Feed. Sci. Tech.*, **80**, 207-222.

GRANT, G.T., MORRIS, E.R., REES, D.A., SMITH, P.J.C. et THOM, D., 1973.  
Biological interactions between polysaccharides and divalent ions: the egg-box model."  
*FEBS. Lett.*, **32**, 195-19.

GREEN, D.W. et ASCHAFFENBURG, R., 1959.  
Twofold symmetry of the  $\beta$ -lactoglobulin molecule in crystals.  
*J. Molecular, Biology.*, **1**, 54-64.

GREEN, D. W., ASCHAFFENBURG, R., CAMERAN, A., COPPOLA, J. C., DUNILL, P., SIMMONS, R. M., KOMOROWSKI, E. S., SAWYER, L., TURNER, E. M. et WOODS, K. F., 1979.  
Structure of beta-lactoglobulin at 6Å resolution.  
*J. Mol. Biol.*, **131**, 375-379.

GODOVAC-ZIMMERMANN, J., 1988.  
The structural motif of  $\beta$ -lactoglobulin and retinol-binding protein.  
*Trends. Biochem. Sci.*, **13**, 64-66

HALLING, P.J., 1981.  
Protein –stabilized foams and emulsions.  
*Crit.Rev. Food. Sci. Nutr.*, **15**, 155-203.

HAMBLING, S. C., MC ALPINE, A., S. et SAWYER, L., 1992.  
Beta-lactoglobulin. In *Advanced dairy chemistry. Protein*. Ed. Fox P.F, oxford, UK.

HATTORI, M., NUMAMOTO, K.I., KOBAYASHI, K. et TAKAHASHI, K., 1997.  
Functional improvement of  $\beta$ -lactoglobulin by conjugaison with alginate lyase-lyase.  
*J. Agri. Food Chem.*, **45**, 703-708.

HATTORI, M., NUMAMOTO, K.I., KOBAYASHI, K. et TAKAHASHI, K., 2000.  
Functional changes in  $\beta$ -lactoglobulin by conjugaison with cationic saccharides.  
*J. Agri. Food Chem.*, **48**, 2050-2056.

HAYAKAWA, I., KAJIHARA, J., MORIKAWA, K., ODA, M. et FUJIO, Y., 1992.  
Denaturation of bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin by high pressure, heat and chemicals.  
*J. Food Sci.*, **57**, 288-292.

HEYMAN, M. et DESJEUX, J., 1996.

Antigen handling by intestinal epithelial cells, In D. Kaiserlian (ed.), Antigen presentation by intestinal epithelial cells. R. G. Landes Company, Austin, Tex.

IAMETTI, S., SCAGLIONI, L., MAZZINI, S., VECCHIO, G. et BONONI, F., 1998.

Structural features and reversible association of different quaternary of beta-lactoglobulin  
*J. Agri. Food Chem.*, **46**, 2156-2166.

IKEDA, S., 2003.

Heat-induced gelation of whey proteins observed by rheology, atomic force microscopy, and Raman scattering spectroscopy.

*Hydrocolloid.*, **17**, 399-406.

IUNG, C., 1988.

Les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum : étude modélisée avec la bêta-lactoglobuline

Thèse de doctorat en biologie appliquée, Université de Nancy I.

JENKINS, D.J.A., ANTHONY, R., LEEDS, A. R., GASSULL, M. A., COCHET, B. et ALBERTI, K.G.M.M., 1977.

Decrease in postprandial insulin and glucose concentrations by guar and pectin.

*Ann. Intern. Med.*, **86**, 20–23.

JENKINS, D. J. A., WOLEVER, T. M. S. et LEEDS, A. R., 1978.

Dietary fibers, fiber analogues and glucose tolerance: importance of viscosity.

*Br. Med.J.*, **1**, 1392-1394.

JOSS, L.A. et RALSTON, G.B., 1996.

$\beta$ -Lactoglobulin B: A proposed standard for the study of reversible self-association reactions in the analytical ultracentrifuge?

*Anal. Biochem.*, **236**, 20–26.

KANANEN, A., SAVOLAINEN J., MAKINEN, J., PERTTILÄ, U., MYLLYKOSKI, L. et PIHLINTO-LEPPÄLÄ, A., 2000.

Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin.

*Intern. Dairy J.*, **10**, 691-697.

KAR, F. et ARSLAN, N., 1999.

Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity-molecular weight relationship.

*Carbohydrate. Polymers.*, **40**, 277-284.

