

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements.....	xix
Avant-Propos.....	xxi
Introduction générale.....	1
Chapitre 1. Revue de littérature.....	5
1.1. L'enrichissement en fibres et en protéines.....	5
1.1.1. Les fibres alimentaires.....	5
1.1.1.1. Définition et généralités.....	5
1.1.1.2. Les intérêts nutritionnels des fibres alimentaires.....	6
1.1.1.3. Les besoins en fibres.....	6
1.1.2. Les protéines.....	7
1.1.2.1. Généralités.....	7
1.1.2.2. Les intérêts nutritionnels des protéines.....	9
1.1.2.3. Les besoins en protéines.....	9
1.1.3. Les défis d'enrichissement en fibres et protéines.....	10
1.1.3.1. La demande des consommateurs.....	10
1.1.3.2. Le développement de nouveaux produits enrichis.....	11
1.1.3.3. Les boissons.....	13
1.1.3.4. Les barres de collation.....	14
1.2. Les systèmes mixtes protéine-polysaccharide.....	16
1.2.1. Les interactions protéine-polysaccharide (P-PS).....	16
1.2.1.1. Le comportement des systèmes mixtes P-PS.....	16
1.2.1.2. Les facteurs influençant les interactions P-PS.....	17
1.2.2. Les propriétés fonctionnelles des complexes P-PS.....	20
1.2.2.1. Stabilité et solubilité des protéines.....	20
1.2.2.2. Viscosité des systèmes mixtes.....	20
1.2.2.3. Gélification des systèmes mixtes.....	21
1.2.3. Quelques applications alimentaires basées sur les complexes P-PS.....	22
1.2.3.1. Agent de texture.....	22
1.2.3.2. Agent stabilisant.....	22
1.2.4. Les systèmes mixtes protéines de lactosérum-pectine.....	23
1.2.4.1. Les protéines de lactosérum.....	23
1.2.4.2. La pectine.....	24
1.2.4.3. Les interactions protéines de lactosérum-pectine.....	26
1.3. Les fibres des fruits comme source intéressante de pectine.....	28
1.3.1. La composition générale des fruits.....	29
1.3.2. Les polysaccharides de la paroi cellulaire végétale.....	29
1.3.3. Le potentiel nutritionnel et fonctionnel des fibres de fruits.....	31
1.3.4. L'effet des procédés de transformation alimentaire sur la pectine des fruits.....	32
1.3.4.1. Les réactions non-enzymatiques.....	33
1.3.4.2. Les réactions enzymatiques.....	33
1.3.5. Techniques de caractérisation de la pectine des fruits.....	35
1.3.5.1. Les teneurs en fibres et en pectine.....	35

1.3.5.2. Fractionnement de la pectine	35
1.3.5.3. Détermination du degré de méthylation	37
1.4. Le potentiel du bleuet comme source de fibres et de pectine	38
1.4.1. Présentation générale du bleuet	38
1.4.2. La production et la consommation du bleuet	40
1.4.3. La composition en fibres du bleuet	41
1.4.4. L'importance des composés phénoliques du bleuet	43
1.4.4.1. La composition des composés phénoliques du bleuet	43
1.4.4.2. Les interactions protéine-polysaccharide-polyphénol	45
1.5. Problématique, hypothèse, but et objectifs de recherche	48
1.5.1. Problématique	48
1.5.2. Hypothèse	48
1.5.3. But général	48
1.5.4. Objectifs	49
Chapitre 2. Application d'un blanchiment à basse température pour moduler la	
structure de la pectine au sein de purées de bleuets.....	51
Transition contextuelle	51
Résumé	53
Abstract	55
2.1. Introduction	57
2.2. Materials and methods	58
2.2.1. Chemicals	58
2.2.2. Plant material	58
2.2.3. Characterization of purees from six blueberry cultivars	59
2.2.3.1. Composition and physicochemical characterization	59
2.2.3.2. Extraction of alcohol-insoluble residue (AIR)	59
2.2.3.3. Pectin content	59
2.2.3.4. Degree of methylation	60
2.2.4. Heat treatments and analysis	60
2.2.4.1. Heat treatments	61
2.2.4.2. Fiber characterization	62
2.2.4.3. Viscosity	62
2.2.4.4. Particle size	62
2.2.4.5. Extraction of pectin-rich fractions	62
2.2.4.6. Monosaccharide composition	63
2.2.4.7. Total phenolic content	63
2.2.5. Statistical analysis	64
2.3. Results and discussion	64
2.3.1. Characterization of purees from six blueberry cultivars	64
2.3.2. Influence of heat treatment on the purees	66
2.3.3. Influence of heat treatment on the pectin structure and solubility	68
2.3.3.1. Degree of methylation of pectin in AIR	68
2.3.3.2. Pectin solubility and distribution of the pectin-rich fractions	69
2.3.3.3. Monosaccharide composition of the pectin-rich fractions	71
2.3.3.4. Degree of methylation in the pectin-rich fractions	73
2.4. Conclusion	74
2.5. Acknowledgements	75
Chapitre 3. Étude des interactions entre la pectine d'une purée de bleuets et des	
protéines de lactosérum : fonctionnalité et application.....	77
Transition contextuelle	77
Résumé	79

Abstract.....	81
Graphical abstract.....	83
3.1. Introduction	85
3.2. Materials and methods.....	86
3.2.1. Chemicals.....	86
3.2.2. Material	86
3.2.3. Blueberry puree preparation and characterization	87
3.2.4. WPI-blueberry mixture preparation and analysis.....	88
3.2.4.1. Soluble pectin, whey proteins, and polyphenols.....	88
3.2.4.2. Viscosity and consistency measurements	89
3.2.5. Smoothie preparation and analysis.....	90
3.2.6. Statistical analysis	91
3.3. Results and discussion	92
3.3.1. Pectin and whey protein solubility.....	92
3.3.1.1. Behavior in the mixtures without WPI addition	92
3.3.1.2. Behavior in the mixtures with WPI addition	94
3.3.2. Polyphenol solubility	97
3.3.3. Rheological and textural properties of the WPI-blueberry mixtures.....	99
3.3.4. Case study: Application of WPI-blueberry mixture in the smoothies	102
3.3.4.1. Viscosity and particle size of the smoothies	102
3.3.4.2. Stability of the smoothies	104
3.4. Conclusion	106
3.5. Acknowledgements.....	106
Chapitre 4. Utilisation de la purée de bleuets en interaction avec des protéines de lactosérum pour développer des barres riches en protéines.....	109
Transition contextuelle	109
Résumé.....	111
Abstract.....	113
4.1. Introduction	115
4.2. Materials and methods.....	116
4.2.1. Ingredients	116
4.2.2. WPI-blueberry preparation and bar manufacturing	116
4.2.3. Bar analysis	118
4.2.3.1. Bar composition.....	118
4.2.3.2. Bar physico-chemical characteristics.....	118
4.2.3.3. Bar color	119
4.2.3.4. Bar texture	119
4.2.3.5. Bar water activity and moisture content.....	119
4.2.4. WPI-blueberry powder characterization.....	119
4.2.5. Statistical analysis	120
4.3. Results and discussion	121
4.3.1. Bar composition.....	121
4.3.2. Bar physico-chemical and color characteristics.....	121
4.3.3. Bar texture and changes over time	122
4.3.3.1. Initial bar hardness related to the hydration properties of ingredient powders.....	123
4.3.3.2. Bar hardening over time related to the hydration properties of bars	127
4.4. Conclusion	130
4.5. Acknowledgements.....	130
Conclusion générale	131
Principaux résultats et apports scientifiques	131

Portée des découvertes et retombées du projet	135
Limites des travaux	137
Perspectives.....	139
Bibliographie.....	141
Annexes.....	159
Annexe 1. Matériel supplémentaire pour le chapitre 2.....	159
Annexe 2. Matériel supplémentaire pour le chapitre 3.....	162
Annexe 3. Matériel supplémentaire pour le chapitre 4.....	166

Liste des tableaux

Tableau 1-1. Apport suffisant quotidien en fibres chez les adultes	7
Tableau 1-2. Teneurs en fibres totales de fruits communs (USDA 2017).....	41
Tableau 1-3. Caractérisation des fibres du bleuet	42
Tableau 1-4. Teneurs en polyphénols dans le bleuet en corymbe (non-exhaustives)	45
Table 2-1. Physicochemical characteristics and composition (g/100 g dry weight) of highbush blueberry cultivars in 2014.....	65
Table 2-2. AIR, fiber and pectin contents (g/100 g dry weight) and total phenolic content (g gallic acid equivalent/100 g dry weight) of the heat-treated purees	66
Table 3-1. Moisture, protein, pectin, and polyphenol contents (g/100 g dry weight), and pectin degree of methylation of the initial purees	88
Table 4-1. Bar composition (g/serving of 55 g, wet basis) and energy value	121
Table 4-2. Bar physico-chemical characteristics and color changes over time	122
Table 4-3. Bar hydration characteristics over time	128

Liste des figures

Figure 1-1. Structure générale des protéines	8
Figure 1-2. Comportement des systèmes mixtes protéine-polysaccharide en solution.....	16
Figure 1-3. Ensemble des facteurs influençant les interactions protéine-polysaccharide et la formation de complexes.....	19
Figure 1-4. Illustration simplifiée des trois principaux domaines des molécules de pectine	25
Figure 1-5. Section d'une chaîne de $\alpha(1\rightarrow4)$ -D-galacturonane partiellement méthylée en position C-6.....	25
Figure 1-6. Importance du pH dans la formation des complexes protéines de lactosérum-pectine.....	27
Figure 1-7. Principaux composants des fruits.....	29
Figure 1-8. Représentation schématique d'une cellule végétale (A) et de sa paroi cellulaire (B)	30
Figure 1-9. Réseau des polysaccharides de la paroi cellulaire végétale	31
Figure 1-10. Représentation schématique des principales réactions enzymatiques et non-enzymatiques de la pectine	32
Figure 1-11. Schéma du fractionnement de la pectine	36
Figure 1-12. Saponification alcaline de la pectine (acide galacturonique) et libération du méthanol	38
Figure 1-13. Photographies des deux grandes espèces de bleuets au Canada	39
Figure 1-14. Classification des principales classes de polyphénols des baies, selon leurs structures chimiques.....	44
Figure 2-1. Schematic overview of the experimental setup	61
Figure 2-2. Degree of methylation of AIR and the water- and chelator-soluble pectin fractions (WSP and CSP) from the heat-treated purees	68
Figure 2-3. Relative amount of pectin-rich fractions	70
Figure 2-4. Ratio of GalA to neutral monosaccharides in pectin-rich fractions	72
Figure 3-1. Pectin (A), whey protein (B), and polyphenol (C) solubility in the WPI-blueberry mixtures.....	93
Figure 3-2. Viscosity (A) and firmness (B) of the WPI-blueberry mixtures.....	100
Figure 3-3. Apparent viscosity of the smoothies at 45 s^{-1} over storage time and mean particle size depending on the WPI concentration.....	103
Figure 3-4. Global Turbiscan stability index of the smoothies over time (20°C) depending on the WPI concentration	105
Figure 4-1. Flow chart illustrating the preparation of NC (non-complexed) and C (complexed) powders and bars.....	117
Figure 4-2. Bar hardness changes over time.....	123
Figure 4-3. Protein solubility (A) and global solubility (B) of powders	124

Liste des abréviations

β -lg	β -lactoglobuline
AGal / GalA	Acide galacturonique / Galacturonic acid
AIR	Résidu insoluble dans l'alcool / Alcohol-insoluble residue
Ara	Arabinose / Arabinose
C	Complexed (bar or powder)
CSP	"Pectine chélatée" / Chelator-soluble pectin
DF	Dietary fiber
DM	Degré de méthylation / Degree of methylation
Gal	Galactose / Galactose
H	Heated (puree)
HG	Homogalacturonane / Homogalacturonan
IDF	Insoluble dietary fiber
IEP	Isoelectric point
IPL / WPI	Isolat de protéines de lactosérum / Whey protein isolate
LTB	Blanchiment à basse température / Low-temperature blanching
LTB+P	Blanchiment à basse température + pasteurisation / Low-temperature blanching + pasteurization
NC	Non-complexed (bar or powder)
NH	Non-heated (puree)
NSP	"Pectine liée" / Carbonate-soluble pectin
Pa	Patriot
PG	Polygalacturonase / Polygalacturonase
PME	Pectine méthyl-estérase / Pectin methyl-esterase
Po	Polaris
P-PS	Protéine-polysaccharide / Protein-polysaccharide
Rha	Rhamnose / Rhamnose
RG	Rhamnogalacturonane / Rhamnogalacturonan
SDF	Soluble dietary
TDF	Total dietary fiber
WSP	Pectine soluble dans l'eau / Water-soluble pectin

When you're curious, you find lots of interesting things to do.

Walt Disney (1901-1966)

Remerciements

Avant d'aller plus loin dans la lecture de cette thèse, je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration et la réalisation de ce projet ainsi qu'à la réussite de ces trois années de doctorat.

Tout d'abord, je voudrais adresser mes remerciements et ma sincère reconnaissance à Sylvie Turgeon, ma directrice de recherche, pour m'avoir acceptée dans son équipe, confié ce beau projet et guidée vers la réussite. Merci pour son aide scientifique et pédagogique, son écoute, ses conseils avisés et ses encouragements. Je remercie également Paul Angers, mon co-directeur, qui m'a initiée à la recherche académique lors d'un stage dans son équipe et qui, tout au long de mon doctorat, a répondu à mes nombreux questionnements physico-chimiques avec bienveillance et passion.

Je remercie aussi Michel Britten pour avoir accepté de faire la prélecture de cette thèse ainsi que l'ensemble des membres du jury pour avoir pris le temps d'évaluer ce travail.

Je tiens également à remercier tout particulièrement les professionnels de recherche qui ont joué un rôle primordial dans l'accomplissement de mon doctorat, souvent même au-delà du travail au laboratoire. Je veux souligner l'aide précieuse de Laurie-Ève Rioux, sa disponibilité et ses nombreux conseils qui m'ont permis d'avancer efficacement dans ce projet. Je suis très reconnaissante de sa présence pour structurer, conseiller, corriger et surtout aiguiller le cheminement de mes travaux. Un grand merci à Diane Gagnon pour son expertise technique et son soutien moral qui m'ont été d'une grande aide dans l'avancée de mes travaux. Toujours pleine de ressources et de solutions, j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec elle au laboratoire. Je n'oublierai pas sa bonne humeur quotidienne, son positivisme, toutes nos conversations et nos rires qui ont ensoleillé mes journées. Merci aussi à Ronan Corcuff pour m'avoir aidée dans la mise au point et la réalisation de méthodes d'analyse, avec patience et gentillesse, merci à Véronique Richard, Mélanie Martineau et Pascal Lavoie.

Un grand merci à Mara Hannan-Desjardins, ma stagiaire devenue une véritable amie, qui a grandement contribué à ce projet, grâce à son implication lors de la mise au point des formulations des barres et des smoothies, de leur réalisation et de leurs analyses.

Je tiens aussi à remercier le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) pour le soutien financier de ce projet. Je remercie également Agridor Inc./Les champs Valoy pour m'avoir permis d'utiliser leurs bleuets pour réaliser mes

travaux. Un merci plus particulier à Agnès Dorval pour nos échanges sur les bleuets.

Je remercie aussi les étudiants de l'équipe de recherche pour leur écoute et leurs conseils lors de mes présentations ainsi que leur collaboration au laboratoire. Je pense en particulier à Léa Guinot et Audrey Gilbert, avec lesquelles j'ai aimé être au laboratoire et passer du temps en dehors.

Mes remerciements sont aussi chaleureusement adressés à mes amis qui ont toujours été là pour me sortir la tête du laboratoire, décompresser, me changer les idées, m'écouter et me soutenir dans mes moments de stress et désarroi. Je remercie ma famille, notamment mes parents Véronique et Yann, mon frère et ma sœur, pour m'avoir laissé traverser l'Atlantique avec sérénité. Malgré la distance (merci aux concepteurs de Skype), leur soutien, leur confiance en moi et leur réconfort dans les moments difficiles ont compté infiniment dans l'accomplissement de mon doctorat. Mes derniers remerciements, mais non les moindres, sont destinés à mon conjoint Cyril qui m'a donné l'envie et la force de faire ce doctorat et qui m'a grandement aidé dans la réalisation de mes travaux. Merci pour sa présence, son appui et son amour.

Avant-Propos

Les travaux de cette thèse font partie d'un projet de recherche intitulé « Appui au développement d'aliments enrichis en protéines et fibres » qui s'inscrit dans le volet « Recherche appliquée » du programme Innov'Action agroalimentaire, financé par le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ).

Cette thèse comporte quatre chapitres. La **revue de littérature** de cette thèse constitue le chapitre 1. Elle met en contexte l'importance nutritionnelle et technologique des fibres et des protéines dans les aliments fonctionnels actuels et les défis d'enrichissement rencontrés par les industriels. Elle décrit ensuite les comportements des systèmes mixtes protéine-polysaccharide (P-PS) ainsi que les connaissances actuelles sur la formation de complexes P-PS, leurs propriétés fonctionnelles et leurs applications alimentaires. Une emphase est mise sur les systèmes protéines de lactosérum-pectine, les deux molécules à l'étude dans cette thèse. Enfin, une présentation des fruits et plus spécifiquement du bleuet comme sources intéressantes et modulables de fibres et de pectine permettra de mieux appréhender l'originalité de ce projet de doctorat face aux études de la littérature sur les complexes P-PS. Ces éléments conduisent à la présentation de l'**hypothèse** de recherche, du **but général** du projet et des objectifs spécifiques. Les trois chapitres suivants présentent les résultats des travaux de cette thèse. Rédigés sous forme d'articles scientifiques, ils présentent les expérimentations réalisées, les résultats obtenus avec leur discussion, ainsi qu'une conclusion spécifique. Le matériel supplémentaire de chaque article est présenté à la section **Annexe** de cette thèse.

Le chapitre 2 présente le premier article tel que publié en août 2017 dans *Journal of Food Science* sous le titre « **Low-temperature blanching as a tool to modulate the structure of pectin in blueberry purees** ». Il caractérise le bleuet en tant que source de fibres et de pectine et met en évidence que la structure de cette dernière peut être modulée par traitement thermique afin de favoriser la complexation ultérieure avec des protéines. Le chapitre 3 a été soumis pour publication dans *Food Hydrocolloids* sous le titre « **Study of interactions between pectin in a blueberry puree and whey proteins: functionality and application** ». Il permet de mieux comprendre le comportement des systèmes mixtes « protéines-fruits » et l'impact des interactions protéine-pectine sur une application modèle de boissons. Le chapitre 4 sera également soumis pour publication dans *Journal of Food Science* sous le titre « **Use of blueberry puree interacting with whey proteins in high-protein bar development** ». Il complète l'étude de la fonctionnalité et de l'application des

complexes protéine-pectine à travers cette fois-ci un aliment solide, à savoir des barres de collation riches en fibres et protéines.