- KELLA, N. K. et KINSELLA, J.E., 1988.  
Enhanced thermodynamic stability of  $\beta$ -lactoglobulin at low pH.  
*Biochem. J.*, **255**, 113-118.
- KELLY, M. J. et REITHEL, F.J., 1971.  
Thermodynamic analysis of the monomer-dimer association of beta-lactoglobulin A at the isoelectric point.  
*Biochemistry*, **10**, 2639–2644
- KINEKAWA, Y. et KITABATAKE, N. ,1996.  
Purification of beta-lactoglobulin from whey protein concentrate by pepsin treatment  
*J. Dairy.Sci.*, **79**,350-356.
- KINSELLA, J. E, WHITEHEAD, D. M., BRAD, Y J. et BRINGE, N. A., 1989.  
Milk proteins: possible relationships of structure and fonction. Developments in dairy chemistry. 55-95. Fox, P. E. (Ed.), Elsevier Applied Science, New-York.
- KITABATAKE, N. et KINEKAWA, Y.I., 1998.  
Digestibility of bovine milk whey protein and  $\beta$ -lactoglobulin *in vitro* and *in vivo*.  
*J. Agri.Food. Chemistry.*, **46**, 4917-4923.
- KLEINZ H.H., PUTTER A.B., VAN DER BEEK M. et HUYNINK S.J.,1995.  
Particle concentration, size and turbidity.  
*Filtartion. Separation.*,897-901.
- LAPASIN, R. et PRICL S. ,1995.  
Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications. 250-494. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall. Glasgow, Great Britain.
- LARSEN, F.M., WILSON, P.J. et MOUGHAN, P.J., 1994.  
Dietary fiber viscosity and amino acid digestibility, proteolytic digestive enzyme activity and digestive organ weights in growing rats.  
*J.Nutr.*, **124**,833-841.
- LEDWARD, D. A., 1994.  
Protein-polysaccharide interactions. IN Protein functionality in food systems. Hettiarachchy N.S. et Zieger, G.R, Marcel Dekker, New-York.
- LAMGHARI EL KOSSORI, R., SANCHEZ, C., EL BOUSTANI, E. S., MAUCOURT, M. N., SAUVAIRE, Y., MEJEAN, L. et VILLAUME, C.,2000.  
Comparison of effects of prickly pear (*Opuntia ficus indica sp*) fruit, arabic gum, carrageenan, alginic acid, locust bean gum and citrus pectin on viscosity and “*in vitro*” digestibility of casein.  
*J. Sci. Food Agric.*, **80**, 359-364.

LIN, C.F., 1977.

Food colloids, Ed Graham H.D. West –Port.

LINDEN, G. et LORIENT, D. ,1994.

Biochimie agroindustrielle. Ed. Masson, Paris.

LIVNEY, Y.D.,2008.

Complexes and conjugates of biopolymers for delivery of bioactive ingredients via food, N. Garti, Editor, *Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals*, (1st ed.), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England.

MADUREIRA, A.R., PEREIRA, C.I., GOMES, M.P.A., PINTADO, G.E. et MALCATA, F.X.,2007.

Bovine whey proteins-Overview on their main biological properties.  
*Food. Research. Inter.*, **40** ,1197-1211.

MC KENZIE, H.A. et SAWYER, W.H., 1967.

Effect of pH on  $\beta$ -lactoglobulins.

*Nature.*, **214**, 1101-1104.

MC KENZIE, H. A., 1971.

Milk proteins. In: *Chemistry and Molecular Biology*, II, Ed. Mac Kenzie H.A., Academic Press, New York.

MC KENZIE, H.A., RALSTON, G.B.et SHAW, D.C.,1972.

Location of sulfhydryl and disulfide groups in bovine  $\beta$ -lactoglobulins and effects of urea.  
*Biochemistry.*, **11**, 4534-4547.

MAC SWINEY, M., SINGH, H., CAMPANELLA, O. H. et CREAMER, L. K. ,1994

Thermal Gelation and Denaturation of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin A and B.

*J. Dairy Res.*, **61**, 221-232.

MAIER, I., OKUN, V. M., PITTNER, F. et WOLFGANG, L. ,2006.

Changes in peptic digestibility of bovine  $\beta$ -lactoglobulin as a result of food processing studied by capillary electrophoresis and immunochemical methods.

*J. Chromatogr.*, **841**, 160–167.

MAIRESSE, M., 2002.

Allergie alimentaire et protéines animales.

*Rev. Fr. Allergo.*,**42**, 299-306.

MARCOUIRE, M., RUFFIE, M., AUGIER, D. et DUTAU.G., 1998.

Enquête épidémiologique sur l'asthme et les allergies chez l'enfant de 3-4 ans.

*Sem. Hop. Paris.*, **74**, 635-642.

MATSUURA, J. E. et MANNING, M. C., 1994.

Heat-induced gel formation of  $\beta$ -lactoglobulins: a study on the secondary and tertiary structure as followed by circular dichroism spectroscopy.

*J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1650-1656.

MAY, C.D., 1992.

Pectins. In: *Thickening and gelling agents for food*, Ed. Imeson A., Blackie, Glasgow.

MIRANDA, G. et PELISSIER, J. P., 1983.

Kinetic studies of *in vivo* digestion of bovine unheated skim-milk proteins in the rat stomach.

*J. Dairy. Research.*, **50**, 27-36.

MOUECOUCOU, J., VILLAUME, C., BAU, H. M., NICOLAS, J. P. et MEJEAN, L., 1993.

Effets de l'incorporation du carraghénate de sodium dans les régimes à base de caséine ou de farine de soja sur les lipides plasmatiques du rat adulte.

*Sci. Alim.*, **13**, 311-316.

MOUECOUCOU, J., VILLAUME, C., BAU, H. M., SCHWERTZ, A., NICOLAS, J. P. et MEJEAN, L., 1995.

Decrease of *in vitro* hydrolysis of soybean protein by sodium carrageenan. In *Food Macromolecular and colloids*, 356-359. Ed. DICKINSON and LORIENT. The Royal Society of Chemistry.

MOLINARI, H., RAGONA, L., VARANI, L., MUSCO, G., CONSONNI, R., ZETTA, L. et MONACO, H.L., 1996.

Partially folded structure of monomeric bovine  $\beta$ -lactoglobulin.

*FEBS. Lett.*, **381**, 237-243.

MOLL, M. et MOLL, N., 1998

Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques. Ed. Dunod, Paris.

MONERET-VAUTRIN, D.A., 1983.

Allergie alimentaire et fausses allergies alimentaires.

*Fond. Fr. Nutr.*, **19**, 13-27.

MONERET-VAUTRIN, D.A. et KANNY, G., 1993.

Intolérance et immunotoxicité des additifs alimentaires.

*Med. Hyg.*, **51**, 881-888.

MONERET-VAUTRIN D., 1998.