Les auteurs de ces trois articles sont Laura M. Chevalier, Laurie-Eve Rioux, Paul Angers et Sylvie L. Turgeon, lesquels sont membres de l'Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels (INAF), département de Sciences et Technologie des Aliments, Université Laval, Québec, QC, Canada. J'ai contribué à ce travail en planifiant et réalisant la totalité des expériences au laboratoire, en analysant les résultats et en rédigeant entièrement les articles. J'ai également effectué les analyses statistiques, avec l'aide de Laurie-Eve Rioux. Laurie-Eve Rioux, Paul Angers et Sylvie Turgeon m'ont apporté leur soutien et critique scientifique dans la conception et les décisions expérimentales et lors de la rédaction et révision des articles. Pour la mise au point des formulations des smoothies et des barres ainsi que pour la réalisation de leurs analyses dans le temps, j'ai bénéficié de l'aide de Mara-Hannan Desjardins, étudiante au baccalauréat en Nutrition.

Cette thèse se finit par une **conclusion générale** qui présente une synthèse des principaux résultats, met en avant leur contribution à l'avancée scientifique et discute de la portée des découvertes et des retombées du projet. Les limites et les perspectives des travaux y sont également présentées.

Introduction générale

L'impact de l'alimentation sur la santé est au cœur des préoccupations des consommateurs d'aujourd'hui, allant des jeunes adultes aux personnes âgées, qui désirent vivre plus longtemps, mieux, et en santé (AAC 2011; Bigliardi and Galati 2013). Compte tenu du vieillissement de la population, de l'allongement de l'espérance de vie, de l'accroissement de la prévalence de l'obésité, du diabète, et des maladies cardiovasculaires, ils recherchent non seulement des aliments qui comblent leurs besoins physiologiques, mais qui contribuent également à leur qualité de vie et leur bien-être (Bigliardi and Galati 2013). Près d'un tiers des consommateurs canadiens sont prêts à payer plus cher pour des produits favorisant une meilleure santé (Banque de Développement du Canada 2013).

Originaire du Japon, le concept des « aliments fonctionnels » est apparu aux États-Unis et en Europe dans les années 1990 et n'a cessé de croître parallèlement avec l'intérêt de la population envers la nutrition (Nielsen 2016). Santé Canada définit un aliment fonctionnel comme « semblable en apparence aux aliments conventionnels, faisant partie de l'alimentation normale et procurant des bienfaits physiologiques démontrés et/ou réduisant le risque de maladie chronique au-delà des fonctions nutritionnelles de base » (Santé Canada 1998). Les aliments fonctionnels représentent un domaine majeur de recherche et d'innovation dans l'industrie alimentaire (Bigliardi and Galati 2013; Siro et al. 2008) et connaissent une forte croissance internationale (AAC 2016c; Grand View Research 2016). En 2015, le marché mondial des aliments fonctionnels a généré des revenus de près de 130 milliards de dollars US, dont 28% étaient générés par l'Amérique du Nord (Grand View Research 2016). Ces revenus devraient doubler d'ici 2024 (Grand View Research 2016). Au Canada, le secteur des aliments fonctionnels et des produits de santé naturels est un marché encore jeune et représente le segment de l'industrie agricole et agroalimentaire connaissant la croissance la plus rapide (AAC 2016c).

En raison de leurs effets physiologiques importants dans le contrôle du poids corporel et la prévention de maladies chroniques (Anderson and Moore 2004; Anderson et al. 2009; Veldhorst et al. 2008), les fibres et les protéines sont les deux ingrédients les plus utilisés dans les aliments fonctionnels et les plus recherchés par les consommateurs (AAC 2016c; IFIC Foundation 2016; 2017a; Bizzozero 2017). Cependant, les enrichissements en fibres et en protéines sont associés à des altérations des propriétés organoleptiques des aliments, comme une augmentation de la viscosité des boissons et un durcissement des

barres de collation, ce qui diminue l'appréciation globale des produits enrichis (Soukoulis et al. 2009; Sun-Waterhouse et al. 2010a; Tiziani and Vodovotz 2005; Hogan et al. 2012; Lu et al. 2016; Grigor et al. 2016).

Certaines fibres, dont la pectine, présente naturellement dans les produits végétaux, sont des polysaccharides chargés qui peuvent interagir avec les protéines et former des complexes par interactions électrostatiques associatives (Syrbe et al. 1998; Tolstoguzov 1991; 1997). Ces interactions protéine-polysaccharide (P-PS) engendrent des propriétés fonctionnelles variées capables de modifier la texture et la structure des systèmes mixtes (Schmitt et al. 1998; Turgeon and Laneville 2009). Par exemple, les stabilités colloïdale et thermique des protéines peuvent être augmentées par leur complexation avec les polysaccharides et la viscosité des systèmes peut parfois être réduite. Les complexes P-PS pourraient donc être un outil intéressant pour aider à la formulation d'aliments fonctionnels de qualité, tout en permettant de les enrichir en protéines et en fibres. Les travaux antérieurs de notre laboratoire ont permis de mieux appréhender le comportement des systèmes mixtes et la formation de complexes P-PS ainsi que d'améliorer la compréhension des propriétés rhéologiques et gélifiantes résultantes (Bertrand 2008; Girard et al. 2004; Girard et al. 2002; Laneville et al. 2000). Toutefois, ces études sont restées très fondamentales et concernaient des milieux et conditions éloignés de la réalité industrielle et des matrices alimentaires. À ce jour, aucune étude publiée ne traite de l'application des complexes P-PS dans des produits alimentaires avec des concentrations dignes d'un enrichissement à la fois en protéines et en fibres.

En plus de la qualité organoleptique et nutritionnelle des aliments, les consommateurs d'aujourd'hui désirent des produits composés d'ingrédients simples et naturels. Or, les polysaccharides utilisés dans les études sur les complexes P-PS sont des molécules extraites et purifiées chimiquement. Les fruits représentent des sources naturelles de fibres et contiennent de la pectine pouvant interagir avec les protéines. La structure de cette pectine peut être modifiée au sein du fruit à l'aide de traitements thermiques (Christiaens et al. 2014; Sila et al. 2009b), ce qui pourrait favoriser les interactions protéine-pectine et la formation de complexes. Au Canada, le bleuets est le fruit le plus important en termes de production, de valeur générée et de volume d'exportation (AAC 2016b). Sa consommation et son utilisation dans les produits alimentaires ne cessent de croître, notamment grâce à ses propriétés antioxydantes (AAC 2010; MAPAQ 2016). De plus, il contient plus de 2% de fibres. Le bleuets s'avère donc être une matrice de choix

pour étudier les interactions protéine-pectine et qui peut être facilement incorporée dans des applications alimentaires.

Ainsi, ce projet de doctorat a pour but général de développer un nouvel ingrédient fonctionnel basé sur la formation de complexes entre des protéines de lactosérum et la pectine de bleuets afin de formuler des aliments et boissons riches en protéines et en fibres et d'étudier en quoi ces complexes peuvent améliorer leurs propriétés rhéologiques et texturales. Ces travaux seront un appui réel et novateur au développement de produits alimentaires fonctionnels sains et nutritifs, enrichis à la fois en protéines et en fibres. Ils présentent une grande dimension appliquée dans laquelle les industriels du secteur de l'agro-alimentaire pourront y trouver un intérêt concret, en pleine adéquation avec l'essor des aliments fonctionnels.

Chapitre 1. Revue de littérature

1.1. L'enrichissement en fibres et en protéines

Les fibres et les protéines sont les deux familles de molécules à l'étude dans cette thèse. Ce sont deux types de nutriments dont les effets bénéfiques pour la santé humaine sont bien connus. Leur incorporation dans les produits alimentaires est très recherchée sur le marché mais représente des défis de formulation pour les industriels afin de satisfaire les attentes des consommateurs.

1.1.1. Les fibres alimentaires

1.1.1.1. Définition et généralités

Les fibres alimentaires sont des polymères glucidiques dont la définition précise varie selon les pays et les organismes scientifiques (Phillips 2013). La tendance internationale consiste à préciser les caractéristiques chimiques de base des fibres alimentaires ainsi que leur résistance à la digestion, de même qu'à exiger qu'elles procurent des effets physiologiques. La définition la plus récente retenue par Santé Canada (Santé Canada 2012b) est la suivante :

« Les fibres alimentaires sont :

- 1) les glucides ayant un degré de polymérisation ou nombre d'unités de saccharides de 3 ou plus naturellement présents dans les aliments d'origine végétale et n'étant ni digérés ni absorbés dans l'intestin grêle ;

et 2) les fibres nouvelles acceptées. »

Les fibres nouvelles comprennent notamment « les substances tirées de sous-produits agricoles et de matières végétales brutes, les substances d'origine animale ou bactérienne, les substances chimiquement modifiées et les produits de synthèse, qui n'ont habituellement pas d'antécédents d'utilisation en tant que sources de fibres alimentaires » (Santé Canada 2012b). La plupart des fibres alimentaires proviennent de la paroi cellulaire des fruits, des légumes, des noix, des graines de céréales et des graines oléagineuses (Cui et al. 2011). Les fibres sont classées en deux catégories basées sur leur solubilité dans l'eau : les fibres solubles et les fibres insolubles (Davidson and McDonald 1998; Dikeman and Fahey 2006; Roberfroid 1993). Les fibres insolubles, principalement constituées de cellulose, d'hémicellulose et de lignine, servent essentiellement d'agents

gonflants, ce qui réduit le temps de transit et augmente le poids des selles. Ces fibres sont particulièrement retrouvées dans les céréales à grains entiers et le pain complet. Les fibres solubles, telles que les pectines, les gommes et certaines hémicelluloses, sont caractérisées par leur capacité à augmenter la viscosité du *bolus* alimentaire, réduisant les concentrations sanguines de glucose et de cholestérol. Contrairement aux fibres insolubles, les fibres solubles sont fermentées par la microflore du côlon, ce qui aboutit à la libération d'acides gras à chaînes courtes jouant un rôle important dans l'homéostasie de l'organisme (Davidson and McDonald 1998).

1.1.1.2. Les intérêts nutritionnels des fibres alimentaires

Les intérêts nutritionnels des fibres alimentaires sur la santé humaine ont été intensément étudiés depuis les années 1970 et sont désormais bien connus et explicités. Les effets physiologiques des fibres alimentaires reconnus par Santé Canada (Santé Canada 2012b) sont :

- la régularisation de la fonction intestinale en augmentant le volume des selles ;
- la réduction des taux sériques de cholestérol total et/ou de cholestérol des lipoprotéines de faible densité ;
- la diminution de la glycémie et/ou de l'insulinémie postprandiales ;
- la procuration des métabolites énergétiques par la fermentation colique.

L'augmentation de la consommation d'aliments riches en fibres ou des suppléments de fibres réduit la concentration sanguine lipidique, abaisse la tension artérielle, améliore la maîtrise de la glycémie chez les personnes diabétiques, favorise la régulation intestinale, facilite la perte et le contrôle de poids et semble améliorer la fonction immunitaire (Anderson et al. 2009). Les personnes qui consomment de généreuses quantités de fibres alimentaires, comparativement à celles qui ont un apport en fibres minime, présentent moins de risques de développer des maladies cardiovasculaires, des accidents vasculaires cérébraux, de l'hypertension, du diabète, de l'obésité, certains problèmes gastro-intestinaux et certains cancers comme celui du côlon (Anderson et al. 2009; Jenkins et al. 2000; Kendall et al. 2010; Mann and Cummings 2009).

1.1.1.3. Les besoins en fibres

L'Enquête sur la santé dans les collectivités canadiennes (ESCC 2.2), réalisée en 2004, fournit les données les plus récentes sur la consommation alimentaire et l'apport nutritionnel des Canadiens de tous âges (Santé Canada and Statistique Canada 2004).

L'apport suffisant (AS) en fibres a été fixé à 14 g/1000 kcal/j chez tous les groupes d'âge d'un an et plus (IOM 2005). L'AS correspond à l'apport quotidien moyen recommandé estimé par rapport à l'apport nutritionnel chez un ou plusieurs groupes de personnes apparemment en bonne santé qui semblent conserver un statut nutritionnel adéquat. Le **tableau 1-1** ci-dessous indique la quantité approximative correspondante de fibres selon l'âge et le sexe.

Tableau 1-1. Apport suffisant quotidien en fibres chez les adultes

	19 – 50 ans	50 ans et plus
Homme	38 g	30 g
Femme	25 g	21 g

Chez tous ces groupes d'âge et de sexe, d'après l'ESCC 2.2, l'apport moyen en fibres était inférieur à l'AS (Santé Canada 2012a). Plus précisément pour la région du Québec, les apports habituels moyens en fibres des femmes se chiffraient à près de 16 g/j et ceux des hommes étaient de l'ordre de 18 g/j (Institut National de Santé Publique du Québec 2009). Il a donc été postulé que la majorité des adultes québécois et canadiens ont probablement des apports insuffisants en fibres alimentaires. Plus récemment, des apports similaires ont été rapportés chez la population américaine, malgré une augmentation de la quantité de fibres consommée entre 2001 et 2010 (McGill et al. 2015). Le gouvernement canadien continue donc de promouvoir l'importance d'un apport en fibres adéquat auprès de la population.

1.1.2. Les protéines

1.1.2.1. Généralités

Les protéines sont des biopolymères naturellement présents dans les aliments, représentant une classe majeure de nutriments essentiels. Ces macromolécules sont des composés organiques constitués d'un enchaînement linéaire d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques (structure primaire). Sous l'effet de multiples liaisons hydrogène qui s'établissent entre les groupements -CO et -NH des acides aminés, la chaîne polypeptidique s'agence en une ou plusieurs conformations répétées, appelées hélice α et feuillet β (structure secondaire). D'autres liaisons intramoléculaires, telles que des ponts disulfures, des liaisons hydrogène, hydrophobes et/ou ioniques, donnent une conformation

tridimensionnelle (structure tertiaire) aux protéines qui détermine la forme globale des protéines natives. Cette conformation, renforcée parfois par l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques (structure quaternaire), permet de former des « domaines » indépendants déterminant leur fonction biologique, comme par exemple la formation de sites actifs dans le cas des enzymes. La **figure 1-1** schématise la structure des protéines à l'échelle moléculaire.

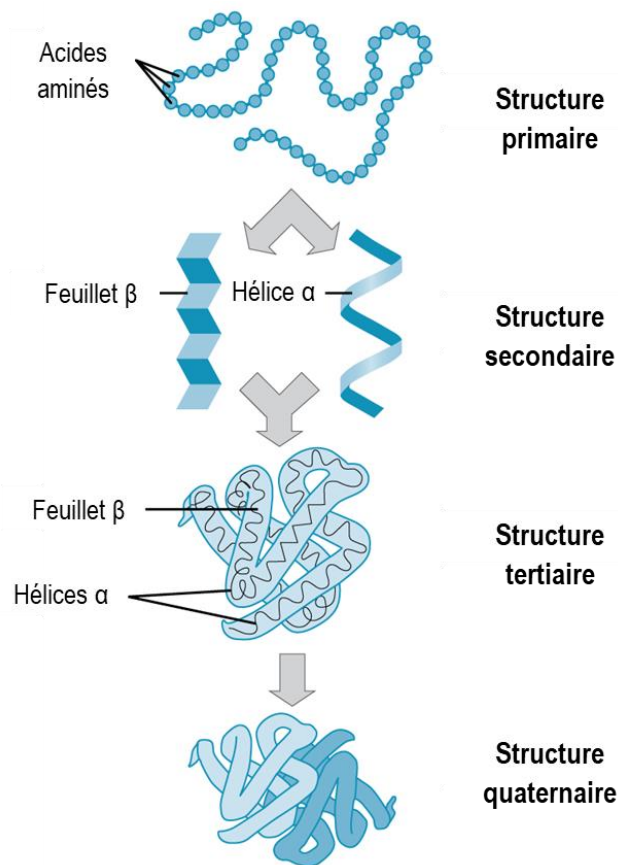


Figure 1-1. Structure générale des protéines
(adaptée de OpenStax Biology's)

Au sein d'une matrice alimentaire, plusieurs molécules de protéines s'agencent entre elles et/ou avec d'autres composés pour former des plus grosses structures colloïdales, comme par exemple des agrégats de protéines, des complexes avec d'autres polymères, des réseaux gélifiés, etc. La formation et la stabilisation de ces « mésostructures », qui découlent généralement des procédés de transformation des aliments, déterminent les propriétés fonctionnelles des protéines et par extension les propriétés texturales et rhéologiques des aliments (Foegeding 2015).

1.1.2.2. Les intérêts nutritionnels des protéines

Tout comme les fibres, les protéines ont également des effets bénéfiques sur la santé démontrés et reconnus. Les aliments à haute teneur en protéines aident au contrôle du poids corporel. En effet, les protéines ont un pouvoir satiétogène plus fort que les glucides et les lipides, lié notamment à une forte thermogénèse, à une augmentation de la libération d'hormones anorexigènes (incrétines), et à une meilleure régulation de la glycémie (Anderson and Moore 2004; Veldhorst et al. 2008; Westerterp-Plantenga et al. 2012; Westerterp-Plantenga et al. 2009). La consommation de protéines est aussi associée au développement de la masse musculaire maigre (Westerterp-Plantenga et al. 2012) et peut également contribuer à une meilleure santé osseuse (Bonjour 2005).

La valeur nutritive des protéines alimentaires dépend de leur composition en acides aminés, de leur digestibilité et des réactions de détérioration qu'elles peuvent subir au cours des processus de transformation et d'entreposage (Friedman 1996). La composition en acides aminés varie selon l'origine des protéines. Globalement, les protéines végétales, bien que complémentaires et indispensables, contiennent moins d'acides aminés essentiels que les protéines animales (Friedman 1996). Les acides aminés essentiels ne peuvent être synthétisés par l'organisme et doivent nécessairement être apportés par l'alimentation. Les protéines laitières, plus précisément les protéines de lactosérum, ont une excellente valeur biologique et sont une source riche d'acides aminés essentiels, en particulier la leucine qui a un rôle majeur dans la stimulation de la synthèse de protéines musculaires (Ha and Zemel 2003; Smithers 2008). Ces atouts spécifiques font de ces protéines un ingrédient de choix pour les sportifs (Smithers 2008). De plus, les protéines de lactosérum sont riches aussi en acides aminés à chaînes ramifiées (leucine, isoleucine et valine) qui sont rapidement digérés et absorbés (Boirie et al. 1997; Abou-Samra et al. 2011), ce qui diminue la concentration de glucose sanguin postprandial, favorise la sécrétion d'incrétines, et ainsi améliore le contrôle de la glycémie et du poids corporel (Akhavan et al. 2010; Nilsson et al. 2004; Abou-Samra et al. 2011). Les protéines de lactosérum seront davantage présentées dans la section **1.2.4.1** de ce chapitre.