Modifications of allergenicity linked to food technologies.

*Allergie. Immunologie.*, **313**, 518-521.

- MOSENTHIN, R., SAUER, W. C. et AHRENS, F., 1994.  
Dietary pectin's effect on ileal and fecal amino acid digestibility and exocrine pancreatic secretions in growing pigs.  
*J. Nutr.*, **124**, 1222-1229.
- MULVIHILL, D.M. et DONOVAN, M., 1987.  
Whey proteins and their thermal denaturation-A  
*Irish. J. Food. Sc. Tec.*, **11**, 43-75.
- MULVIHILL, D.M. et KINSELLA, J.E., 1988.  
Gelation of  $\beta$ -Lactoglobulin: effect of sodium chloride and calcium chloride on the rheological and structural properties of gels.  
*J. Food. Sc.*, **53**, 231-236.
- MULLALLY, M. M., MEISEL, H., et FITZGERALD, R. J. , 1997.  
Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine beta-lactoglobulin.  
*FEBS.Lett.*, **402**, 99-101.
- NOZAKI, Y., BUNVILLE, L. G. et TANFORD, C., 1959.  
Hydrogen ion titration curves of  $\beta$ -lactoglobulin.  
*J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 5523-5529.
- OSTE, R. E., BRANDON, L., BATES, A. H. et FRIEDMAN, M., 1990.  
Effet of Maillard browning reactions of Kuwits soybean trypsin inhibition on it's interaction with monoclonal antibodies.  
*J. Agric. Food. Chem.*, **38**, 258-261.
- OUWEHAND, A.C., SALMINEN, S.J., SKURNIK, M. et CONWAY, P.L., 1997.  
Inhibition of pathogen adhesion by  $\beta$ -lactoglobulin.  
*Inter. Dairy. J.*, **7**, 685-692.
- OWEN, J., DECKER, E. A. et MAC CLEMENTS, D. V., 2010.  
Thermal analysis of  $\beta$ -lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles.  
*Food.Hydrocolloids.*, **24**, 239-248.
- PAPIZ, M.Z., SAWYER, L., ELIOPOULOS, E. E., NORTH, A.C.T., FINDLEY, J.B.C., SIVAPRASADA RAO, R., JONES, T. A., NEWCOMER, M. E. et KRAULIS, P. J. , 1986.  
The structure of  $\beta$ -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein.  
*Nature* **324**, 383-390.



PATERSON, G.R., OTTER, D.E. et HILL, J.P. ,1995.

Application of capillary electrophoresis in the identification of phenotypes containing the  $\beta$ -lactoglobulin C variant.

*J. Dairy.Science.*, **78**, 2637-2644

PEREYRA, R., SCHMIDT, K. A. et WICKER, L.,1997.

Interaction and stabilisation of acidified casein dispersion with low and high methoxyl pectin.

*J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3448-3451.

PEREZ, M. D., DIAZ DE VILLEGAS, M. C., SANCHEZ, L., ARANDA, P., ENA, J. M. et CALVO, M.,1989.

Interaction of fatty acids with  $\beta$ -lactoglobulin and albumin from ruminant milk.

*J. Biochem.*, **106**, 1094-1097.

PEREZ, M. D., SANCHEZ, L., ARANDA, P., ENA, J. M., ORIA, R. et CALVO, M.,1992.

Effect of  $\beta$ -lactoglobulin on the activity of pregastric lipase. A possible role for this protein in ruminant milk.

*Biochem. Biophys. Acta*, **1123**, 151-155.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A., KOSKINEN, P., PIILOTA, K., TUPASELA, T. KORHONEN, H.,2000.

Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides.

*J. Dairy. Research.*, **67**,53-64

POLOVIC, N., BLANUSA, M., GAVROVIC-JANKULOVIC, M., ATANASKOVIC-MARKOVICW, M., BURAZERZ, L., JANKOV, R. et CIRKOVIC VELICKOVIC, T.,2007.

A matrix effect in pectin-rich fruits hampers digestion of allergen by pepsin *in vivo* and *in vitro*

*Clin. Exp.Allergy.*, **37**, 764–771.

PROTEIN DATA BANK, site internet: [www.pdb.org](http://www.pdb.org)

QI, X.L., BROWNLOW, S., HOLT, C. et SELLERS, P., 1995.

Thermal-denaturation of betalactoglobulin – effect of protein-concentration at pH-6.75 and pH-8.05.

*Biochimica . Biophysica. Acta-Protein. Struc.Molecular. Enzymology.*, **1248**, 43–49

QI, X.L., HOLT, C., MC NULTY, D., CLARKE, D.T., BROWNLOW, S. et JONES G.R.,1997.

Effect of temperature on the secondary structure of  $\beta$ -Lactoglobulin at pH 6,7, as determined by CD and IR spectroscopy: a test of the molten globule hypothesis."

*Biochemistry.J.*, **324**: 341-346.

- REDDY, M. I., KELLA, N. J. K. et KINSELLA, J. E., 1988.  
Structural and conformational basis of the resistance of beta-lactoglobulin to peptic and chymotryptic.  
*J. Agri. Food Chem.*, **36**, 737-741
- REES, D. A., 1969.  
Structure, conformation and mechanism in the formation of polysaccharides gels and networks.  
*Adv. Carboh. Chem. Biochem.*, **24**, 267-332.
- RELKIN, P., MEYHEUC, T., LAUNAY, B. et RAYNAL, K., 1998.  
Heat-induced gelation of globular protein mixtures – a DSC and scanning electron microscopic study.  
*J. Thermal. Analysis. Calorimetry.*, **51**, 747–75
- RENARD D., 1994.  
Etude de l'agrégation et de la gélification des protéines globulaires : application à la bêta-lactoglobuline.  
Thèse de doctorat de l'Université de Nantes.
- ROBILLARD, K. A., JR. et WISHNIA, A., 1972.  
Aromatic hydrophobes und lactoglobulin A. Thermodynamics of binding.  
*Biochem.*, **11**, 3835-3845.
- ROLIN, C. et DE VRIES, J., 1990.  
Pectin. In *Food Gel*; Harris, P., Ed.; Elsevier Applied Science: London, U.K.
- ROLIN, C., 1993.  
Pectin. In: Whistler, R. L.; Bemiller, J. N. (Ed.). *Polysaccharides and their derivatives*. Academic Press, San Diego.
- ROUFIK, S., PAQUIN, P. et BRITTEN, M., 2005.  
Use of high-performance size exclusion chromatography to characterize protein aggregation in commercial whey protein concentrates.  
*Inter. Dairy. J.*, **15**, 231-241.
- RYLE, A. P., 1984.  
Pepsins, gastricsins and their zymogens. In *Methods of Enzymatic Analysis*, 233-238. Bergmeyer, H. U., Ed.; Verlag Chemie: Weinheim, Germany.
- SABLE-AMPLIS, R. et SICART, R., 1990.  
Les végétaux dans l'alimentation et le métabolisme du cholestérol  
*Cah. Nutr. Diet.*, **25** 30-34.

- SAKAI, T., SAKAMOTO, T., HALLAERT, J. et VANDAMME, E. J., 1993.  
Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. In: *Advances in applied microbiology*, Ed. Neidleman S., Laskin A.I., Academic Press, San Diego.
- SHAH, N. 2000.  
Effects of milk-derived bioactives.  
*British. Journal. Nutrition.*, **84**, 3-10.
- SAMANT, S.K., SINGHAL, R.S., KULKARNI, P.R. et REGE, D.V., 1993.  
Protein-polysaccharide interactions: a new approach in food formulation.  
*Inter. J. Food. Sc. Tech.*, **28**, 547-562.
- SAVA, N., VAN DER PLANCKEN, I., CLAEYS, W. et HENDRICKX, M., 2005,  
The kinetics of heat-induced structural changes of  $\beta$ -lactoglobulin,  
*J. Dairy. Sci.*, **88**, 1646-1653.
- SAWYER, W. H., 1967.  
Heat denaturation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin and relevance of disulphide aggregation.  
*J. Dairy Sci.*, **51**, 323-329.
- SAWYER, L., PAPIZ, M. Z., NORTH, A. C. T. et ELIOPOUMOS, E. E. ,1985.  
Structure and function of bovine  $\beta$ -lactoglobulin.  
*Biochem. Soc. Trans.*, **13**, 265-266.
- SAWYER, L. et KONTOPIDIS, G., 2000.  
The core lipocalin, bovine  $\beta$ -lactoglobulin.  
*Biochimica .Biophysica .Act.*, **1482**, 136-148.
- SAWYER, L., BARLOW, P.N., BOLAND, M.J., CREAMER, L.K., DENTON, H., EDWARDS, P.J.B., HOLT, C., JAMESON, G.B., KONTOPIDIS, G., NORRIS, G.E., UHRINOVA, S. et WU S.Y., 2002.  
Milk protein structure - What can it tell the dairy industry?  
*Inter.Dairy.J.*, **12**, 709-715.
- SCHMIDT, D.G et POLL, J.K., 1991.  
Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes.  
*Neth. Milk. Dairy. J.*, **45**, 225- 240.
- SCHMIDT, D.G. VAN MARKWIGH, B.W. ,1993.  
Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Influence of heat treatment of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin on their proteolysis by pepsin and papain.  
*Neth. Milk Dairy J.*, **47**, 15-22.

- SCHMIDT, D.G., MEIJER, R.J., SLANGEN, C.J. et VAN BERESTEIJN, E.C., 1995.  
Raising the pH of the pepsin- catalysed hydrolysis of bovine whey proteins increase the antigenicity of the hydrolysates.  
*Clin.Exp. Allergy* **25**, 1007-1017.
- SCHMITT, C., SANCHEZ, C., DESHOBRY-BANON, S. etn HARDY J.,1998.  
Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharides complexes.  
*Cr. Rev. Food Sci. Nutr.* **38**, 689-753.
- SCHMITT, C., SANCHEZ, C., THOMAS, F. et HARDY, J., 1999.  
Complex coacervation between  $\beta$ -lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium.  
*Food. Hydrocolloids.*, **13**, 483-496.
- SCHNEEMAN, B.O. et GALLAHER, D.,1985.  
Effect of dietary fiber on digestive enzyme activity and bile acid in the small intestine.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **180**, 409-414.
- SHIMADA, K.et CHEFTEL, J. C., 1989.  
Sulfhydryl group/disulphide bond interchange reactions during heat induced gelation of whey protein isolate.  
*J. Agric. Food.Chem.*, **37**,161–168
- SMACCHI, E. et GOBETTI, M., 2000.  
Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes.  
*Food. Microbiology.*, **17**,129-141.
- SPECTOR, A. A. et FLETCHER, J.E., 1970.  
Binding of long chain of fatty acids to  $\beta$ -lactoglobulin.  
*Lipids.*, **5**, 403- 411.
- SPERBER, M.A.C., STUART H.A., SCHOLS A.G.J., VORAGEN et W. NORDE.,2009.  
Binding of beta-lactoglobulin to pectins varying in their overall and local charge density.  
*Biomacromolecule.*, 10, 3246–3252
- SWAISGOOD, H.E.,1982.  
Chemistry of milk proteins. dans Developments in dairy chemistry I.Proteins. Editeur: Fox, P.F., London, Applied Science Publishers.
- SYRBE, A., BAUER W. J. et KLOSTERMEYER, H.,1998.  
Polymer science concepts in dairy systems. An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction.  
*Intern. Dairy J.*, **8**, 179-193.