1.1.2.3. Les besoins en protéines

Contrairement aux fibres, les Canadiens consomment suffisamment de protéines, d'après l'ESCC 2.2 (Santé Canada 2012a). En effet, près de 100% des Canadiens adultes consomment une quantité de protéines respectant l'étendue des valeurs acceptables pour les macronutriments (ÉVAM) (Santé Canada 2012a). L'ÉVAM est un intervalle d'apports

établi pour une source d'énergie précise, qui est associé à un risque réduit de maladies chroniques et qui permet des apports suffisants en nutriments essentiels. Toutefois, pour les consommateurs à la recherche d'aliments rassasiants, pouvant aider au contrôle du poids corporel et au développement musculaire, les protéines sont un ingrédient très prisé sur le marché actuel (section 1.1.3.1). Par ailleurs, l'apport nutritionnel recommandé (ANR) en protéines a été établi à 0,8 g/kg de poids corporel/j pour les adultes (IOM 2005), soit environ 56 g/j pour les hommes et 46 g/j pour les femmes. L'ANR est l'apport nutritionnel quotidien moyen permettant de répondre aux besoins nutritionnels de la quasi-totalité (97 à 98%) des sujets en bonne santé appartenant à un groupe donné établi en fonction de l'étape de la vie et du sexe. Néanmoins, certains groupes de consommateurs, tels que les végétariens, les sportifs et les personnes âgées peuvent avoir des apports insuffisants en raison de leurs choix de régime alimentaire, de leur activité physique accrue ou encore de leur difficulté à absorber les protéines (Molyneux 2015). Un apport en protéines supérieur à l'ANR est souvent conseillé pour les athlètes, selon le type d'exercice, son intensité, sa durée et sa fréquence. De plus, il est rapporté que l'ANR 0,8 g de protéines/kg de poids corporel/j n'est pas suffisant pour les personnes âgées (Kurpad and Vaz 2000; Campbell et al. 2001) ; un apport plus élevé en protéines pourrait améliorer leur masse et force musculaires, leur état immunitaire, la cicatrisation des plaies, la pression artérielle et la santé des os (Wolfe et al. 2008; Gaffney-Stomberg et al. 2009).

1.1.3. Les défis d'enrichissement en fibres et protéines

1.1.3.1. La demande des consommateurs

Ces dernières années, les consommateurs sont de plus en plus soucieux de leur santé à court et long terme (Nielsen 2016). Ils désirent des aliments « naturels », c'est-à-dire avec des ingrédients simples et naturels, peu transformés, sans additifs (IFIC Foundation 2016; Sloan 2015). De ce fait, ils prêtent un intérêt particulier aux composés présents dans leur alimentation. Les protéines et les fibres sont les deux ingrédients les plus demandés et incorporés dans les collations (Bizzozero 2017; Ohr 2014; Bartelme 2015). Les aliments riches en protéines et en fibres connaissent une forte croissance sur le marché alimentaire mondial. Ces aliments fonctionnels sont en effet très recherchés par les consommateurs qui souhaitent de plus en plus contrôler et/ou perdre du poids, avoir une meilleure forme physique, plus d'énergie, une bonne santé cardiovasculaire et digestive, et vieillir en bonne santé (IFIC Foundation 2016; 2017a; Ohr 2014; Sloan 2015). En 2016, 64% des Américains ont essayé de consommer davantage de protéines et 60%, davantage de

fibres (IFIC Foundation 2016). Outre la valeur nutritionnelle, les consommateurs recherchent des produits de commodité, pratiques, rapides à préparer et/ou consommer, comme par exemple les boissons nutritives, les barres et les substituts de repas (IFIC Foundation 2017a; Kuhn 2015). En plus de désirer des aliments sains et pratiques, les consommateurs veulent des produits de qualité, notamment en termes de texture et de goût (MAPAQ 2017). Le défi majeur de l'industrie alimentaire est donc de concilier toutes ces demandes.

1.1.3.2. Le développement de nouveaux produits enrichis

Les bienfaits des fibres et des protéines sur la santé, les apports insuffisants en fibres et la demande accrue pour la consommation de protéines encouragent les industries alimentaires à développer des produits riches en protéines et en fibres, sans compromettre leur qualité. Au cours des dernières années, un large éventail de suppléments et de nouveaux produits enrichis en protéines a vu le jour, incluant notamment des barres énergétiques et des boissons (Molyneaux 2015). Bien que les protéines végétales soient de plus en plus utilisées, les protéines de lactosérum demeurent les plus fréquemment retrouvées dans les formulations d'aliments enrichis en protéines, pour leur excellente valeur nutritive, leur fonctionnalité variée (texture, émulsification, stabilisation), leur solubilité à travers une large plage de pH et leur goût neutre (Bartelme 2015; Ohr 2014; Nachay 2015a). L'enrichissement en fibres, initialement rencontré dans les produits de boulangerie, les collations et les céréales, s'est étendu vers d'autres catégories de produits comme les produits laitiers et les boissons (Niba 2012). Les fibres les plus couramment retrouvées dans les aliments proviennent des céréales telles que le son de blé, d'avoine ou de riz (Elleuch et al. 2011). Toutefois, les fruits sont également de bonnes sources de fibres (section 1.3) dont la consommation et l'incorporation dans les produits alimentaires sont croissantes ces dernières années (Nachay 2015b; Ohr 2014). Les produits enrichis à la fois en fibres et en protéines demeurent plus rares. Pourtant, ce double enrichissement est intéressant puisqu'il permettrait très probablement de combiner les effets bénéfiques de ces deux nutriments.

Au Canada, la teneur en fibres alimentaires doit être inscrite dans le tableau de la valeur nutritive des aliments. Les allégations indiquant « source de fibres », « source élevée de fibres » et « source très élevée de fibres » peuvent être formulées pour des aliments contenant respectivement 2, 4 et 6 g de fibres au minimum par quantité de référence et par portion déterminée (*Règlement sur les aliments et drogues*, articles 41 à 43 du tableau

suivant l'article B.01.513) (ACIA 2014a). Pour les protéines, un aliment est considéré comme « source élevée de protéines » ou « excellente source de protéines » quand il possède une cote protéique de 20 et 40 respectivement par ration quotidienne raisonnable ((*Règlement sur les aliments et drogues*, articles 8 et 9 du tableau suivant l'article B.01.513) (ACIA 2014b). La cote protéique est obtenue en multipliant la teneur en protéines d'une ration quotidienne normale de l'aliment par le coefficient d'efficacité protéique de l'aliment.

Néanmoins, les quantités requises en fibres et en protéines pour atteindre ces allégations entraînent de véritables défis de formulation pour les fabricants de produits alimentaires. L'augmentation de la concentration en fibres et protéines dans les aliments se traduit souvent par une détérioration de la qualité organoleptique de ces derniers. En effet, les fibres et les protéines sont deux macromolécules qui contribuent à la structure et à la texture des aliments grâce à leurs propriétés fonctionnelles respectives (Cui et al. 2011; Kinsella and Melachouris 1976; Tolstoguzov 1991; Elleuch et al. 2011; Foegeding 2015). Or, la texture des aliments a un effet considérable sur l'appréciation sensorielle générale des produits par les consommateurs (Wilkinson et al. 2000).

Le principal défi rencontré lors de l'enrichissement en fibres est lié à la manière dont les fibres interagissent avec l'eau et les autres composants de l'aliment (Cui et al. 2011). Ces propriétés d'hydratation peuvent servir à améliorer la texture, la viscosité, ou encore la durée de vie des aliments, mais limitent également la quantité de fibres pouvant être incorporée dans les aliments (Elleuch et al. 2011; Cui et al. 2011; Foschia et al. 2013). De manière générale, l'enrichissement en fibres des produits céréaliers tels que les muffins, le pain et les biscuits entraîne une diminution de l'acceptabilité globale, sensorielle et visuelle de ces produits (Grigor et al. 2016). En raison de leur fort pouvoir hygroscopique, les fibres retiennent l'eau au détriment des autres ingrédients, ce qui provoque une diminution du volume et une augmentation de la fermeté de ces aliments (Foschia et al. 2013). Concernant l'enrichissement en protéines, le défi est de taille également. Les hautes teneurs en protéines sont parfois accompagnées de saveurs non-désirées comme l'astringence ou l'amertume, de sensations d'épaisseur et de « farineux » en bouche, réduisant l'appréciation générale des produits (Beecher et al. 2008; Drake et al. 2000). La principale difficulté reste néanmoins la texture et la faible stabilité des produits riches en protéines, due à l'agrégation des protéines entre elles au cours des procédés de transformation des aliments et de leur entreposage (Purwanti et al. 2010). Cela peut

engendrer des problèmes de déphasage dans les boissons et conduire au développement de produits plus denses et durs, comme par exemple des gels, des yogourts (Drake et al. 2000; Mleko 1999) ou encore des barres de collation. Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux problèmes rencontrés dans deux types de produits distincts en forte demande sur le marché actuel et dans lesquels les enrichissements en fibres ou en protéines sont très courants : les boissons et les barres de collation.

1.1.3.3. Les boissons

La fabrication de boissons est la quatrième industrie de transformation des aliments au Canada en termes de ventes (10,4 milliards de dollars en 2014) (AAC 2016a). Les jus réfrigérés et les smoothies faisaient partie des collations santé ayant la plus forte croissance en 2013 (Sloan 2015). Les smoothies sont apparus dans les années 1990 et sont devenus de plus en plus tendance au cours de cette dernière décennie, grâce à leur praticité et leur valeur nutritive (Nielsen 2016). En effet, ils sont un moyen facile et rapide de consommer des fruits qui sont des ingrédients désirés dans les collations pour près de la moitié (47%) des consommateurs américains (Sloan 2015). En outre, bien que les effets sur la santé soient encore débattus entre les jus et les smoothies, les smoothies, composés majoritairement de fruits broyés, conservent davantage les fibres de ces derniers, les composés antioxydants et la vitamine C (Ruxton et al. 2006; Ruxton 2008).

Toutefois, la présence et/ou l'addition de fibres dans les boissons n'est pas sans conséquences. En raison des nombreux groupements hydroxyles sur les chaînes de polysaccharides, les fibres ont une grande capacité d'absorption d'eau déterminée par leur structure chimique, leur poids moléculaire, leur morphologie et la taille des particules (Cui et al. 2011). La flaveur, la texture et l'acceptation générale de smoothies sont altérées avec l'augmentation de la concentration en fibres (Sun-Waterhouse et al. 2010a). Les fibres favorisent l'augmentation de la viscosité en raison de leur taille, de leur enchevêtrement, de leur gonflement et de leur forte rétention d'eau qui conduisent à la formation d'un réseau de fibres hydratées limitant l'écoulement (Soukoulis et al. 2009; Sun-Waterhouse et al. 2010a; Dikeman and Fahey 2006; Cui et al. 2011). Femenia et al. (1997) ont montré néanmoins que l'augmentation de la viscosité dans des sauces peut être réduite en incorporant les fibres seulement à la fin de la préparation de la sauce, ce qui diminue la possibilité d'interactions avec la matrice.

Les boissons sont également une des applications majeures dans lesquelles sont ajoutées des protéines. Là encore, l'enrichissement en protéines pose également des difficultés en termes de viscosité et de stabilité. En effet, l'ajout de protéines peut augmenter la viscosité (Takada and Nelson 1983; Thakur et al. 1996; Tiziani and Vodovotz 2005), ce qui n'est pas toujours souhaité et peut réduire l'appréciation générale des boissons, leur palatabilité et leur commodité (Deshpande et al. 2005; Folkenberg et al. 1999). D'autre part, les boissons enrichies en protéines peuvent être considérées comme des suspensions dans lesquelles la phase solide dispersée correspond aux particules/aggrégats de protéines (Foegeding 2015). La stabilité dans le temps de cette phase colloïdale contribue à la qualité et la durée de vie d'une boisson. L'agrégation des protéines peut conduire à leur précipitation résultant en une séparation de phases. Ce problème est particulièrement rencontré dans les boissons à base de fruits dont l'acidité naturelle diminue la solubilité des protéines et favorise les interactions associatives protéine-protéine (Méric 2012). De plus, les traitements thermiques appliqués pour assurer l'innocuité des boissons engendrent la dénaturation irréversible des protéines qui favorise leur agrégation et en modifie leur fonctionnalité (De Wit 1998). Les caractéristiques des particules/aggrégats résultants dépendent du pH, de la force ionique, de la concentration en protéines, et de la présence d'autres molécules (Nicolai and Durand 2013). L'ampleur de la séparation de phases dépend aussi de la taille des particules/aggrégats et de leur quantité, de la différence de densité entre ces particules et la phase continue (Foegeding 2015; Foegeding et al. 2017). En général, une plus petite taille de particules favorise une meilleure stabilité.

1.1.3.4. Les barres de collation

Les barres de collation représentent une autre application où les enrichissements en fibres et protéines sont retrouvés. Les ventes des barres de collation aux États-Unis en 2014 s'élevaient à 5,5 milliards de dollars et devraient atteindre 6,2 milliards en 2018 (Bartelme 2015). Cette croissance, très certainement similaire au Canada, est notamment due à la demande croissante des barres nutritives riches en protéines. En 2014, près de 45% des barres portaient une allégation mettant en avant leur teneur en protéines, comparé à 24% en 2011 (Bartelme 2015). Pourtant, si l'enrichissement en fibres des barres est relativement facile, l'incorporation de hautes quantités de protéines demeure un défi.

En effet, de fortes concentrations de protéines provoquent habituellement le durcissement des barres qui commence juste après leur production, même en l'absence de traitement

thermique, et continue durant le stockage, ce qui peut altérer les qualités sensorielles et l'appréciation des consommateurs. Le mécanisme exact de durcissement n'est encore pas clairement élucidé et résulte de la combinaison de plusieurs phénomènes chimiques, physiques et thermodynamiques (Banach et al. 2014; Hogan et al. 2012). McMahon et al. (2009) proposent une séparation de phases dont une phase riche en protéines résultant des fortes interactions protéine-protéine qui conduisent à leur agrégation et le durcissement des barres. Il a été suggéré que l'agrégation des protéines est principalement due à la formation de liaisons disulfures intermoléculaires et, dans une moindre importance, à des liaisons non-covalentes (Zhou et al. 2008b; a; Liu et al. 2011). D'autre part, une migration d'eau des protéines vers les molécules à faible poids moléculaire (sucres et polyols) peut également favoriser l'agrégation des protéines et la séparation de phases (Loveday et al. 2009; Loveday et al. 2010). Hogan et al. (2012) ont suggéré que le durcissement résulte en partie des différences de potentiel osmotique et d'activité de l'eau (a_w) des composants individuels ou des micro-régions des barres. Cela entraîne une compétition pour l'eau disponible et des transferts d'eau des domaines à haute a_w vers ceux à plus faible a_w (Hogan et al. 2012; Labuza and Hyman 1998). De plus, ces auteurs ont démontré que les interactions protéine-protéine contribuent à la diminution de zones remplies d'air dans le réseau matriciel formé, ce qui est aussi à l'origine du durcissement des barres (Hogan et al. 2012). Plus récemment, Lu et al. (2016) ont également montré que la migration d'eau contribue au durcissement, accompagnée de la migration des molécules de faibles poids moléculaires en particulier les sucres. Selon ces auteurs, cette migration a lieu en direction des protéines. Les interactions des petites molécules (eau et sucres) avec les protéines diminuent alors la mobilité des petites molécules, ce qui cause des changements de microstructure et par conséquent de texture (Lu et al. 2016).

Le développement de produits enrichis en protéines ou en fibres, stables et satisfaisant les attentes des consommateurs, est donc rempli de défis qui sont principalement dus à l'agrégation des protéines et au fort pouvoir hygroscopique des fibres. Un enjeu important pour l'enrichissement de produits alimentaires en protéines et en fibres consiste à contrôler les interactions de ces macromolécules avec le solvant (eau) mais également entre elles. Ces interactions intermoléculaires font l'objet de la partie suivante de ce chapitre.

1.2. Les systèmes mixtes protéine-polysaccharide

Les protéines (P) et certaines fibres (polysaccharides PS), comme la pectine, sont deux biopolymères porteurs de charges leur permettant d'interagir quand ils sont mélangés ensemble en milieu aqueux (systèmes mixtes). Cette section montrera en quoi le contrôle de ces interactions apparaît être l'élément-clé pour le développement de nouveaux produits alimentaires de qualité.

1.2.1. Les interactions protéine-polysaccharide (P-PS)

1.2.1.1. Le comportement des systèmes mixtes P-PS

Dans les systèmes mixtes P-PS, la nature ionique et polymérique des protéines et de certains polysaccharides est à l'origine de deux phénomènes majeurs : la complexation (interactions associatives) et l'incompatibilité (interactions répulsives) (Tolstoguzov 1997; Syrbe et al. 1998) (**Figure 1-2**). Ces comportements résultent de l'équilibre entre les différentes interactions possibles dans un mélange protéine-polysaccharide-solvant et sont gouvernés par différents facteurs (section 1.2.1.2).

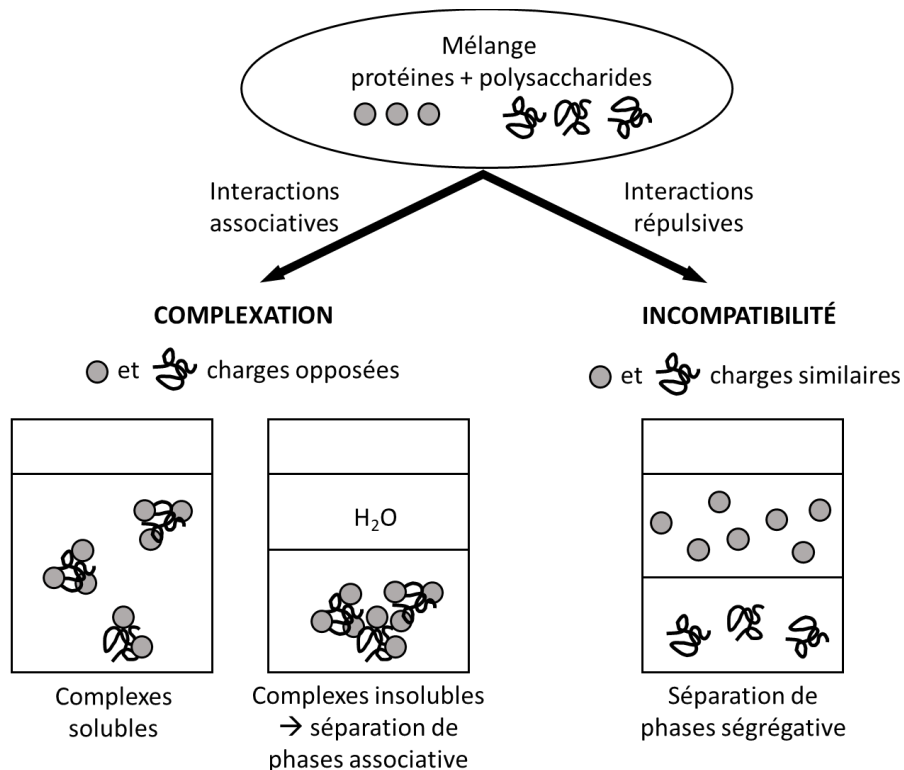


Figure 1-2. Comportement des systèmes mixtes protéine-polysaccharide en solution

(adaptée de Syrbe et al. (1998) et Tolstoguzov (1991))

La complexation résulte des interactions associatives entre des molécules de charges opposées et produit des complexes solubles ou insolubles. La solubilisation des complexes a lieu lorsque les charges opposées portées par les protéines et les polysaccharides sont non-équivalentes. Quand la concentration en biopolymères augmente et que la charge résultante devient nulle (neutralisation), les complexes deviennent insolubles et une séparation de phases associative se produit. Les complexes se retrouvent dans la phase inférieure tandis que le solvant (eau) demeure majoritairement dans la phase supérieure.

L'incompatibilité survient quand les protéines et les polysaccharides portent une charge nette de même signe et résulte en une séparation de phases ségrégative : le système se sépare en deux phases aqueuses dans lesquelles chacun des biopolymères se retrouve concentré séparément.

Dans le cadre de ce projet, notre intérêt s'est porté sur les systèmes mixtes P-PS en conditions associatives car la complexation pourrait être une solution face aux défis d'enrichissement en protéines et en fibres, comme il va en être discuté dans les sections suivantes (1.2.2 et 1.2.3). Afin de favoriser la formation de complexes, il est important de comprendre les facteurs influençant les interactions protéine-polysaccharide (P-PS).

1.2.1.2. Les facteurs influençant les interactions P-PS

Les interactions P-PS sont majoritairement des interactions électrostatiques qui s'établissent entre les charges portées par les protéines et les polysaccharides. Les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes interviennent également mais de façon moindre (Doublier et al. 2000; Schmitt et al. 1998; Girard et al. 2002). Les paramètres physico-chimiques environnementaux tels que le pH, la force ionique, le ratio P:PS et la concentration en biopolymères influencent ces interactions et donc affectent la formation de complexes (Schmitt et al. 1998; Tolstoguzov 1997; Turgeon and Laneuville 2009).

1.2.1.2. a) Le pH

Le pH est un facteur clé dans le comportement des systèmes mixtes car il régit la nature et le nombre de charges portées par les groupements ionisables des biopolymères (carboxylique, amine, sulfaté, hydroxyle, etc). À un pH inférieur à leur point isoélectrique (pI), les protéines portent une charge nette positive, alors qu'à un pH supérieur au pI, leur charge nette est négative. Les polysaccharides se comportent comme des acides faibles :

ils sont chargés positivement à un pH inférieur à leur pKa, et négativement à un pH supérieur. Ainsi, les interactions associatives surviennent dans une gamme de pH située entre le pKa des polysaccharides et le pI des protéines car les deux biopolymères ont alors des charges opposées (Syrbe et al. 1998; Tolstoguzov 1997). Toutefois, la formation de complexes P-PS est possible à un pH supérieur au pI en raison de l'inhomogénéité de la distribution des charges et la présence de zones (« patches ») positives sur les protéines (Schmitt et al. 1998; Doublier et al. 2000). La formation de complexes P-PS débute par la création de complexes solubles à une valeur de pH appelée pH_c qui dépend de la nature des macromolécules complexées (Mattison et al. 1995; Turgeon et al. 2003; Weinbreck et al. 2003). Lorsque le pH diminue, ces complexes interagissent entre eux menant à une séparation de phases associative. Le pH auquel se forment des complexes interpolymériques, qui varie selon la force ionique et le ratio P:PS, est défini comme le pH_ϕ (Mattison et al. 1995).

1.2.1.2. b) *La force ionique*

La force ionique a également une grande influence sur les interactions électrostatiques P-PS puisqu'elle fait varier le degré d'ionisation des biopolymères. Les faibles concentrations en sels peuvent renforcer les interactions associatives en bloquant les sites de répulsion intrapolymérique. En revanche, à de plus fortes concentrations, le sel les affaiblit et induit l'agrégation des protéines entre elles, une caractéristique de l'effet « *salting-out* » des protéines (Wang et al. 2007). Généralement, une force ionique élevée (> 0,3 M) favorise l'incompatibilité entre les protéines et les polysaccharides (Tolstoguzov 2003; 1997).

1.2.1.2. c) *Le ratio protéine:polysaccharide et la concentration en biopolymères*

Le ratio protéine:polysaccharide affecte le type d'interactions privilégiées (P-P, PS-PS ou P-PS) : un ratio élevé favorise les interactions protéine-protéine au détriment des interactions P-PS (Tolstoguzov 1997). Le ratio joue aussi un rôle important sur les caractéristiques des complexes formés, notamment leur taille et leur composition (Turgeon and Laneville 2009). Globalement, l'augmentation du ratio conduit à la formation de complexes interpolymériques de plus grande taille. D'autre part, la formation de complexes peut se faire à partir de très faibles concentrations en biopolymères (0,001%) si la force ionique est suffisamment faible (< 0,2 M) (Tolstoguzov 2003; Turgeon et al. 2003). Cependant, à des concentrations élevées (> 3-12% selon la nature des systèmes),

la compétition pour le solvant entre les macromolécules favorise la séparation de phases (Schmitt et al. 1998; Turgeon and Laneuville 2009; Tolstoguzov 2003).

1.2.1.2. d) Autres facteurs

Les interactions P-PS sont aussi guidées par des facteurs intrinsèques tels que la nature des groupements chargés, la densité et la distribution de charges, le poids moléculaire, la conformation et la flexibilité des biopolymères. Par exemple, une densité de charges plus élevée renforce les interactions électrostatiques entre deux biopolymères de charges opposées (Girard et al. 2002). La température, l'homogénéisation, la force de cisaillement et la pression peuvent aussi influencer la force des interactions, la formation, la morphologie et la stabilité des complexes (Schmitt et al. 1998; Turgeon and Laneuville 2009). De tels facteurs peuvent induire des changements de conformation des protéines et/ou des polysaccharides et des modifications des interactions avec le solvant. La **figure 1-3** synthétise les différents facteurs influençant la formation de complexes P-PS. Lors de la fabrication industrielle des produits alimentaires, bien que le contrôle simultané de tous ces différents facteurs intrinsèques et extrinsèques soit très difficile, il est quand même possible de maîtriser certains de ces paramètres pour moduler le comportement entre les protéines et les polysaccharides et par conséquent la texture et la structure des systèmes alimentaires (Tolstoguzov 1997).

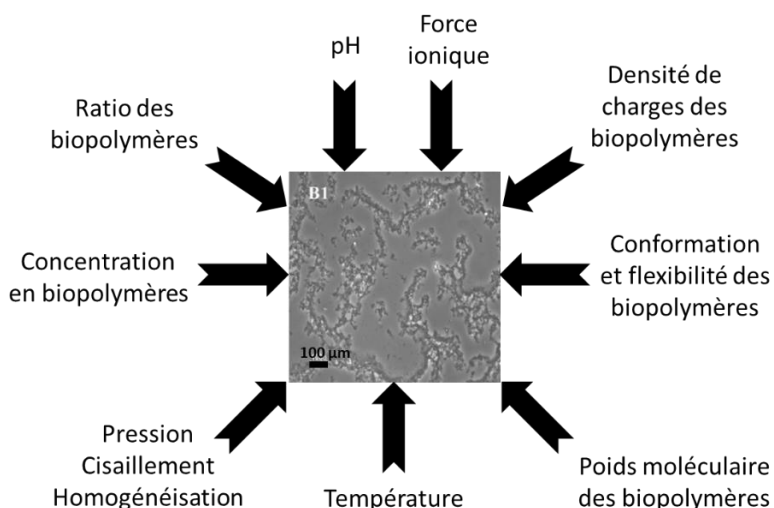


Figure 1-3. Ensemble des facteurs influençant les interactions protéine-polysaccharide et la formation de complexes

(adaptée de Schmitt and Turgeon (2011))

L'image centrale représente la structure microscopique de complexes protéines de lactosérum-pectine, observée par microscopie à contraste de phases (Bédié et al. 2008). La barre d'échelle représente 100 µm.

1.2.2. Les propriétés fonctionnelles des complexes P-PS

Les interactions des systèmes mixtes P-PS gouvernent la stabilité et la solubilité des biopolymères ainsi que leur aptitude à former des solutions visqueuses et/ou des gels pouvant affecter les propriétés rhéologiques et texturales des systèmes mixtes (Tolstoguzov and McClements 2007).

1.2.2.1. Stabilité et solubilité des protéines

La complexation P-PS peut réduire l'agrégation et la précipitation des protéines en solution rencontrée au pI ou lors d'une élévation de température entraînant leur dénaturation. En effet, les polysaccharides bloquent par encombrement stérique les sites réactifs des protéines tels que les groupements hydrophobes et sulfhydryles, réduisant les interactions protéine-protéine (Schmitt et al. 1998). Ibanoglu (2005) a observé que la plus grande stabilité thermique d'un isolat de protéines de lactosérum avait lieu en présence de pectine (vs. gomme de guar et carraghénane). L'augmentation de la viscosité provoquée par la présence de polysaccharides peut également contribuer à diminuer la précipitation des protéines (Ye 2008). Cette amélioration de la stabilité des protéines peut être intéressante lors des traitements thermiques utilisés dans les procédés de transformation des aliments et lors de l'incorporation de protéines dans des produits dont le pH est proche de leur pI .

1.2.2.2. Viscosité des systèmes mixtes

La complexation P-PS présente des effets synergiques ou antagonistes sur les propriétés rhéologiques des systèmes mixtes selon les différents régimes de concentration, la nature des systèmes et la force des interactions P-PS (Turgeon and Laneville 2009; Schmitt and Turgeon 2011). Généralement, l'augmentation de la taille des particules due à la complexation accroît la viscosité des systèmes comparativement aux biopolymères individuels. En revanche, de fortes interactions P-PS peuvent au contraire résulter en des complexes plus petits et compacts, moins hydrophiles et ayant une viscosité réduite (Turgeon and Laneville 2009; Wagoner and Foegeding 2017). Le ratio P:PS et l'état d'agrégation des protéines affecte la taille des complexes et par conséquent la viscosité des systèmes mixtes. Dans le cas par exemple d'un système mixte β -lactoglobuline-xanthane, une forte teneur en protéines (ratio massique > 20:1) entraîne une augmentation de la viscosité après complexation, causée par l'agrégation plus importante des protéines entre elles et à la surface des complexes (Laneville et al. 2000). Le

comportement rhéologique de systèmes mixtes constitués de protéines de lactosérum et de pectine faiblement méthylée a été étudié dans des travaux antérieurs de notre laboratoire (Bertrand 2008) : les ratios P:PS élevés ($\geq 20:1$) favorisent les interactions protéine-protéine au détriment des interactions P-PS, menant alors à un régime d'écoulement similaire aux protéines seules. En revanche, à plus faibles ratios ($\leq 16:1$) et à plus hautes concentrations en solides totaux, la formation de complexes protéine-pectine et le plus haut volume moléculaire associé contrôlent le comportement rhéologique en augmentant la viscosité. En jouant sur les facteurs influençant les interactions P-PS mentionnés dans la section précédente, il apparaît donc possible d'augmenter ou de diminuer la viscosité des systèmes mixtes, selon la fonctionnalité finale désirée du produit.

1.2.2.3. Gélification des systèmes mixtes

Dans les systèmes mixtes P-PS, si un des biopolymères, ou les deux, est dans des conditions de gélification (ex : protéine dénaturée par chauffage), plusieurs types de gels mixtes peuvent être produits. Lorsque les deux biopolymères participent à la formation d'un même réseau par interactions associatives intermoléculaires, les gels mixtes sont dits « couplés » (Turgeon and Laneville 2009). Le ratio, la concentration en solides totaux, le pH et la force ionique sont les principaux facteurs influençant la structure et les propriétés de ces gels. Leur principale propriété est leur très forte capacité de rétention d'eau, comparativement aux protéines seules (Le et al. 2017). Ces gels peuvent être utilisés par exemple pour stabiliser des émulsions, augmenter la fermeté et limiter la synérèse de certaines matrices, comme par exemple les yogourts, ou encore pour encapsuler des composés bioactifs (Le et al. 2017). Toutefois, la formation de ces gels mixtes nécessite de très faibles concentrations en biopolymères ($< 1\%$) ainsi qu'une acidification lente et sans agitation, qui sont des conditions bien éloignées de celles rencontrées dans l'industrie alimentaire. Dans le cadre de ce projet, ne travaillant pas avec des matrices en conditions de gélification, cet aspect des interactions P-PS ne sera pas traité davantage.

Les propriétés fonctionnelles spécifiques des complexes P-PS décrites dans cette section permettent donc d'envisager ces derniers comme un nouveau type de biopolymère. L'amélioration générale de la fonctionnalité des complexes, comparativement à celle des biopolymères isolés, pourrait faciliter l'incorporation simultanée des protéines et des polysaccharides dans des produits alimentaires.

1.2.3. Quelques applications alimentaires basées sur les complexes P-PS

1.2.3.1. Agent de texture

L'utilisation de complexes P-PS en tant qu'ingrédient alimentaire s'est développée à partir des années 1980 pour produire des substituts de viande ou de graisses (Schmitt et al. 1998; Chen and Soucie 1985; Weng-Sherng et al. 1989). La texture de viande mince ou fibreuse peut être obtenue avec l'utilisation de tels complexes (Lefebvre and Thebaudin 1992) ainsi que la texture douce, crémeuse et onctueuse de la matière grasse (Giese 1996). La substitution de la matière grasse par l'incorporation de complexes a été par exemple utilisée dans du glaçage pour gâteaux (Laneuville et al. 2005), de la mayonnaise (Liu et al. 2007) et des yogourts (Krzeminski et al. 2014a). Dans les yogourts, les complexes composés de protéines de lactosérum et de pectine empêchent l'agrégation des protéines de lactosérum durant la fabrication des yogourts, sans affecter la fermeté des yogourts et leurs propriétés d'écoulement apportées par ces protéines (Krzeminski et al. 2014a).

1.2.3.2. Agent stabilisant

Une autre application courante des interactions associatives P-PS consiste en l'addition de pectine en tant qu'agent stabilisant dans les boissons laitières acidifiées comme les yogourts à boire ou les jus de fruits mélangés à du lait (Brejnholt 2010; Syrbe et al. 1998). La pectine s'adsorbe à la surface des micelles de caséines chargées positivement, permettant une stabilisation stérique et électrostatique des caséines, ce qui les empêche de précipiter à un pH inférieur à 4,6, le pI des caséines (Tromp et al. 2004; Pereyra et al. 1997; Marozienne and De Kruif 2000). Pereyra et al. (1997) ont suggéré que l'augmentation de la viscosité de la phase continue due à la pectine non liée favorise également la stabilisation de la boisson. Cependant, dans ces études, la pectine est toujours utilisée davantage comme additif, soit en faible quantité ($\leq 1\%$), et ne peut donc pas être considérée comme une source d'enrichissement en fibres. Toujours dans le domaine des boissons, il a été montré récemment que les purées de fruits et les jus de fruit non clarifiés permettent une bonne stabilisation des protéines (Méric 2012). En effet, la décantation de protéines de lactosérum (6% p/v) dans des boissons à base de purée de fruits (pomme, poire et framboise) était considérablement réduite comparée à un mélange avec de l'eau, et ce sans différence significative de la viscosité. Ces auteurs ont attribué cet effet à la pectine naturellement présente dans les fruits. Cette stabilisation était plus importante

avec des isolats de protéines plutôt que des hydrolysats dont les interactions électrostatiques possibles avec les polysaccharides sont plus limitées en raison de la plus petite taille des peptides. De plus, dans cette étude, la stabilisation des protéines n'était pas affectée par la pasteurisation des boissons et la matrice de fruits semblait même limiter la gélification thermique des protéines (Méric 2012).

Les ingrédients basés sur les complexes P-PS présentent donc un véritable potentiel pour moduler la stabilité et les propriétés rhéologiques et texturales d'aliments et de boissons. Dans une perspective d'applications, les protéines de lactosérum ont été choisies pour ce projet de doctorat comme ingrédient protéique en raison de leur large éventail d'utilisation dans les produits alimentaires et de leur solubilité sur une large gamme de pH. La structure de ces protéines, leurs propriétés et leur comportement en systèmes mixtes sont très bien documentés. D'un autre côté, la pectine présente naturellement dans les fruits semble être une fibre très prometteuse pour interagir avec les protéines et former des boissons fonctionnelles stables. La section suivante présente plus en détails ces deux biopolymères ainsi que leur comportement en systèmes mixtes.

1.2.4. Les systèmes mixtes protéines de lactosérum-pectine

1.2.4.1. Les protéines de lactosérum

Les protéines de lactosérum sont les protéines solubles du lait bovin. Elles sont riches en acides aminés essentiels tels que la cystéine et la lysine. Les protéines de lactosérum sont un coproduit de la fabrication fromagère et sont principalement commercialisées sous deux formes : les concentrés contenant entre 35 et 80% de protéines et les isolats en contenant plus de 90% (Smithers 2008). Les protéines de lactosérum présentent des structures secondaire, tertiaire et quaternaire bien développées, une bonne solubilité mais une faible stabilité thermique car elles sont dénaturées à partir de 75°C (Pritchard and Kailasapathy 2011). La dénaturation commence par un dépliement de la structure tridimensionnelle des protéines ($\approx 70^\circ\text{C}$) qui expose leurs groupements hydrophobes et sulfhydryles entraînant leur agrégation (De Wit 1998; Edwards et al. 2008). Les deux protéines de lactosérum principales sont la β -lactoglobuline (β -lg) (≈ 50 -60% en masse) et l' α -lactalbumine ($\approx 20\%$) (Edwards et al. 2008; Pritchard and Kailasapathy 2011).

La β -lactoglobuline (162 acides aminés, 18,3 kDa) est la plus importante des protéines du lactosérum. Il s'agit d'une protéine globulaire dont l'état d'association dépend de l'équilibre entre les interactions hydrophobes, électrostatiques et les liaisons hydrogène, elles-

mêmes influencées par le pH, la température et les conditions ioniques. Au pH physiologique ($\approx 6,8-7,0$), la β -lg est présente sous forme de dimère. Pour des valeurs de pH entre 2 et 3, sa forme monomérique est prédominante, alors que pour des valeurs intermédiaires, la β -lg est sous forme d'octamères (Gottschalk et al. 2003). Sa structure secondaire présente 15% d'hélice α et 50% de feuillets β , le reste étant une structure désordonnée. Les résidus hydrophobes de cette protéine sont enfouis au cœur de la molécule. Son point isoélectrique (pI) se situe à pH 5,35 (Edwards et al. 2008).

L' α -lactalbumine (123 acides aminés, 14 kDa) est également une protéine globulaire capable de lier du calcium et d'autres ions métalliques. Son pI est 4,80 (Edwards et al. 2008; Pritchard and Kailasapathy 2011). D'autres protéines sont également retrouvées parmi les protéines de lactosérum mais en plus faibles proportions, à savoir les immunoglobulines ($\approx 10-14\%$), l'albumine de sérum bovin ($\approx 3-7\%$) et la lactoferrine ($< 1\%$) (De Wit 1998; Edwards et al. 2008). La β -lg étant le principal constituant des protéines de lactosérum, il a été montré que c'est essentiellement elle qui intervient et régit les interactions entre les polysaccharides et les isolats de protéines de lactosérum (Weinbreck et al. 2003; Kazmierski et al. 2003).