- TANFORD, C., BUNVILLE, L.G. et NOZAKI, Y., 1959.  
The reversible transformation of  $\beta$ -Lactoglobulin at pH 7,5.  
*J. American. Chemical, Soc.*, **81**: 4032-4036
- TIMASHEFF, S. N. Et TOWNEND, R., 1964.  
Structure of  $\beta$ -Lactoglobulin tetramer.  
*Nature.*, **203**,517-519.
- TIMASHEFF, S. N., TOWNEND, R. et MESCANTI, L., 1966.  
The optical rotary dispersion of the beta-lactoglobulins.  
*J. Biol. Chem.*, **241**, 1863-1870.
- TOLSTOGUZOV, V.B., 1986.  
Functional properties of proteins-polysaccharide mixtures. In: Functional properties of food macromolecules, Mitchell J. R & Ledward D. k (ed.), Elsevier, London.
- TOLSTOGUZOV, V.B., 1991.  
Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction.  
*Food, Hydrocolloids.*, **4**,429-468.
- TOLSTOGUZOV, V.B., 1997.  
Protein-polysaccharide interactions. In S. Damodaran & A. Paraf, Food Proteins and Their Applications. Marcel Dekker, Inc.
- TOMBS, M. P.et HARDING, S. E.,1998.  
An introduction to polysaccharide biotechnology. London, UK: Taylor and Francis.
- TORSOSTIR, I., ALPSTEN, M., HOLM, G., SANDERG, A. S. et TOLLI, J., 1991.  
A small dose of soluble alginate fibre effects posts prandial glycemic and gastric emptying in human and diabete.  
*J. Nutr.*, **121**, 775-791.
- TOWNEND, R., KUMOSINSKI, T. F., TIMASHEFF, S. N. et GORBUNOFF, M. T.,1969.  
The state of amino acid residues in beta-lactoglobulin.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, **129**:256
- VAN CAMP, J. et HUYGHEBAERT, A. ,1995.  
High pressure-induced gel formation of whey protein and haemoglobin protein concentrated.  
*Lebens. Wiss. Techn.*,**28**, 111-117.
- VERHEUL, M., ROEFS, S.P.F.M., MELLEMA, J. et DE KRUIF, K.G.,1998.  
Kinetics of heat-induced aggregation of P-lactoglobulin.  
*J.Agricultural . Food. Chemistry.*, **46**, 896-903.

VORAGEN, A. G. J., PILNIK, W., THIBAUT, J.F., AXELOS, M. A. V., et RENARD, C. M., 1995.

Pectins. In: A. M. Stephen, Food polysaccharides and their applications, CRC Press Inc.

WALSTRA, P. et JENNESS, R., 1984.

Outline of milk composition and structure. In: Dairy chemistry and physics. New York: John Wiley and sons.

WEINBRECK, F., DE VRIES, R., SCHROOYEN, P., et DE KRUIF, C. G., 2003.

Complex coacervation of whey proteins and gum arabic.

*Biomacromolecules.*, **4**, 293-303.

WEINBRECK, F., NIEUWENHUIJSE, H., ROBIJN, G. W. et DE KRUIF, C. G., 2004.

Complexation of whey proteins with carrageenan.

*J. Agricultural . Food. Chemistry.*, **52**, 3550-3555.

WONG, D.W.S., CAMIRAND, W.M. et PAVLATH, A.E. ,1996.

Structures and Functionalities of Milk Proteins.

*Food. Sc. Nutri.*, **36** , 807-844.

YAPO, B.M., ROBERT, C., ETIENNE, I., WATHELET, B., et PAQUOT, M.,2007.

Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts.

*Food. Chemistry.*, **100**, 1356-1364

Ye, A.Q.,2008.

Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications.

*Inter.J. Food. Sc. Tech.*, **43**, 406–415

YUNGINGER, K.W., 1992.

Lethal food allergy in children.

*N.Engl. J. Med.*, **327**, 421-425.

YVON, M., VAN HILLE, I., PELISSIER, J.P., GUILLOTEAU, P. et TOULLEC, R., 1984.

*In vivo* milk digestion in the calf abomasum. II. Milk and whey proteolysis.

*Reprod. Nutr. Dévelop.*, **24**, 835-843.

ZIMET, P. et LIVNEY, Y.D.,2009.

Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for omega-3 polyunsaturated fatty acids.

*Food. Hydrocolloids.*, **23**, 1120–1126.

# **ANNEXES**

degussa.

Texturant Systems

# Unipectine™ AYD 250

## PROPRIETES

### DISPERSION

Pour disperser le produit sans grumeaux :

- soit le prémélanger avec d'autres ingrédients secs, puis verser la préparation dans le liquide sous vive agitation. Maintenir l'agitation jusqu'à dispersion complète.
- soit l'incorporer à un milieu non séchant (fruit, alcool, solutions concentrées de sucres > 80°Brix).

### DISSOLUTION

La dissolution du produit est liée au milieu et au procédé : elle est favorisée par le traitement thermique (temps, température), le cisaillement (agitateur, échangeur, homogénéisateur). Une dissolution totale est obtenue rapidement à partir de 80/85°C. Elle peut être déviée dans un milieu riche en calcium (eau de dureté > 80 ppm Ca<sup>++</sup>, lait), elle nécessite alors un temps de contact long ou l'utilisation de tels excipients.