1.2.4.2. La pectine

La pectine est un constituant naturel des tissus végétaux qui joue un rôle important dans la structure cellulaire et le développement des plantes (Brejnholt 2010; Pérez and Mazeau 2005). La pectine commerciale provient principalement des écorces de citron ou des résidus de la fabrication du jus de pommes. Elle est principalement obtenue par extraction en milieu aqueux acide suivie d'une précipitation dans un solvant organique (éthanol, méthanol ou isopropanol) (Brejnholt 2010). La pectine est très utilisée en tant qu'agent gélifiant, épaississant et stabilisant dans les confitures, les produits laitiers, les boissons, les confiseries et d'autres produits divers comme les sauces et les tartinades.

Les molécules de pectine sont des polysaccharides hétérogènes constitués majoritairement d'acide galacturonique ($\approx 60-80\%$) et dont le poids moléculaire moyen varie généralement entre 100 et 200 kDa. Deux principaux domaines composent la pectine (**Figure 1-4**) : les chaînes homogalacturonanes ou « zones lisses », et les chaînes rhamnogalacturonanes ou « zones hérissées » (Mohnen 2008; Brejnholt 2010; Willats et al. 2001).

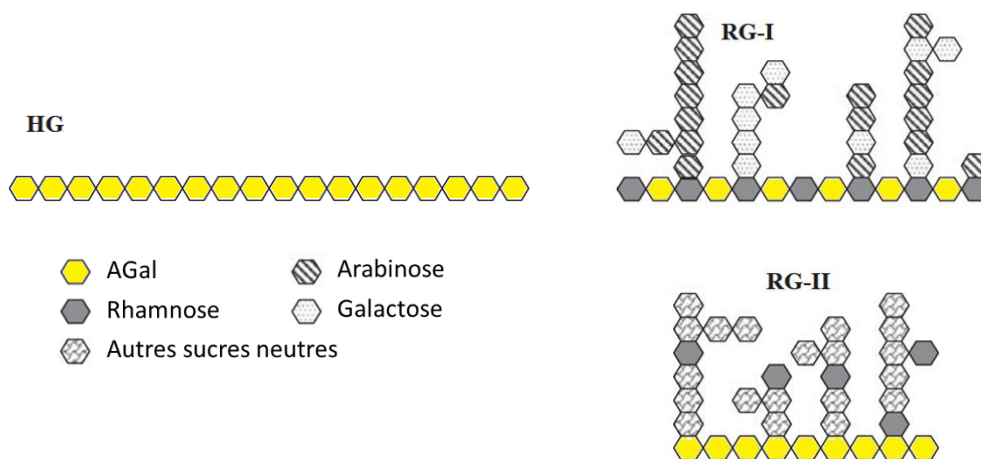


Figure 1-4. Illustration simplifiée des trois principaux domaines des molécules de pectine

(adaptée de Brejnholt (2010))

HG : homogalacturonane ; *RG-I* : rhamnogalacturonane I ; *RG-II* : rhamnogalacturonane II

Les homogalacturonanes sont des enchaînements linéaires composés d'une centaine de molécules d'acide D-galacturonique reliées en $\alpha(1\rightarrow4)$. Ces chaînes représentent environ 60 à 70% de la pectine. Les rhamnogalacturonanes sont des parties ramifiées de la pectine, composées de sucres neutres, notamment le rhamnose, le galactose et l'arabinose. Il existe deux types de rhamnogalacturonanes (I et II) qui se distinguent par leur mode de ramification.

Les groupements carboxyliques (-COOH) des acides galacturoniques des chaînes homogalacturonanes peuvent être méthyl-estérifiés (-COOCH₃) en position C-6 (**Figure 1-5**).

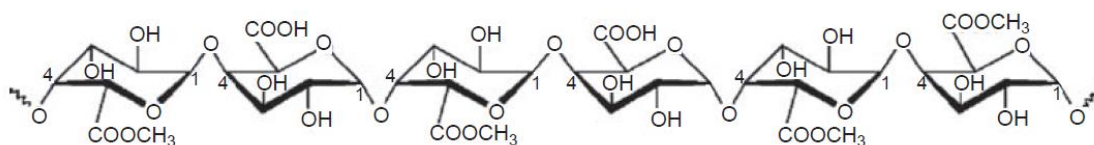


Figure 1-5. Section d'une chaîne de $\alpha(1\rightarrow4)$ -D-galacturonane partiellement méthylée en position C-6

(Brejnholt 2010)

Cette particularité est à l'origine d'une caractéristique fondamentale de la pectine : son degré de méthylation (DM). Le DM de la pectine correspond au pourcentage d'acides galacturoniques méthylés par rapport au nombre total d'unités d'acides galacturoniques. La pectine ayant un DM de plus de 50% est dite « hautement méthylée » (HM), tandis que

celle avec un DM inférieur à 50% est dite « faiblement méthylée » (LM). Le DM de la pectine varie selon l'espèce et la variété du végétal d'origine, son développement et sa maturité, ainsi que lors du stockage et des traitements de transformation post-récolte, et ce par réactions enzymatiques et/ou non enzymatiques (Sila et al. 2009b) (section 1.3.4). Le DM dicte les propriétés fonctionnelles de la pectine, notamment son mode de gélification, et définit sa densité de charges globale. Un faible DM correspond à une pectine ayant une haute densité de charges, portées par ses groupements carboxyliques non méthylés. En solution aqueuse, la pectine se comporte comme un acide faible dont le pKa s'étend de 2,9 à 3,3, proche du pKa de l'acide galacturonique qui est de 3,5 (Brehholt 2010). Dans la très grande majorité des végétaux et des aliments, le pH est supérieur au pKa de la pectine qui est alors chargée négativement (-COO⁻). La pectine est donc un biopolymère dit « anionique » qui peut interagir électrostatiquement avec d'autres polymères chargés, en particulier les protéines.

1.2.4.3. Les interactions protéines de lactosérum-pectine

Ces dernières années, les systèmes mixtes protéines de lactosérum-pectine ont fait l'objet de nombreuses études fondamentales permettant de mieux comprendre et caractériser les paramètres influençant la formation de complexes et leurs propriétés. Les complexes entre la β -lg et les pectines LM et HM sont formés principalement par interactions électrostatiques. Des liaisons hydrogène sont également impliquées mais dans une importance moindre (Girard et al. 2002). Les complexes se forment à des valeurs de pH inférieures ou égales à 6. Par exemple, en présence de β -lg uniquement, le pH_c (pH de l'apparition de complexes solubles) a été observé à pH 6,0-6,4 et 5,0-5,5 avec la pectine LM et HM respectivement (Girard et al. 2002; Girard et al. 2004). Bien que ces valeurs soient supérieures au pI de la β -lg, la complexation est possible grâce à la présence de domaines chargés positivement à la surface de la β -lg (Girard et al. 2004). En présence d'isolat de protéines de lactosérum (IPL), le pH_c a été observé à pH 5,0, indépendamment du degré de méthylation de la pectine (Salminen and Weiss 2014). Les interactions entre les protéines et la pectine deviennent de plus en plus nombreuses avec la diminution du pH du système qui s'accompagne de l'augmentation de la charge positive des protéines. Jones et al. (2009) ont retenu que des valeurs de pH entre 4,5 et 5,5 conviennent bien pour la formation de complexes entre la β -lg et la pectine de betterave. Toutefois, les complexes formés à pH 4,5 étaient plus larges ($\approx 10 \mu\text{m}$) que ceux obtenus à pH 5,5 ($\approx 200 \text{ nm}$) (Jones et al. 2009). La **figure 1-6** récapitule schématiquement l'ensemble de ces

résultats dans le but de donner un aperçu de l'importance du pH dans la formation de complexes protéines de lactosérum-pectine.

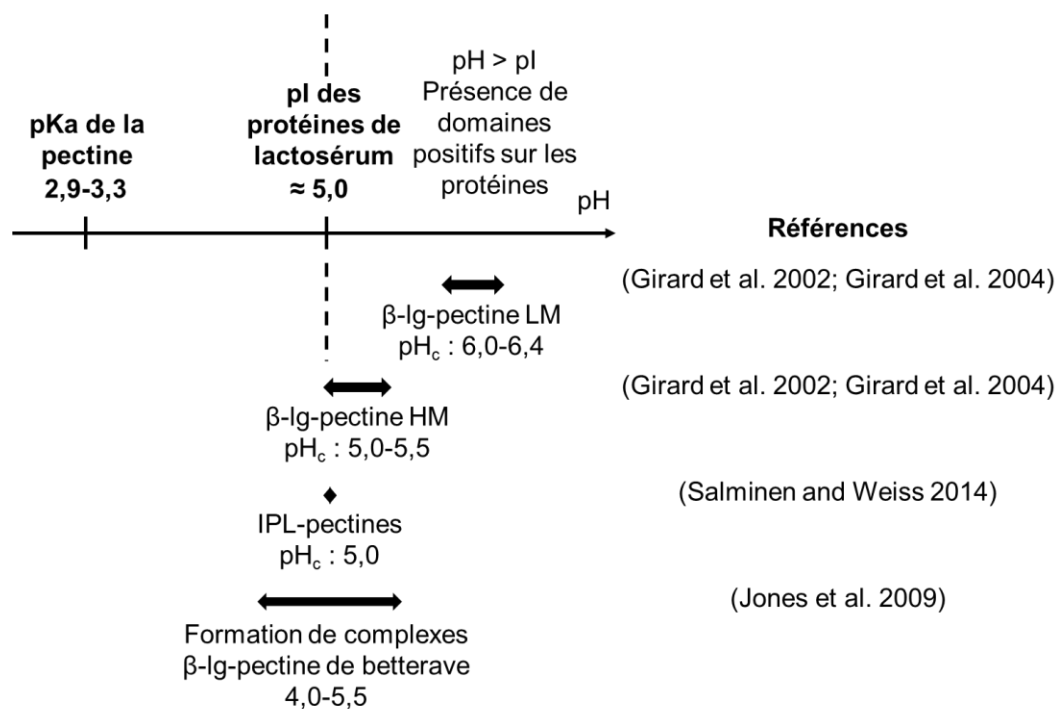


Figure 1-6. Importance du pH dans la formation des complexes protéines de lactosérum-pectine

Le ratio massique protéine:pectine optimal pour maximiser la formation de complexes dépend du pH du système, de la force ionique et du DM de la pectine, mais se situe généralement entre 5:1 et 2:1 (Bédié et al. 2008; Jones et al. 2009; Jones et al. 2010b; Girard et al. 2002; Girard et al. 2004). Le degré de méthylation (DM) de la pectine joue un rôle important dans le comportement des systèmes mixtes. La β -Ig se complexe davantage avec la pectine LM qui présente plus de groupements carboxyliques chargés que la pectine HM (Girard et al. 2002; Jones et al. 2010b). À pH 4, environ 13 et 23 molécules de β -Ig sont complexées avec une molécule de pectine HM et LM respectivement (Girard et al. 2003). Pour des pH inférieurs au pI de la β -Ig et pour des forces ioniques < 0,5 M, la pectine LM forme des complexes insolubles avec la β -Ig, tandis qu'une dispersion stable et homogène est observée avec la pectine HM (Wang and Qvist 2000). Des résultats similaires quant à la meilleure stabilité colloïdale de la pectine HM ont également été observés par Jones et al. (2010b). Cependant, les complexes avec la pectine HM sont plus sensibles à l'effet du « *salting-out* » des protéines entraînant la précipitation des protéines (Wang and Qvist 2000). En effet, ces auteurs ont montré que

cette précipitation apparaît en présence de forces ioniques plus faibles comparativement aux complexes avec la pectine LM. Enfin, la densité de charges locale de la pectine, identifiée par la distribution des groupes carboxyliques le long de la chaîne, influence aussi les interactions avec les protéines. Un arrangement par blocs de ces groupes, contrairement à une distribution aléatoire, présente une haute densité de charges locale. Il a été trouvé que, parmi plusieurs pectines HM ayant le même DM, celles ayant la plus haute densité de charges locale interagissaient davantage avec la β -lg (Kazmierski et al. 2003) et étaient capables de former des complexes sous une plus haute force ionique (98 mM vs. 56 mM) (Sperber et al. 2009).

La structure de la pectine, plus précisément sa densité de charges, le ratio protéine:pectine, la force ionique et le pH font varier le comportement des systèmes mixtes protéines de lactosérum-pectine. En effet, ces paramètres influencent fortement la formation, la morphologie et la stabilité des complexes. Toutefois, les systèmes mixtes étudiés sont des milieux aqueux très dilués, avec bien souvent moins de 1% de biopolymères. Ils sont donc très éloignés et peu représentatifs des conditions hétérogènes et complexes rencontrées dans les matrices alimentaires et lors des procédés de transformation des aliments (ex : pH, force ionique, température, cisaillement). De plus, dans les systèmes mixtes étudiés, les biopolymères sont toujours des molécules isolées et purifiées. Or, les aliments sont constitués d'une grande diversité de composés pouvant s'influencer les uns les autres. Pour l'industrie alimentaire, ces molécules purifiées sont considérées comme des additifs alimentaires, généralement peu appréciés des consommateurs. La partie suivante de ce chapitre met en lumière le potentiel des fruits comme source naturelle de fibres et de pectine.

1.3. Les fibres des fruits comme source intéressante de pectine

Les aliments naturels, peu transformés et sans additifs sont désirés par les consommateurs d'aujourd'hui. En parallèle, ces derniers cherchent à manger davantage de fruits. En 2013, plus d'un tiers (36%) des nouveaux aliments/boissons les mieux vendus aux États-Unis portaient une allégation proclamant la présence de fruits et/ou de bénéfices santé dus aux fruits (Sloan 2015). Les fruits sont des sources naturelles de fibres de plus en plus valorisées : ils apparaissent donc comme des ingrédients intéressants et pertinents à incorporer dans les formulations de nouveaux produits alimentaires afin d'augmenter leur teneur en fibres.

1.3.1. La composition générale des fruits

Les fruits sont une matrice riche et complexe qui contient une grande variété de constituants, dont une haute teneur en eau et en sucres (**Figure 1-7**). Les glucides sont les principaux composants, représentant plus de 90% de la matière sèche du fruit (Lozano 2006). Ils comprennent des sucres simples, dont les principaux sont le glucose, le fructose et le sucrose, des polysaccharides de réserve (amidon) et plusieurs polysaccharides de structure retrouvés au niveau de la paroi cellulaire et qui constituent les fibres alimentaires.

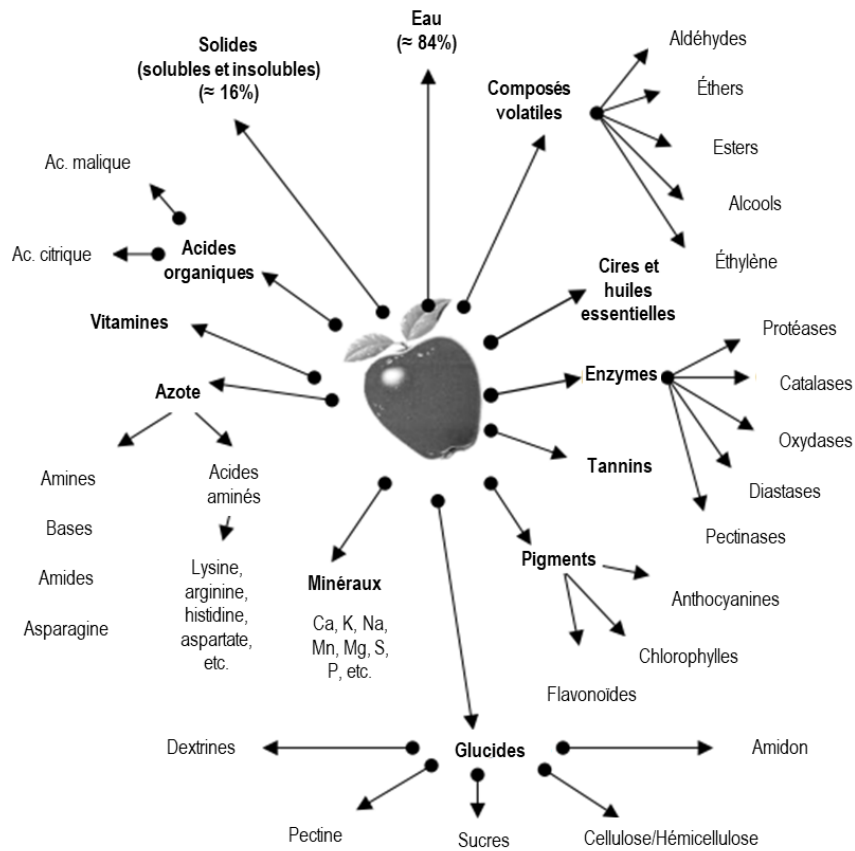


Figure 1-7. Principaux composants des fruits
(adaptée de Lozano (2006))

1.3.2. Les polysaccharides de la paroi cellulaire végétale

Les fibres alimentaires sont les polysaccharides de la paroi cellulaire végétale. Celle-ci est composée d'une paroi primaire, d'une lamelle moyenne, d'eau et de solutés et parfois d'une paroi secondaire constituée essentiellement de lignine (O'Neill and York 2003). La lamelle médiane, située entre les parois des cellules adjacentes, est essentiellement composée de molécules de pectine, souvent rattachées entre elles par des ponts

calciques. La paroi primaire est organisée en feuillets de microfibrilles de cellulose enchâssées dans une matrice complexe de pectines, d'hémicelluloses et de glycoprotéines (**Figure 1-8**) (Pérez and Mazeau 2005). Cette structure confère à la paroi primaire une résistance élastique lors de la turgescence et qui lui permet d'absorber les chocs, les compressions et autres stress physiques. De la lignine, des esters phénoliques, des enzymes, des minéraux et divers oligosaccharides sont également présents en faibles quantités dans la paroi (< 10% du poids sec de la paroi) (O'Neill and York 2003).

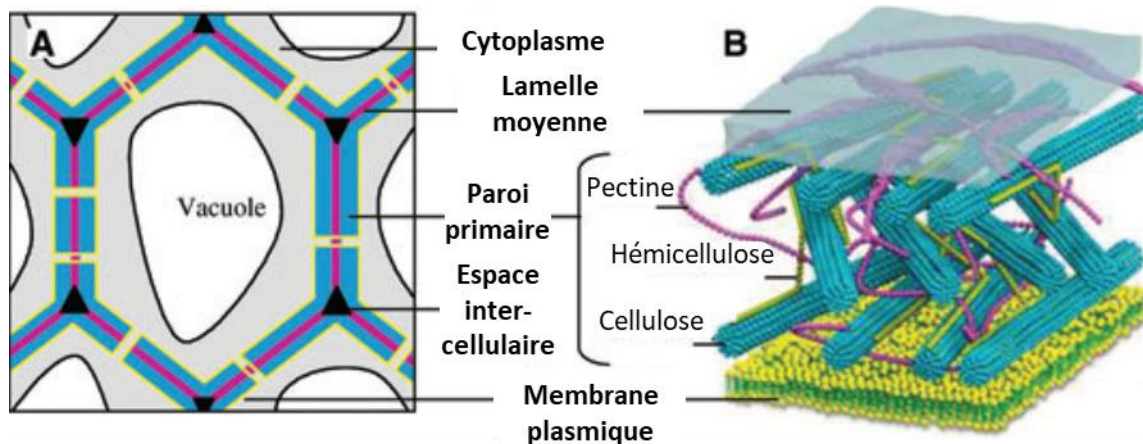


Figure 1-8. Représentation schématique d'une cellule végétale (A) et de sa paroi cellulaire (B)

(adaptée de Van Buggenhout et al. (2009))

La **figure 1-9** présente plus en détail l'enchevêtrement des différents polysaccharides. Les microfibrilles de cellulose (20-30%) sont des faisceaux de longs polymères linéaires de glucose associés par des liaisons glycosidiques $\beta(1\rightarrow4)$ (Pérez and Mazeau 2005). Les molécules d'hémicellulose (20%), constituées d'une grande variété de polysaccharides ramifiés, en particulier les xyloglucanes et les xylanes, sont liées par des liaisons hydrogène aux microfibrilles de cellulose. La pectine constitue le principal composé de la paroi cellulaire, en particulier dans les fruits et légumes (environ 35%). Les molécules de pectine interagissent entre elles et avec les autres composants de la paroi cellulaire, en particulier la cellulose, en formant de nombreux liens transversaux *via* des liaisons covalentes et non covalentes telles que les liaisons ioniques, les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes (Sila et al. 2009b). Outre sa fonction de structure et son rôle dans le développement de la plante, la pectine est responsable de la capacité d'échange d'ions de la paroi et du contrôle de l'environnement ionique et du pH de l'intérieur de la cellule (Pérez and Mazeau 2005).

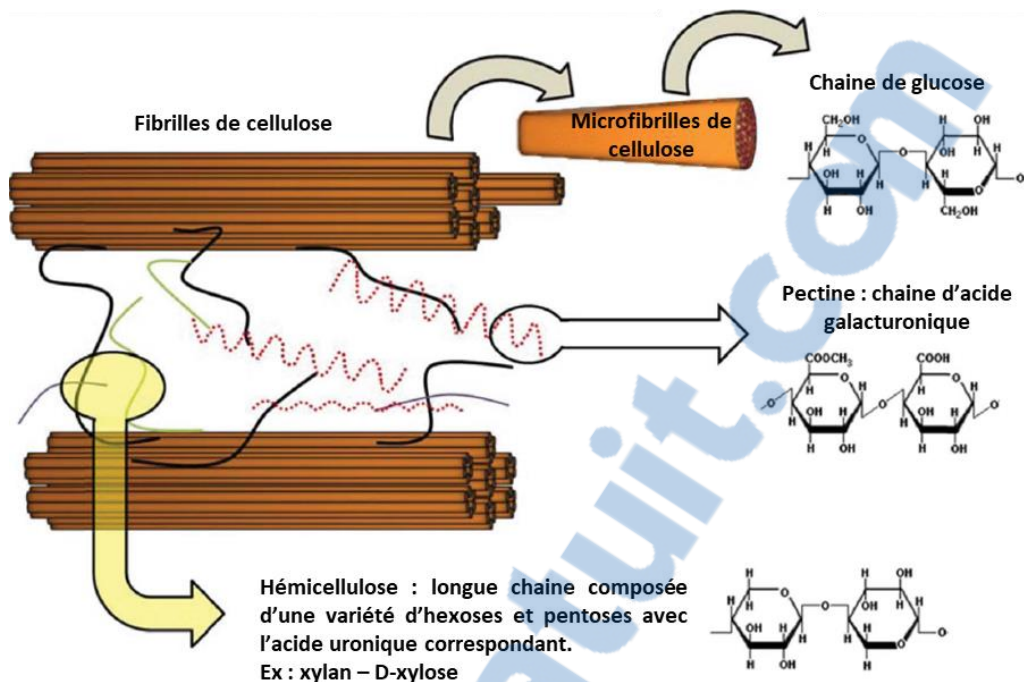


Figure 1-9. Réseau des polysaccharides de la paroi cellulaire végétale
(adaptée de Padayachee et al. (2015))

1.3.3. Le potentiel nutritionnel et fonctionnel des fibres de fruits

Les fibres de fruits présentent plusieurs avantages. Tout d'abord, comparativement aux céréales qui contiennent principalement des fibres insolubles (cellulose et hémicellulose), leur meilleur équilibre entre les fibres solubles et insolubles convient bien pour la production d'aliments enrichis en fibres car il procure une meilleure fonctionnalité et valeur nutritionnelle (Grigelmo-Miguel and Martín-Belloso 1999; Sun-Waterhouse et al. 2010b). De plus, les fibres des fruits sont associées à d'autres substances intéressantes présentes dans les fruits comme des pigments, des composés antioxydants, des vitamines et des minéraux (**Figure 1-7**) (Ayala-Zavala et al. 2011; Lozano 2006). Enfin, l'aspect naturel des fibres de fruits les favorise auprès des consommateurs qui craignent le potentiel toxique de composés synthétiques (Ayala-Zavala et al. 2011; Sun-Waterhouse 2011). Ces dernières années, les fibres de fruits sont de plus en plus étudiées et valorisées, en particulier celles issues des coproduits obtenus à partir de la transformation des fruits, comme par exemple lors la fabrication de jus (Ayala-Zavala et al. 2011; O'Shea et al. 2012; Schieber et al. 2001). Sun-Waterhouse et al. (2010b) ont réussi à confectionner des barres avec des fibres de pommes qui contenaient au moins 4,5 g de fibres totales par portion et dont la texture n'était pas affectée par rapport aux barres sans fibres. Ces

barres avaient une meilleure consistance et étaient plus faciles à mouler que les barres non enrichies. Plus récemment, Marques et al. (2014) ont formulé des barres de céréales contenant environ 45% de fibres totales, grâce à l'utilisation de farine de résidus d'acérola. Bien qu'une augmentation de leur résistance au cisaillement et de leur fermeté ait été observée, ces barres ont été de manière générale acceptées par le panel de dégustation. Les fibres des fruits s'avèrent donc être une bonne source d'enrichissement en fibres et leur application dans les aliments peut être menée avec succès.

1.3.4. L'effet des procédés de transformation alimentaire sur la pectine des fruits

Dans le contexte de ce projet visant la formation de complexes P-PS, la pectine est la fibre ciblée pour interagir avec des protéines. En effet, contrairement aux autres polysaccharides de la paroi cellulaire, la pectine est la seule fibre composée de molécules glucidiques porteuses de charges (groupements carboxyliques des acides galacturoniques). La pectine est également la fibre dont la structure est la plus affectée par les procédés de transformation alimentaire. La **figure 1-10** schématise les principales réactions expliquées ci-après.

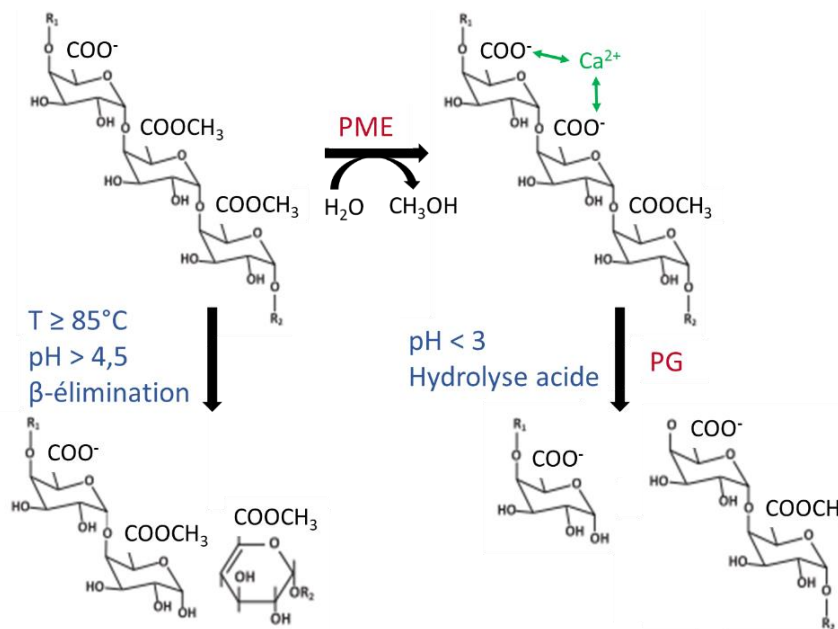


Figure 1-10. Représentation schématique des principales réactions enzymatiques et non-enzymatiques de la pectine
(adaptée de Sila et al. (2009b))

PME : pectine méthyl-estérase ; *PG* : polygalacturonase ; *T* : température ; *R₁* et *R₂* : fragment initial et terminal de la chaîne de pectine (homogalacturonane) ; *Ca²⁺* : interactions ioniques avec les ions calcium

1.3.4.1. Les réactions non-enzymatiques

De nombreux procédés de transformation requièrent des étapes de traitements thermiques pour blanchir, pasteuriser, ou encore stériliser les produits. Ces procédés servent généralement à assurer l'innocuité des aliments mais peuvent dégrader les fibres, plus précisément la pectine. Les deux principales réactions de dégradation de la pectine sont la β -élimination et l'hydrolyse acide. Ces réactions dépolymérisant la pectine sont dépendantes du pH de la plante et sont favorisées par l'augmentation de température (Diaz et al. 2007; Fraeye et al. 2007a; Krall and McFeeters 1998). Elles deviennent considérables pour des températures supérieures à 85°C et contribuent à la solubilisation de la pectine, menant à une perte de texture ou de viscosité selon le type de produits alimentaires (De Roeck et al. 2008; Sila et al. 2009a; Van Buggenhout et al. 2009). Il a été montré que la cuisson prolongée (85°C, 15 min) de pommes pour la fabrication de compote entraîne une augmentation de la teneur en fibres solubles, résultant de la dépolymérisation et de la solubilisation de la pectine (Colin-Henrion et al. 2009). Des résultats similaires ont été observés sur des suspensions de fibres de pommes et de carottes exposées à différents traitements de chaleur (Bengtsson et al. 2011). Néanmoins, la sensibilité à la chaleur diffère selon la maturité des fruits à la récolte et la structure initiale de la pectine (Colin-Henrion et al. 2009). De plus, les réactions de dépolymérisation de la pectine s'effectuent davantage sur la pectine hautement méthylée (Diaz et al. 2007; Fraeye et al. 2007a). Par ailleurs, l'élévation de la température peut également catalyser la dé-méthylation chimique de la pectine, notamment en milieu neutre ou alcalin (Krall and McFeeters 1998; Sila et al. 2009b).

1.3.4.2. Les réactions enzymatiques

La pectine peut aussi être affectée par des réactions enzymatiques. En effet, les tissus végétaux contiennent naturellement des enzymes qui modifient la structure des fibres au cours de la croissance des fruits. Les principales enzymes sont des pectinases. La pectine méthyl-estérase (PME) hydrolyse les groupements méthylés des acides galacturoniques, ce qui diminue le degré de méthylation de la pectine. Contrairement à une hydrolyse chimique, la dé-méthylation enzymatique de la pectine se fait par blocs, créant de longues séquences d'acides galacturoniques non méthylés (Christiaens et al. 2014). Ainsi, cette dé-méthylation augmente la densité de charges locale de la pectine, ce qui favorise les interactions avec les ions calcium présents dans les tissus végétaux (Lutz et al. 2009b; Ralet et al. 2001) et également avec la β -lg (Kazmierski et al. 2003). La polygalacturonase

(PG) dépolymérise la pectine en coupant les liaisons glycosidiques entre les molécules d'acides galacturoniques. Cette enzyme agit surtout sur la pectine faiblement méthylée (Duvetter et al. 2009). La pectate lyase et la pectine lyase dépolymérisent également les chaînes linéaires d'acides galacturoniques *via* le mécanisme de β -élimination. Cependant, ces enzymes sont surtout rencontrées dans les micro-organismes et sont moins fréquentes dans les plantes (Christiaens et al. 2014). Enfin, la β -galactosidase et la α -arabinofuranosidase hydrolysent les résidus de galactose et d'arabinose terminaux respectivement. Ces deux enzymes « débranchantes » sont toutefois très sensibles à la chaleur et leur activité est significativement réduite dès 45-50°C (Houben et al. 2013), des températures largement dépassées dans les procédés courants de transformation des aliments.

Bien que toutes ces enzymes soient surtout actives pendant le développement de la plante jusqu'à l'atteinte de sa maturité, les traitements thermiques utilisés dans la transformation industrielle des fruits peuvent modifier leur activité. Généralement, les hautes températures appliquées lors des traitements de pasteurisation ou de stérilisation inhibent ces enzymes (Christiaens et al. 2014). Toutefois, certains traitements peuvent modifier intelligemment la structure de la pectine et par conséquent ses propriétés fonctionnelles, grâce à l'activation judicieuse de certaines enzymes (Christiaens et al. 2014). Plusieurs études sur les légumes, tels la carotte (Ng and Waldron 1997; Ni et al. 2005; Sila et al. 2006a; Sila et al. 2006b; Sila et al. 2005; Smout et al. 2005; Stanley et al. 1995), le brocoli (Christiaens et al. 2012a; Christiaens et al. 2011; Ni et al. 2005), le chou (Ni et al. 2005) et les pois (Stanley et al. 1995), ont montré qu'un blanchiment à basse température permet de préserver la texture des légumes. En effet, ce type de traitement thermique consiste à immerger les légumes dans de l'eau (directement ou à travers un contenant) maintenue entre 50 et 70°C. Ces températures correspondent aux températures optimales de l'activité de la PME (Duvetter et al. 2009). Les nouveaux groupements carboxyliques dé-méthylés de la pectine peuvent alors facilement interagir avec les ions calcium des tissus végétaux, augmentant ainsi l'adhésion des cellules et la fermeté des légumes. De plus, cela diminue la dépolymérisation (β -élimination) et la solubilisation de la pectine, ce qui limite le ramollissement des tissus engendrés par les procédés thermiques ultérieurs, tels que la pasteurisation ou stérilisation.

La solubilité de la pectine et sa structure, notamment son degré de méthylation, sont deux paramètres pouvant être modifiés par réactions enzymatiques et/ou non-enzymatiques. La

deuxième partie de ce chapitre a mis en évidence que ce degré joue un rôle important dans les possibilités d'interactions entre la pectine et les protéines. La solubilité de la pectine peut probablement aussi affecter la disponibilité de pectine envers les protéines. Le choix du traitement thermique des fruits est donc crucial dans une optique de développement de produits alimentaires fonctionnels à l'aide des interactions protéine-pectine. De plus, une bonne caractérisation de ces deux paramètres est fondamentale.

1.3.5. Techniques de caractérisation de la pectine des fruits

1.3.5.1. Les teneurs en fibres et en pectine

La méthode officielle pour mesurer les fibres alimentaires totales, solubles et insolubles est celle de l'*Official Analytical Chemists International* (AOAC, méthode 991.43) (Lee et al. 1992). Cette méthode enzymatique-gravimétrique repose sur la définition conservatrice des fibres alimentaires en tant que glucides non digestibles. Elle permet de déterminer les quantités de fibres solubles et insolubles mais ne permet pas d'obtenir de détails sur la quantité de pectine. Une autre manière d'estimer la quantité de fibres totales consiste à les extraire des fruits par précipitation à l'éthanol (Selvedran and Ryden 1990). En effet, les polysaccharides de la paroi cellulaire sont insolubles dans l'alcool, contrairement aux autres composés des fruits tels que les sucres, les polyphénols, et les acides organiques. Un résidu dit « insoluble dans l'alcool » (AIR : *alcohol-insoluble residue*) est alors obtenu. En réalité, sa quantité donne une surestimation de la quantité de fibres qui ne représentent qu'environ 90% du matériel extrait. En effet, de la lignine, des esters phénoliques (1-2%), des protéines (5-10%) et des minéraux sont co-précipités avec les fibres (Renard 2005; O'Neill and York 2003; Nunan et al. 1998). Cette extraction à l'éthanol simple et rapide est très fréquemment retrouvée dans la littérature pour isoler le matériel de la paroi cellulaire de fruits ou de légumes en préservant l'intégrité et la structure de ses composés. Pour mesurer la teneur en pectine totale, il suffit alors d'hydrolyser ce résidu (AIR) en présence d'acide sulfurique concentré (Ahmed and Labavitch 1978) puis de déterminer la teneur en acide galacturonique par colorimétrie à l'aide de *m*-hydroxydiphényle (3-phénylphénol) (Blumenkrantz and Asboe-Hansen 1973; Filisetti-Cozzi and Carpita 1991).

1.3.5.2. Fractionnement de la pectine

L'AIR est une matrice intéressante car elle permet de caractériser la pectine qu'elle contient. En effet, Selvedran and Ryden (1990) ont mis au point une séquence

d'extractions successives permettant d'isoler des fractions riches en pectine selon la solubilité de celle-ci et sa distribution au sein de la paroi cellulaire. En effet, la pectine est majoritairement retrouvée sous trois formes :

- la pectine soluble (dans l'eau) qui est faiblement liée aux polysaccharides de la paroi cellulaire (*WSP : water-soluble pectin*) ;
- la pectine chélatée avec les ions calcium présents naturellement dans les tissus végétaux sous différents teneurs dépendamment de la nature de la plante (*CSP : chelator-soluble pectin*) ;
- la pectine fortement liée et enchevêtrée avec les polysaccharides de la paroi cellulaire (*NSP : sodium-soluble pectin*).

Les deux dernières fractions correspondent à la pectine insoluble.

Bien que chaque laboratoire effectue sa propre procédure en adaptant la température, les temps d'extraction, les quantités de solvant, le pH et/ou la force ionique, le principe du fractionnement reste le même. Brièvement, cela consiste à mélanger successivement l'AIR dans différentes solutions aqueuses pendant plusieurs heures. Les parties solubles (après filtration ou centrifugation) sont récupérées, dialysées et lyophilisées. Elles correspondent aux trois fractions de pectine présentées ci-dessus. La **figure 1-11** schématise le protocole utilisé dans cette thèse.