La concentration maximale d'utilisation dans les présolutions est de 2,5 % dans l'eau froide et 4 à 5 % dans l'eau chaude.

### MILIEUX / UTILISATION

Le produit peut être utilisé dans des milieux aqueux, laitiers ou fruités. Toutefois, il est standardisé en présence de protéines pour assurer une homogénéité dans les boissons lactées acides.

### TEXTURE

Cette pectine agit comme un agent dispersant en empêchant l'agglomération des particules de protéines (stabilisation stérique). La boisson rhénuse est onctueuse et homogène.

## DESCRIPTION

UNIPECTINE™ AYD 250 est un additif alimentaire utilisé comme agent texturant. Cette pectine est particulièrement adaptée à la stabilisation des protéines de lait dans les boissons lactées acides (pH = 3,7 - 4,3) du type produits ultra-frais ou de longue conservation, à textures crémeuses, à un dosage de 0,20 à 0,50 %.

Ce produit est conforme aux normes et prescriptions de la FACIOMS, de la CEE, de la FDA (CFR), à celles du FCC et de la JSFA. Toutefois, il appartient à l'utilisateur de s'assurer des dispositions légales d'emploi du pays où la préparation sera consommée.

Le produit est constitué de :

- PECTINE DE CITRUS FORTEMENT ESTERIFIÉE

E 440

Standardisé par ajout de sucres

## CARACTERISTIQUES

Rhéologie :	Pouvoir de stabilisation des protéines en boisson lactée acide : 460 à 540°SP
Degré d'estérification :	69 à 74 %
pH :	2,9 à 3,5 - mesuré en solution aqueuse à 1 %
Aspect, Goût, Odeur :	Poudre inodore et insipide, de couleur blanc-crème à beige-clair
Granulométrie :	au moins 99 % inférieure à 315 microns (norme AFNOR N° 26)
Points noirs :	Détermination de la densité de particules colorées (méthode RLJ RM 02-041)
Perte au séchage :	Maxi 12 %
Bactériologie :	Germes totaux : max 1000 par gramme Levures et Moisissures : max 100 par gramme Germes pathogènes (E. coli, Salmonella) : tests négatifs

## CONDITIONNEMENT ET STOCKAGE

Contenu net de 25 kg net doublés d'un sac interne en polyéthylène.  
Stocké à l'abri de la chaleur et de l'humidité, en présence à température inférieure à 25°C et à humidité relative 65% d'humidité relative.  
Durée limite d'utilisation (Cytmax (p.k.U.C)) : ce produit, stocké dans les conditions d'usage mentionnées et dans son emballage fermé d'origine, conserve ses propriétés fonctionnelles pendant au moins 1 an.

A - PN 1018 - 08/03/01 - 04

Degussa Texturant Systems France SAS

Siège social : 4, place des Ailes, 92541 BOULOGNE-BELANCOURT CEDEX FRANCE

Tél +33 (0)1 47 12 25 25, Fax +33 (0)1 47 17 26 56, Internet : www.texturantsystems.fr/fr

Toutes nos lettres imprimées au papier du TN 113 100 g/m², RCS NANTERRE B 433 976 186, une société du Groupe Degussa



degussa.

Texturant Systems

# Unipectine™ OB 800

## PROPRIETES DISPERSION

Pour disperser le produit sans grumeaux : - soit le prémélanger avec d'autres ingrédients secs, puis verser la préparation dans le liquide sous vive agitation. Maintenir l'agitation jusqu'à dispersion complète. - soit

l'incorporer à un milieu non solvant (huile, alcool, solutions concentrées de sucres > 65°Brix). **DISSOLUTION** La dissolution du produit est liée au milieu et au procédé : elle est favorisée par le traitement thermique (temps, température), le cisaillement (agitateur, homogénéisateur). Une dissolution totale est obtenue rapidement à partir de 80/85°C. Elle peut être délicate dans un milieu riche en calcium (eau de dureté > 80 ppm Ca++, lait) ; elle nécessite alors un temps de contact long ou l'utilisation de sels sequestrants.

**MILIEUX / UTILISATION** Le produit peut être utilisé dans des milieux aqueux ou fruités. La concentration maximale d'utilisation est de 3 % dans l'eau froide et 5 à 7 % dans l'eau chaude. **TEXTURE** La gélification apparaît lors du refroidissement par intraction de la pectine avec le calcium disponible. La texture finale est obtenue après 24 heures.

**DESCRIPTION** UNIPECTINE™ OB 800 est un additif alimentaire utilisé comme agent texturant. C'est un épépaisissant et/ou gélifiant (en présence d'ions calcium) particulièrement adapté à la fabrication de fourrages haut brix (70 - 75°) stables au four, à un dosage de 0,80 à 1,20 %, en fonction de la formulation et de la texture souhaitée.

Ce produit est conforme aux normes et proscriptions de la FAO/OMS, de la CEE, de la FDA (CFR) et à celles du FCC. Toutefois, il appartient à l'utilisateur de s'assurer des dispositions légales d'emploi du pays où la préparation sera consommée. Le produit est constitué de :

• PECTINE FAIBLEMENT-ESTERIFIEE  
Standardisé par éqvt de sucres

E 440

## CARACTERISTIQUES

Degré d'estérification : 37 à 41 %

pH : 4,5 à 5,0 - mesuré en solution aqueuse à 1 % Aspect, Goût, Poudre inodore et insipide, de couleur blanc-crème à beige-clair Odeur : beïge-clair

Granulométrie : au moins 99 % inférieure à 315 microns (Tamis AFNOR N° 26)

Perte au séchage : Maxi 12 % Bactériologie : Germes totaux : maxi 1000 par gramme  
Bactéries vivantes et Moisissures : maxi 100 par gramme  
Germes pathogènes (E. coli dans 1 gramme, Salmonella dans 10 grammes) : tests négatifs

**CONDITIONNEMENT ET STOCKAGE** Caisse carton de 20 Kg net divisible en 4 sacs à terme en polyéthylène. Stocker à l'abri de la chaleur et de l'humidité, de préférence à température inférieure à 25°C, et à environ 65% d'humidité relative. Durée de conservation Calimale (DLMO) : ce produit, stocké dans les conditions décrites ci-dessus et dans son emballage fermé d'origine, conserve ses propriétés initiales pendant au moins 2 ans.