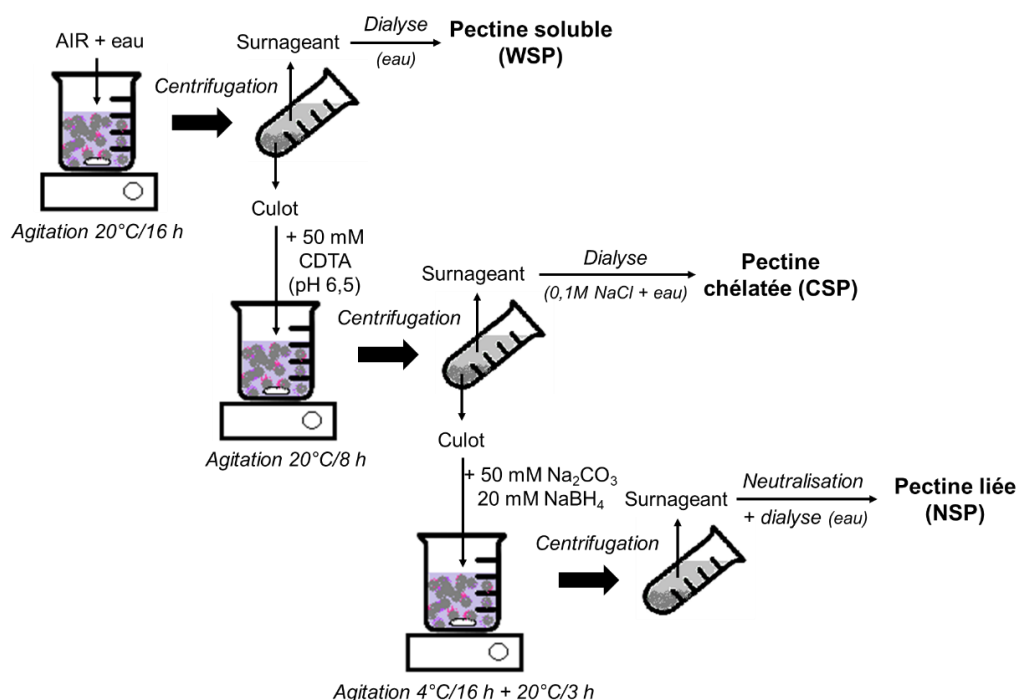


Figure 1-11. Schéma du fractionnement de la pectine
(protocole adapté de Selvedran and Ryden (1990) et Vicente et al. (2007))

À partir de chaque fraction lyophilisée, la teneur en pectine est estimée à partir de la quantité d'acide galacturonique, déterminée par hydrolyse et colorimétrie comme décrit avec l'AIR.

1.3.5.3. Détermination du degré de méthylation

Le degré de méthylation (DM) est une caractéristique incontournable de la pectine. Non seulement il dicte les propriétés fonctionnelles de la pectine, mais il définit sa densité de charges globale, un paramètre important dans les interactions avec les protéines. Le degré de méthylation est exprimé en pourcentage du ratio suivant :

$$DM (\%) = \frac{\text{nombre de moles de méthanol}}{\text{nombre de moles d'acide galacturonique anhydre}} \times 100$$

$$= \frac{176}{32} \times \frac{\text{teneur en méthanol (\% p/p)}}{\text{teneur en acide galacturonique anhydre (\% p/p)}} \times 100$$

où 176 et 32 sont les poids moléculaires respectifs de l'acide galacturonique anhydre et du méthanol. Depuis les années 1960, beaucoup de scientifiques ont développé et adapté des techniques pour mesurer le DM de la pectine, chacune ayant des avantages et des limites à prendre en considération lors du choix d'une méthode particulière. Les niveaux de précision et de sensibilité recherchés, la reproductibilité et répétabilité, le temps alloué pour la mise au point de la méthode et sa réalisation ainsi que le type de matrice initiale de l'échantillon sont des critères importants également, sans oublier les contraintes de prix et les appareils et les ressources (techniques et humaines) disponibles. Dans notre cas, la teneur en acide galacturonique est déterminée par colorimétrie, comme expliqué dans la section précédente. Il faut donc ensuite quantifier séparément la teneur en méthanol. La méthode par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) à espace de tête proposée à l'origine par Savary and Nuñez (2003) est une méthode récente, simple, rapide, reproductible, sensible, spécifique et efficace, et qui a été adaptée avec des pectines de fruits non purifiées (Kosmala et al. 2010; Kosmala et al. 2009; Kosmala et al. 2013; Renard and Ginies 2009). Cette méthode consiste à dé-méthyliser par saponification alcaline un échantillon de pectine dont la teneur en acide galacturonique est connue (ex : AIR ou une fraction riche en pectine) (**Figure 1-12**). Cette étape se fait dans un vial fermé spécial.

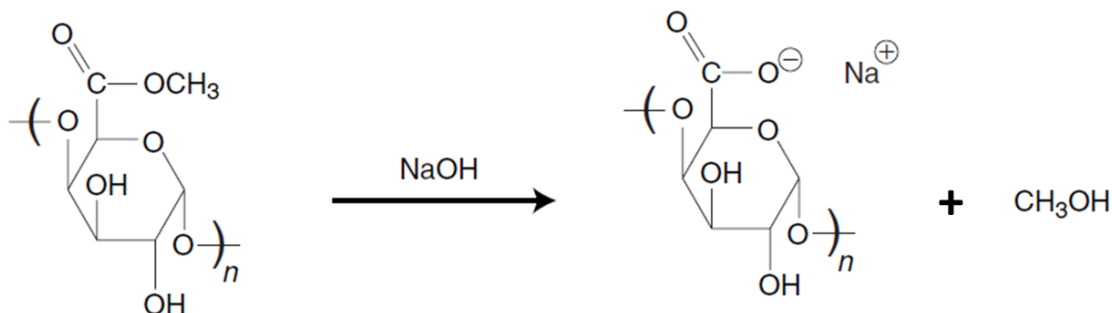


Figure 1-12. Saponification alcaline de la pectine (acide galacturonique) et libération du méthanol

(adaptée de Melton and Smith (2001b))

Le méthanol libéré est ensuite vaporisé par chauffage de ce vial puis injecté dans le chromatographe. À l'aide d'un standard interne et d'une gamme de calibration de méthanol, et par sélection des ions appropriés par le spectromètre de masse, il est alors possible de déterminer la quantité précise de méthanol. Après avoir mis au point cette méthode dans notre laboratoire, c'est ainsi que le degré de méthylation de la pectine contenue dans l'AIR et dans les différentes fractions de pectine a été mesuré. Notons toutefois qu'il n'est pas possible d'analyser ce degré pour la fraction de pectine fortement liée (NSP) puisque son extraction se fait en conditions alcalines, ce qui dé-méthyle la pectine.

Les fruits constituent une source de fibres et de pectine intéressante nutritionnellement et technologiquement. Ils offrent l'opportunité de moduler la structure et la solubilité de leur pectine, ce qui peut être un atout dans l'optique d'améliorer les interactions protéine-pectine. Parmi les fruits disponibles au Canada, le bleuet a été choisi pour ce projet pour plusieurs raisons décrites dans la partie suivante.

1.4. Le potentiel du bleuet comme source de fibres et de pectine

Le bleuet est un fruit très populaire en Amérique du Nord où sa production et sa consommation ne cessent de croître. Cette petite baie bleue est une source de fibres et de pectine naturelle qui est pertinente à exploiter.

1.4.1. Présentation générale du bleuet

Le bleuet appartient à la famille des Ericaceae, au genre *Vaccinium* et sous genre *Cyanococcus*. Le genre *Vaccinium* comprend d'autres nombreuses baies dont les canneberges (*Oxycoccus*) et les myrtilles (*Myrtillus*) (Retamales and Hancock 2012). Le

bleuet pousse sur des sols acides et humides et tolère bien les hivers froids (Retamales and Hancock 2012), typiques du climat canadien. Il existe trois espèces prédominantes de bleuets : le bleuet en corymbe (*V. corymbosum* L.), le bleuet nain (*V. angustifolium* L.) et le bleuet rabbiteye (*V. ashei* L.). Les deux premières sont les plus répandues au Canada (AAC 2010) (**Figure 1-13**).



Figure 1-13. Photographies des deux grandes espèces de bleuets au Canada

À gauche : *Bleuets en corymbe* (cultivés) (photo tirée de <http://www.agr.gc.ca>)

À droite : *Bleuets nains* (sauvages) (photo tirée de <http://bleuets-mistassini.com>)

Les bleuets en corymbe (*highbush blueberry*) sont des bleuets cultivés qui mesurent 3 à 20 mm de diamètre selon la variété. Ils se développent par petites grappes sur de larges buissons. Il existe de nombreux cultivars de bleuets en corymbe, dont le "Patriot" qui est le plus produit au Québec (AAC 2012). Les bleuets nains (*lowbush blueberry*) ou « bleuets sauvages », principalement produits dans l'Est de l'Amérique du Nord, sont appelés ainsi en raison de leur plus petite taille (2 à 12 mm de diamètre). Contrairement aux bleuets cultivés, ils ne sont pas plantés ; les producteurs gèrent des peuplements sauvages qui se propagent naturellement grâce à des rhizomes souterrains. Ils sont plus périssables et conviennent moins bien à l'expédition vers les marchés de détail sous forme fraîche (AAC 2010). La grande majorité des bleuets en corymbe produits au Canada est cultivée en Colombie-Britannique, alors que les bleuets sauvages sont retrouvés davantage dans l'Est du Canada, en particulier au Québec (MAPAQ 2011). Originaires d'Amérique du Nord, les bleuets sont désormais produits dans le monde entier (Retamales and Hancock 2012; MAPAQ 2016).

1.4.2. La production et la consommation du bleuets

Le bleuets connaît une production et une consommation croissantes mondiales depuis 20 ans. Le Canada est le deuxième producteur mondial de bleuets après les États-Unis (MAPAQ 2016). Sous toutes ses formes, le bleuets constitue de loin l'industrie fruitière la plus importante au Canada. En 2015, la production de bleuets (sauvages et en corymbe) représentait 60% de la superficie de l'ensemble des fruits cultivés au Canada et 29% de la valeur générée par le marché des fruits. C'est également le fruit générant la plus grande valeur et le plus gros volume des exportations de fruits frais au Canada (AAC 2016b). Le Québec est la province du Canada produisant le plus de bleuets (sauvages et en corymbe) (AAC 2012).

La popularité des bleuets a connu une forte croissance expliquée par une sensibilisation grandissante à l'égard des bienfaits pour la santé associés à leur consommation (AAC 2010; MAPAQ 2016). En effet, les bleuets sont connus pour leur haute teneur en polyphénols et leurs propriétés antioxydantes (Routray and Orsat 2011). De nombreuses études ont montré que ces composés, notamment les anthocyanes, présentent également des propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes et contribuent à préserver la santé cardiovasculaire, à réduire les dommages cellulaires pouvant mener à un cancer, ainsi qu'à ralentir le processus de vieillissement et l'affaiblissement des fonctions cognitives (AAC 2010; Kalt 2016; Ohr 2015a; Routray and Orsat 2011; Szajdek and Borowska 2008; Paredes-López et al. 2010). Ces petits fruits sont vus par les consommateurs comme un ingrédient naturel à valeur ajoutée, en lien avec la santé cardiovasculaire, la prévention de cancers, l'amélioration de la vue et de la mémoire et ayant des propriétés anti-vieillessement (Ohr 2015b; Payne 2010). Les consommateurs sont prêts à payer plus cher pour avoir des produits contenant de réels bleuets (Payne 2010). L'importance de la santé et le besoin de produits pratiques ont favorisé la demande des consommateurs pour utiliser les bleuets sous formes diverses et variées : frais, congelés, séchés, en purée, en poudre. Ils sont retrouvés dans des pâtisseries, des gâteaux, des barres, des céréales pour petit-déjeuner, des yogourts, des crèmes glacées, des gaufres, des smoothies, etc. (Ohr 2014). En 2014, les Canadiens ont consommé 3 kg de bleuets frais et transformés par personne, ce qui représente une croissance de 78% par rapport à 2010, majoritairement due à la progression de la consommation des bleuets congelés (MAPAQ 2016).

1.4.3. La composition en fibres du bleuet

Le bleuet est une petite baie acide (pH \approx 3,3-3,5 (Gündüz et al. 2015)) qui se compose en moyenne de 84% d'eau, 14,5% de glucides, 0,7% de protéines, 0,3% de lipides, 2,4% de fibres alimentaires, 10% de sucres totaux notamment du glucose et du fructose, ainsi qu'une teneur relativement élevée en vitamine C (10 mg/100 g) (USDA 2017). Il contient aussi des sels minéraux avec une forte teneur en potassium (77 mg/100 g) mais une faible teneur en calcium (0-6 mg/100 g) et magnésium (4-6 mg/100 g) (De Souza et al. 2014; USDA 2017). Le bleuet est particulièrement riche en composés phénoliques (environ 200-400 mg/100 g) (Moyer et al. 2002; Prior et al. 1998; Gündüz et al. 2015). Ces composés à la capacité antioxydante très élevée ont fait la renommée mondiale du bleuet et seront davantage décrits dans la section suivante (1.4.4). La très grande majorité des études sur le bleuet s'intéressent à ses composés phénoliques et à leurs propriétés antioxydantes. En revanche, les recherches sur la caractérisation des fibres alimentaires du bleuet et sa pectine sont très rares. Pourtant, le bleuet fait partie des fruits communs ayant une relativement haute teneur en fibres, comme le montre le **tableau 1-2**.

Tableau 1-2. Teneurs en fibres totales de fruits communs (USDA 2017)

Fruits (crus)	Teneur en fibres totales (g/100g de fruit)
Bleuet	2,4
Pomme	1,9 (avec pelure) - 1,3 (sans pelure)
Poire	3,0 (sans pelure)
Fraise	2,2
Framboise	6,5
Banane	1,7
Citron	4,7 (avec pelure) 2,8 (sans pelure)
Orange	4,5 (avec pelure) - (sans pelure non fourni)
Raisins	1,2
Pêche	1,9
Abricot	2,0
Cerise	2,1

Le **tableau 1-3** regroupe les travaux effectués sur les fibres du bleuet trouvés dans la littérature.

Tableau 1-3. Caractérisation des fibres du bleuet

Variétés de bleuet	Teneur en fibres totales (g/100 g de fruit)	AIR (g/100 g de fruit)	Teneur en pectine* (g/100 g de fruit)	Autres fibres (g/100 g de fruit)	Références
Bleuets en corymbe du Brésil	1,9	-	-	-	(De Souza et al. 2014)
Bleuets en corymbe : cultivar "Duke"	-	2,5 ^a	0,8 ^b	-	(Vicente et al. 2007)
Bleuets rabbiteye des États-Unis : "Climax", "Premier" et "Tifblue"	3,55 ^c	-	0,537	Hémicellulose : 0,87 ^d Cellulose : 1,04 ^d Lignine : 1,10 ^d	(Silva et al. 2005)
Bleuets en corymbe des États-Unis : "Bluecrop" et "Jersey"	1,98 ^c	-	0,511	Hémicellulose : 0,24 ^d Cellulose : 0,51 ^d Lignine : 0,72 ^d	
Bleuets nains des États-Unis	3,67-5,04 ^e	-	0,27-0,54 ^e	-	(Chen and Camire 1997)
Bleuets en corymbe des États-Unis : "Bluetta"	-	1,5-2 ^a	0,5-0,7 ^a	-	(Proctor and Peng 1989)

AIR : *alcohol-insoluble residue* = résidu solide insoluble dans l'alcool

* estimée en tant qu'acide galacturonique

^a Valeurs correspondant à la maturité optimale des fruits pour la récolte

^b Valeur estimée par rapport à la quantité dans l'AIR

^c Somme des teneurs en pectine, hémicellulose, cellulose, lignine

^d Valeurs moyennes des cultivars, rapportées en g/100 g de fruit

^e Variabilité due à la préparation de la purée et à la méthode d'extraction

Le contenu en fibres du bleuet varie selon les variétés de bleuets mais aussi selon les différents cultivars (Silva et al. 2005). Cette variabilité entre les cultivars a aussi été soulignée pour d'autres fruits comme par exemple la datte (Mrabet et al. 2012) et la grenade (Hasnaoui et al. 2014). Par ailleurs, la composition et la teneur en fibres peuvent varier selon les différents tissus d'un même fruit. En général, la peau des fruits a une teneur en fibres plus élevée que la pulpe (Gorinstein et al. 2001a; Gorinstein et al. 2001b). De plus, pour la myrtille et le cassis, la peau et la pulpe contiennent une plus grande quantité de pectine comparativement aux pépins qui semblent contenir davantage d'hémicellulose et de cellulose (Hilz et al. 2005). Dans le cas du raisin, les tissus de la peau sont la source majeure de pectine, par rapport à la pulpe, mais la pectine est plus fermement liée à la matrice de la paroi cellulaire de la peau que celle de la pulpe (Vidal et

al. 2001). Ces résultats peuvent être expliqués par des différences dans le volume cellulaire ou dans l'épaisseur de la paroi cellulaire de la peau et de la pulpe (Vidal et al. 2001). L'avantage du bleuets par rapport à certains fruits comme par exemple l'orange, la banane ou la pomme, est qu'il se consomme dans son intégralité (peau, pulpe, et pépins), maximisant la teneur en fibres et en pectine.

La grande disponibilité du bleuets au Canada et au Québec, sa popularité auprès des consommateurs, la reconnaissance de ses bienfaits pour la santé, sa versatilité d'utilisation, son goût et sa couleur, font du bleuets une source de fibres de choix à valoriser qui suscite un grand intérêt auprès des industriels pour l'incorporer dans leurs produits. Les teneurs en fibres totales et en pectine du bleuets sont relativement connues, mais elles présentent des différences selon les variétés et les cultivars de bleuets. De plus, les quantités de fibres solubles et insolubles du bleuets n'ont pas été clairement déterminées, or ce sont leurs proportions qui régissent les propriétés fonctionnelles des fibres. Aussi, le degré de méthylation de la pectine du bleuets a très peu été considéré. Chen and Camire (1997) ont montré qu'il variait de 66 à 77% pour le bleuets nain alors que Lin et al. (2016) ont trouvé des valeurs inférieures à 50% sur des fractions de pectines extraites de bleuets en corymbe. Dans le cadre de ce doctorat, les bleuets en corymbe (cultivés) seront à l'étude, permettant ainsi de travailler avec plusieurs cultivars produits au Québec et d'exploiter leur potentiel de valorisation. La détermination de la composition en fibres solubles et insolubles de différents cultivars de bleuets apparaît nécessaire afin d'évaluer le potentiel du bleuets comme source de fibres. En outre, la caractérisation de la pectine est primordiale puisque cette fibre intervient dans les interactions avec les protéines, l'élément clé de ce projet.

1.4.4. L'importance des composés phénoliques du bleuets

Au-delà des interactions entre les protéines et la pectine, les composés phénoliques présents dans le bleuets peuvent aussi interagir avec ces deux types de molécules.