0 - PN 1013 - 02/09/97 - 03

Degussa Texturant Systems France SAS

Siège social : 4, place des Aïlles, 92041 BOULOGNE-BILLANCOURT CEDEX FRANCE

Tél : +33 (0)1 47 12 25 25. Fax : +33 (0)1 47 12 26 56. Internet : www.texturantsystems.com

Société par actions simplifiée au capital de 79 543 000 euros, RCS NANTERRE B 433 920 188, une société du Groupe Degussa

degussa.

Texturant Systems

# Unipectine™ AMP 805

## PROPRIETES

### DISPERSION

Pour disperser le produit sans grumeaux :

- soit le prémélanger avec d'autres ingrédients secs, puis verser la préparation dans le liquide sous vive agitation. Maintenir l'agitation jusqu'à dispersion complète.
- soit l'incorporer à un milieu non solvant (huile, alcool, solutions concentrées de sucres > 65°Brix).

### DISSOLUTION

La dissolution du produit est liée au milieu et au procédé : elle est favorisée par le traitement thermique (temps, température), le cisaillement (agitateur, homogénéisateur). Une dissolution totale est obtenue rapidement à partir de 80/85°C. Elle peut être délicate dans un milieu riche en calcium (eau de duré > 80 ppm Ca<sup>++</sup>, lait) : elle nécessite alors un temps de contact long ou l'utilisation de sels séquestrants.

### MILIEUX / UTILISATION

Le produit peut être utilisé dans des milieux aqueux, laitiers ou fruités, il est toutefois standardisé dans le lait, pour assurer une constance de réactivité dans les produits laitiers.

### TEXTURE

La texturation apparaît lors du refroidissement par interaction de la pectine avec le calcium disponible. La texture finale est obtenue après 24 heures.

## DESCRIPTION

UNPECTINE™ AMP 805 est un additif alimentaire utilisé comme agent texturant. C'est un épaississant et/ou gélifiant (en présence d'ions calcium). Il forme des gels thermoréversibles parfois thixotropes présentant une texture souple et onctueuse. Son utilisation est particulièrement recommandée pour les applications laitières.

Ce produit est conforme aux normes et prescriptions de la FAO/OMS, de la CEE, de la FDA (CFR) et à celles du FCC. Toutefois, il appartient à l'utilisateur de s'assurer des dispositions légales d'emploi du pays où la préparation sera consommée.

Le produit est constitué de :

- PECTINE AMIDÉE FAIBLEMENT ESTÉRIFIÉE

E 440

Standardisée par ajout de sucre

## CARACTERISTIQUES

Degré d'estérification : 30 à 37 %

Degré d'amidation : 14 à 16 %

pH : 4,2 à 5,0 - mesuré en solution aqueuse à 1 %

Aspect, Goût, Odeur : Poudre inodore et insipide, de couleur blanc-crème à beige-clair

Granulométrie : au moins 99 % inférieure à 315 microns (Tamis AFNOR N° 50)

Perte au séchage : Maxi 12 %

Bactériologie : Germes totaux : maxi 1000 par gramme  
 Levures et Moisissures : maxi 100 par gramme  
 Germes pathogènes (P. val dans 1 gramme, Salmonella dans 10 grammes) : tests négatifs

## CONDITIONNEMENT ET STOCKAGE

Caisse carton de 25 Kg net doublée d'un sac interne en polyéthylène.  
 Stocker à l'abri de la chaleur et de l'humidité, de préférence à température inférieure à 25°C, et à environ 60% d'humidité relative.  
 Durée Limite d'Utilisation (DLUO) : ce produit, stocké dans les conditions décrites ci-dessus et dans son emballage fermé d'origine, conserve ses propriétés habituelles pendant au moins 2 ans.

M - PN 2126 - 02 09 97 - 03

Degussa Texturant Systems France SAS

Siège social : 4, place des Aïles 82641 NOUËVILLE-BILLANCOURT CEDEX FRANCE

Tél +33 (0)1 47 12 25 25, Fax +33 (0)1 47 12 28 56, Internet : www.lesdegreestexturant.com

Société par actions contrôlée au capital de 78 543 000 euros, RCS NANTERRE N 433 970 184, une société du Groupe Degussa

## DEFINITIONS

### Gélification :

La gélification est l'une des propriétés les plus importantes des macromolécules dans un système alimentaire, elle joue un rôle important dans la préparation de nombreux aliments.

La gélification est l'association de macromolécules ou de fragments de macromolécules pour former un réseau tridimensionnel continu retenant entre ses mailles la phase liquide et capable de résister à certaines contraintes physiques.

La formation de ce réseau suppose donc l'organisation progressive des macromolécules initialement distribuées au hasard dans la solution par l'intermédiaire de « zones de jonctions » entre les macromolécules.

Plusieurs étapes dans la formation du gel peuvent être distinguées :

- L'état « SOL », ou le polymère forme une solution, les macromolécules ne sont pas reliées les unes aux autres.
- L'état « GEL » apparaît quand suffisamment de chaîne se sont associées pour former un réseau d'abord élastique.
- Et au fur à mesure que les chaînes s'organisent entre elles, le gel devient de plus en plus rigide.

### Viscosité :

On utilise communément le qualificatif de visqueux pour décrire une chose de consistance pâteuse, ni liquide, ni solide. Plus qu'une simple caractéristique, la viscosité est un phénomène physique important et intéressant.

Ce phénomène est une caractéristique de la matière, quel qu'en soit l'état physique : gazeux, liquide ou à la limite solide,

La viscosité d'un liquide est la résistance plus ou moins grande qu'opposent les molécules de ce liquide aux glissements les unes par rapport aux autres.

Deux types de fluides sont considérés :

- D'une part les fluides newtoniens qui satisfont à la loi de Newton. Ces fluides ont un coefficient de viscosité indépendant du gradient de vitesse. La viscosité reste constante quelque soit la valeur de la contrainte appliquée,
  - D'autre part les fluides non-newtoniens. La viscosité varie selon la contrainte appliquée.
1. Fluides rhéofluidifiants (ou pseudoplastiques), Ces fluides ont une viscosité qui diminue si la contrainte ou la vitesse de cisaillement augmente.
  2. Fluides rhéoépaississants, la viscosité augmente si la contrainte de cisaillement augmente (ou la vitesse de cisaillement augmente).

## RESUME

La consommation de produits alimentaires manufacturés est en constante évolution. L'amélioration de la texture et de la stabilité de ces produits, nécessite l'utilisation d'additifs alimentaires.

Les polysaccharides et les protéines sont parmi les macromolécules les plus employées, ces derniers peuvent interagir et modifier le devenir des nutriments dans le tractus digestif.

La présente étude, cherche à mettre en évidence L'influence de trois types de pectines, la Pectine Légèrement Estérifiée (PLM), la Pectine Hautement Estérifiée (PHM) et La Pectine Légèrement Estérifiée Amidée (PA), sur la digestion gastrique *in vitro* de la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -LG).

Une mesure de la turbidité des mélanges  $\beta$ -lg-pectine a été réalisée lors de la protéolyse. L'effet des pectines sur l'activité enzymatique de la pepsine a également été évalué.

La présence des trois pectines à une concentration de 50%, provoque une augmentation du taux d'N quelque soit le pH considéré, malgré une inhibition significative de l'activité enzymatique de la pepsine avec les pectines.

La turbidité de  $\beta$ -lg pendant la protéolyse a été réduite par l'ajout de pectines, en raison de la formation de complexes électrostatiques entre cette protéine et les pectines.

L'augmentation du taux d'N pourrait être un résultat faux positif, en raison de la difficulté de précipiter les protéines par l'acide trichloracétique, et de la formation de complexes électrostatiques démontré par la diminution de la turbidité.

## ABSTRACT

The consumption of manufactured food products is constantly changing. Improving the texture and stability of these products requires the use of food additives. Polysaccharides and proteins are among the most commonly used macromolecules, which can interact and alter the fate of nutrients in the digestive tract.

The present study seeks to highlight the influence of three types of pectins, Slightly Esterified Pectin (PLM), Highly Esterified Pectin (PHM) and Slightly Esterified Amidate Pectin (PA), on *in vitro* gastric digestion of  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG). A turbidity measurement of  $\beta$ -lg-pectin mixtures was performed during proteolysis. The effect of pectins on pepsin enzymatic activity was also evaluated. The presence of the three pectins at a concentration of 50%, causes an increase in the level of N whatever the pH considered, despite a significant inhibition of the enzymatic activity of pepsin with pectins. The  $\beta$ -lg turbidity during proteolysis was reduced by the addition of pectins, due to the formation of electrostatic complexes between this protein and pectins. The increase in the N level could be a false positive result, due to the difficulty of precipitating proteins by trichloroacetic acid, and the formation of electrostatic complexes demonstrated by the decrease in turbidity.

## ملخص

إن استهلاك المنتجات الغذائية المصنعة في تغير مستمر. فتحسين الملمس والاستقرار لهذه المنتجات يتطلب استخدام الإضافات الغذائية. السكريات المتعددة و البروتينات هي من بين الجزيئات الأكثر استعمالاً، إذ أنها يمكن أن تتفاعل وتغير مصير المواد الغذائية في الجهاز الهضمي. هذه الدراسة تبحث عن توضيح تأثير ثلاثة أنواع من البكتينات : البكتين مؤسفرة قليلاً (PLM)، البكتين مؤسفرة عالياً (PMH) والبكتين أميدي مؤسفرة قليلاً (PA)، على عملية الهضم في المعدة في المختبر لـ  $\beta$ -

كما تم إنجاز قياس العكارة لخلائط  $\beta$ -lg-البكتين خلال تحلل البروتين. إلى جانب تقييم تأثير البكتين على نشاط انزيم البيسين. وجود البكتينات الثلاثة في تركيز 50 %، يسبب زيادة في معدل N بغض النظر عن درجة الحموضة، على الرغم من تثبيط واضح في نشاط انزيم البيسين على البكتينات.

تم تخفيض تعكر  $\beta$ -LG خلال التحلل البروتيني بإضافة البكتين، ويرجع ذلك إلى تكوين المجمعات الكهربائية الساكنة بين هذا البروتين والبكتينات. زيادة كمية N يمكن أن تكون نتيجة إيجابية كاذبة، وذلك بسبب صعوبة ترسيب البروتينات من طرف حمض التريكوراسيتيك، وتشكيل المجمعات الكهربائية الساكنة المبينة بانخفاض التعكر.