1.4.4.1. La composition des composés phénoliques du bleuets

Les composés phénoliques font partie des métabolites secondaires jouant un rôle protecteur important dans la croissance et la reproduction des plantes. Ils sont caractérisés par une structure composée d'au moins un cycle aromatique hydrocarboné possédant un ou plusieurs groupes hydroxyles. Le terme « polyphénols » est généralement employé pour parler des composés phénoliques d'une plante qui possèdent

plus d'un groupe hydroxyle (Padayachee et al. 2015; Balasundram et al. 2006). Les polyphénols sont divisés en plusieurs groupes selon leur structure chimique, allant du simple acide phénolique (ex : acide caféique, férulique, etc.) jusqu'aux tannins hautement polymérisés. La **figure 1-14** présente les principales classes de polyphénols retrouvées dans les baies. Les flavonoïdes constituent le plus important groupe de polyphénols et comprennent les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavanones, les anthocyanines (anthocyanidines glycosylées) et les flavanols (Ozidal et al. 2013; Balasundram et al. 2006). Les tannins constituent un autre groupe important des polyphénols. Les tannins hydrolysables sont des polymères d'acide gallique associé à un noyau glycosidique tandis que les tannins non-hydrolysables, dits « tannins condensés », sont des oligomères et polymères de flavan-3-ols à haut poids moléculaire, appelés également les proanthocyanidines (Balasundram et al. 2006; Gu et al. 2004).

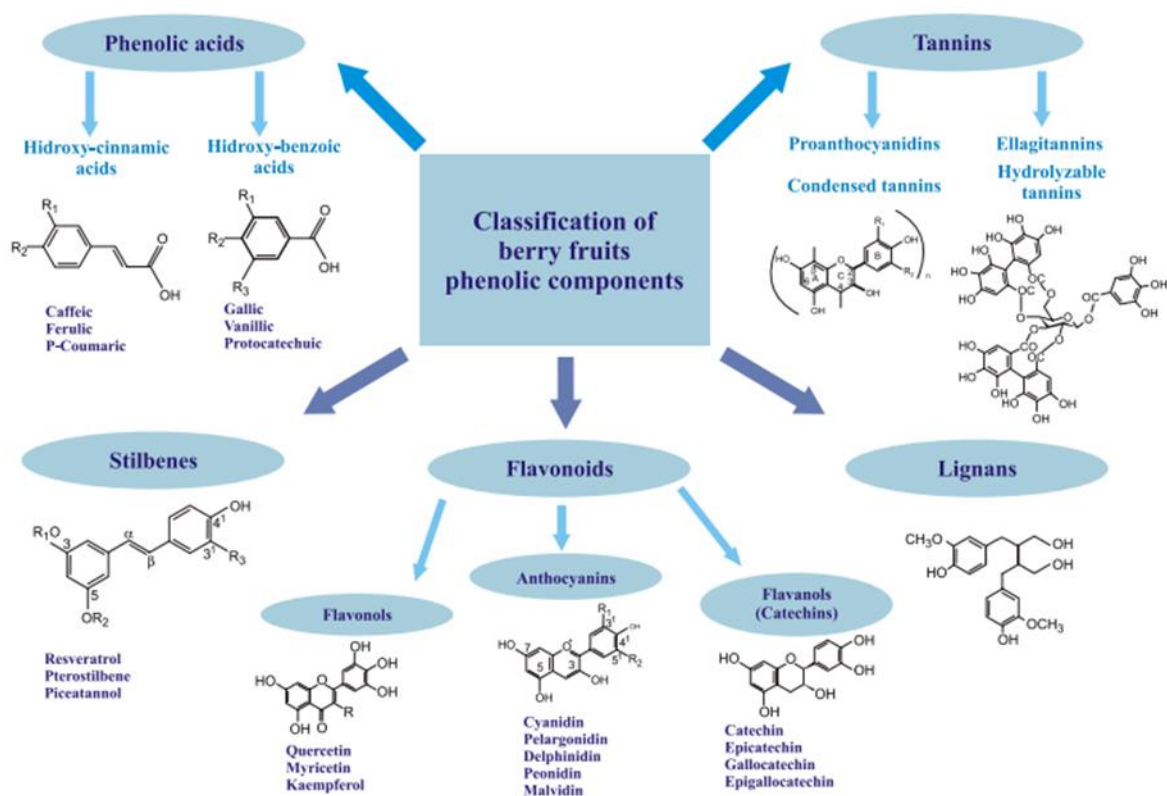


Figure 1-14. Classification des principales classes de polyphénols des baies, selon leurs structures chimiques
(tirée de Paredes-López et al. (2010))

Le bleuet est l'un des fruits les plus riches en polyphénols (Balasundram et al. 2006) dont les anthocyanines, caractéristiques de la coloration bleue, et les proanthocyanidines sont

les plus importants (Rodriguez-Mateos et al. 2012). Ces dernières molécules sont étroitement liées à la pectine et aux protéines pariétales (Saura-Calixto 2012). Bien que le contenu en polyphénols varie en fonction des cultivars et du mode d'extraction, le **tableau 1-4** donne un ordre de grandeur des teneurs des principaux polyphénols du bleuet en corymbe (résultats moyennés par étude).

Tableau 1-4. Teneurs en polyphénols dans le bleuet en corymbe (non-exhaustives)

Composés phénoliques totaux (mg/100 g)	Anthocyanines (mg/100 g)	Proanthocyanidines (mg/100 g)	Références
-	163	182	(USDA 2017)
-	-	180	(Gu et al. 2004)
400	84	-	(Sellappan et al. 2002)
260	129	-	(Prior et al. 1998)
305	30	-	(De Souza et al. 2014)
235	170	-	(You et al. 2011)
444	208	-	(Moyer et al. 2002)
177	92	-	(Kalt et al. 2001)

Bien que certains polyphénols soient liés aux polysaccharides de la paroi cellulaire, les composés phénoliques sont principalement retrouvés dans la vacuole de la cellule végétale. Durant certains procédés de transformation des aliments, comme par exemple la confection d'une purée, les tissus végétaux sont broyés et les composés phénoliques se retrouvent en présence d'autres molécules extracellulaires avec lesquelles ils peuvent alors interagir (Le Bourvellec et al. 2009; Padayachee et al. 2015).

1.4.4.2. Les interactions protéine-polysaccharide-polyphénol

Les polyphénols peuvent se lier avec les protéines et les polysaccharides et former des complexes solubles ou insolubles, causant notamment l'apparition de troubles dans les jus et vins et la sensation d'astringence (Le Bourvellec and Renard 2012; Siebert 1999). Les proanthocyanidines sont le type de polyphénols le plus impliqué dans ces interactions (Naczka et al. 2006; Renard et al. 2001). Que ce soit avec les protéines ou les polysaccharides, les interactions avec les polyphénols sont majoritairement des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes (Le Bourvellec et al. 2004; Le Bourvellec and Renard 2012; Renard et al. 2001; Renard et al. 2017; Siebert 1999). Des liaisons ioniques peuvent avoir lieu avec certains acides aminés, si bien que la formation de complexes

protéine-polyphénol dépend du pH : les protéines globulaires ayant un point isoélectrique (pI) acide, comme l'albumine de sérum bovin (BSA), précipitent davantage avec les polyphénols à un pH proche ou légèrement inférieur à leur pI (Hagerman and Butler 1981; Naczki et al. 1996). Il a été montré que les interactions polysaccharide-proanthocyanidine ne sont pas dépendantes du pH (Le Bourvellec et al. 2004; Renard et al. 2001). Toutefois, le pH a une action sur l'ionisation des groupements hydroxyles et peut influencer sur la capacité des proanthocyanidines à former des liaisons hydrogène avec les polysaccharides (Hanlin et al. 2010). Par ailleurs, Lin et al. (2016) ont montré récemment que les liaisons entre de la pectine et des anthocyanines de bleuet étaient plus fortes à pH 2,0-3,6 qu'à pH 4,5. Ces liaisons étaient attribuées notamment à des interactions ioniques entre les groupements carboxyliques de la pectine et la forme cationique flavylium des anthocyanines qui est plus majoritaire à faible pH (Lin et al. 2016).

Tout comme les interactions protéine-polysaccharide, les interactions avec les polyphénols dépendent non seulement du pH mais aussi de la force ionique et de la température. L'élévation de la température diminue les liaisons avec les polysaccharides en affaiblissant les liaisons hydrogène (Le Bourvellec et al. 2004). Avec les protéines, elle peut augmenter ou diminuer les interactions selon la température appliquée et la nature des systèmes (Ozdamar et al. 2013). En effet, le type de protéines, de polysaccharides et de polyphénols, leur conformation, leur structure, leur poids moléculaire et leur concentration affectent également l'affinité entre ces macromolécules et leur complexation (Le Bourvellec and Renard 2012; Ozdamar et al. 2013; Siebert 1999; Renard et al. 2017). Par exemple, les protéines riches en proline et ayant une structure flexible et ouverte, comme la gélatine, présentent plus d'affinité avec les polyphénols (Hagerman and Butler 1981; Naczki et al. 1996). En effet, ce type de protéines favorise la formation de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes avec les polyphénols. Parmi les fibres de la paroi cellulaire, la pectine (>> xyloglucane > cellulose) possède une plus forte affinité avec les proanthocyanidines notamment grâce à sa capacité à pouvoir former un réseau gélifié encapsulant les proanthocyanidines (Le Bourvellec et al. 2005). De plus, il a été montré que diminuer le poids moléculaire réduit la stabilité des complexes polyphénol-pectine (Ben-Shalom et al. 1984). De même, les proanthocyanidines ayant un plus haut poids moléculaire interagissent davantage avec les polysaccharides et les protéines puisque le nombre de sites potentiels pouvant former des liaisons hydrogène est plus important (Le Bourvellec and Renard 2012; 2005). D'autre part, le ratio polyphénol:protéine joue un rôle important dans la solubilité des complexes (Le Bourvellec and Renard 2012) : à des ratios

élevés, les polyphénols liés aux protéines servent de ligands entre les protéines seules ou déjà liées, créant de larges agrégats intermoléculaires insolubles. En revanche, à faibles ratios, plusieurs molécules de polyphénols peuvent se lier sur une même molécule de protéine, formant des complexes solubles.

Enfin, plusieurs auteurs ont mis en lumière la possibilité d'interactions triples menant à des complexes ternaires protéine-polysaccharide-polyphénol pouvant réduire la précipitation des protéines avec les polyphénols (Bordenave et al. 2013; De Freitas et al. 2003; Thongkaew et al. 2014). Les possibilités d'interactions au sein de la matrice complexe qu'est le bleuet sont donc nombreuses. Toutefois, c'est cette complexité qui fait la richesse et la pertinence de ce petit fruit, dans un contexte où les ingrédients naturels et bons pour la santé sont très prisés. Ce projet de doctorat constitue une première exploration de l'enrichissement en protéines de cette matrice, de sa fonctionnalité et de son utilisation dans la formulation d'aliments modèles.

1.5. Problématique, hypothèse, but et objectifs de recherche

1.5.1. Problématique

La revue de littérature a mis en évidence que la conception d'aliments fonctionnels enrichis en protéines et en fibres est un véritable défi technologique concernant en particulier leur stabilité et leur texture. Il a été montré que, en systèmes mixtes, les complexes entre les protéines et certaines fibres, en particulier la pectine, peuvent générer des propriétés fonctionnelles différentes de celles obtenues individuellement. Toutefois, les fibres qui sont utilisées dans ces systèmes mixtes jouent plutôt un rôle fonctionnel et technologique, et n'atteignent pas des quantités suffisantes pour parler d'enrichissement en fibres. De plus, les systèmes mixtes sont étudiés dans des conditions très éloignées des matrices alimentaires et sont principalement liquides ou semi-liquides. L'utilisation de tels systèmes dans des aliments solides tels que les barres de collation n'a pas encore été explorée. Comment l'incorporation de complexes pourrait-elle modifier les propriétés texturales et rhéologiques d'aliments et de boissons modèles, tout en les enrichissant à la fois en fibres et en protéines ? Enfin, le bleuet est une source naturelle de fibres et de pectine dont la structure peut être modulée par des traitements thermiques. Ce petit fruit semble être une matrice pertinente au sein de laquelle l'ajout de protéines pourrait permettre la formation de complexes protéine-pectine. Ainsi, ce nouvel ingrédient naturel riche en fibres et en protéines pourrait facilement être incorporé dans la formulation d'aliments ou de boissons. Dans quelles mesures la complexation protéine-pectine pourrait-elle réduire les problèmes d'instabilité, de durcissement et de viscosité provoqués par l'enrichissement en fibres et en protéines ?

1.5.2. Hypothèse

L'hypothèse de recherche de ce projet de doctorat est la suivante :

« La formation de complexes entre des protéines de lactosérum et de la pectine de bleuets permet d'enrichir des aliments et boissons en protéines et en fibres tout en aidant à structurer et stabiliser ces matrices alimentaires et à contrôler leur texture et leur viscosité. »

1.5.3. But général

Le but de ce projet est de développer un ingrédient basé sur la formation de complexes entre des protéines de lactosérum et de la pectine naturellement présente au sein d'une

purée de bleuets afin de formuler des aliments et boissons enrichis en protéines et en fibres et d'aider à la résolution des problèmes de stabilité et de texture habituellement rencontrés.

1.5.4. Objectifs

Dans ce but et afin de répondre à l'hypothèse de recherche, trois objectifs spécifiques constituent ce projet :

Objectif 1 : Caractériser la composition en fibres et en pectine de plusieurs cultivars de bleuets et étudier l'effet de traitements thermiques sur la structure de la pectine au sein d'une purée de bleuets (chapitre 2).

Objectif 2 : Étudier la formation (ou non) de complexes entre un isolat de protéines de lactosérum et la purée de bleuets et évaluer l'impact sur la fonctionnalité (viscosité, texture et stabilité) des mixtures résultantes, seules ou incorporées dans une boisson modèle de type smoothie (chapitre 3).

Objectif 3 : Étudier l'impact des complexes protéine-pectine sur la texture de barres de collation modèles au cours du temps, en lien avec leurs propriétés d'hydratation (chapitre 4).

Ces trois objectifs correspondent aux chapitres 2, 3 et 4 de cette thèse respectivement. Ils sont traités sous forme d'articles, séparés d'une transition contextuelle aidant à la compréhension du cheminement du projet.

Chapitre 2. Application d'un blanchiment à basse température pour moduler la structure de la pectine au sein de purées de bleuets

Transition contextuelle

Le fil conducteur de ce projet reposait sur la formation et l'étude de complexes protéines-fibres, plus particulièrement protéine-pectine. L'élément-clé et inédit de ces travaux consistait à utiliser le bleuets au complet (sous forme de purée) comme source de fibres et de pectine, plutôt que de travailler avec de la pectine commerciale purifiée. Ainsi, la première phase de ce projet (objectif 1) se concentrait sur la purée de bleuets afin de mieux l'appréhender en tant que « matrice fibreuse » pour la suite des travaux.

La première étape était de caractériser la composition de plusieurs cultivars de bleuets en corymbe du Québec, avec une attention particulière posée sur leurs teneurs en fibres et en pectine. La deuxième étape était de « préparer » cette matrice afin d'améliorer son aptitude à interagir ultérieurement avec des protéines. En effet, la littérature montre que la formation de complexes protéine-pectine est, entre autres, influencée par la structure de la pectine. Plus précisément, le degré de méthylation (DM) de la pectine est important puisqu'il correspond à sa densité de charges globale. Plus la pectine a un faible DM, plus elle contient de groupements carboxyliques non-estérifiés et donc porteurs de charge, élevant sa densité de charges globale. Il a été souligné dans le chapitre 1 de cette thèse qu'une haute densité de charges globale (faible DM) privilégie les interactions avec les protéines, ce qui nous apparaît bénéfique dans l'optique de former des complexes protéine-pectine. D'autre part, la littérature montre que le DM de la pectine peut être diminué par l'activité de la pectine méthyl-estérase présente dans les fruits et légumes. Cette activité est elle-même favorisée par l'application de températures spécifiques. L'objectif présenté dans ce chapitre était d'étudier le potentiel d'un blanchiment à basse température sur des purées de bleuets comme procédé simple et efficace pour diminuer le DM de la pectine au sein des purées, et ce, dans l'optique d'améliorer l'affinité de la pectine envers les protéines.

Ce chapitre 2 fait l'objet d'un article publié en 2017 dans *Journal of Food Science* et intitulé « **Low-temperature blanching as a tool to modulate the structure of pectin in blueberry purees** ». Les auteurs sont Laura M. Chevalier, Laurie-Eve Rioux, Paul Angers et Sylvie L. Turgeon.

Résumé

La composition de six cultivars de bleuets a été caractérisée. Ils contiennent une bonne quantité de fibres alimentaires (10-20%) et de pectine (4-7%) dont le degré de méthylation (DM) est sensible aux procédés de transformation alimentaire. Un blanchiment à basse température (LTB : 60°C/1 h) a été appliqué sur des purées de bleuets pour diminuer le DM de la pectine, afin de moduler les propriétés et la fonctionnalité de la purée (ex : viscosité et stabilité) et d'améliorer l'affinité de la pectine envers les autres composés des matrices alimentaires. La teneur en fibres, la viscosité, la solubilité de la pectine, son DM et la composition en monosaccharides ont été déterminés pour les purées pasteurisées et blanchies + pasteurisées. Les résultats ont montré que ni la quantité de fibres, ni la viscosité n'étaient affectées par le blanchiment (LTB), indiquant que ce traitement n'entraînait pas de dépolymérisation et de dégradation significatives de la pectine. Le blanchiment a provoqué une diminution à la fois du DM de la pectine de 58-67% à 45-47% et de la quantité de la fraction de pectine soluble dans l'eau, cette dernière demeurant la fraction majeure de la pectine totale (52-57%). Le blanchiment à basse température (LTB) est un procédé simple et doux pour produire des purées de bleuets ayant de la pectine majoritairement soluble et faiblement méthylée, afin d'élargir la fonctionnalité et les opportunités d'interactions avec les autres ingrédients alimentaires.

Mots-clés : Bleuets ; Degré de méthylation ; Fibres ; Blanchiment à basse température ; Pectine.

Application pratique : Des produits alimentaires naturellement structurés et fonctionnels peuvent être conçus à l'aide d'un procédé thermique appliqué sur la matière végétale brute. Dans cette étude, l'application d'un blanchiment à basse température a modifié la structure de la pectine *in situ* de purées de bleuets. Ces modifications peuvent faciliter l'incorporation de la purée parmi d'autres ingrédients, afin de développer de nouveaux aliments fonctionnels.

Abstract

Blueberry composition was characterized for six cultivars. It contains a good amount of dietary fiber (10-20%) and pectin (4-7%) whose degree of methylation (DM) is sensitive to food processing. Low-temperature blanching (LTB: 60°C/1 h) was applied on blueberry purees to decrease pectin DM, in order to modulate puree properties and functionalities (i.e. viscosity and stability), and to enhance pectin affinity towards other components within food matrices. Fiber content, viscosity, pectin solubility, DM, and monosaccharide composition were determined for both pasteurized and LTB+pasteurized blueberry purees. The results showed that neither the amount of fiber, nor the viscosity were affected by LTB, indicating that this treatment did not result in any significant pectin depolymerization and degradation. LTB caused a decrease both in pectin DM from 58-67% to 45-47% and in the amount of water-soluble pectin fraction, the latter remaining the major fraction of total pectin at 52-57%. LTB is a simple and mild process to produce blueberry purees with mostly soluble and low-methylated pectin in order to extend functionality and opportunities for interactions with other food ingredients.

Keywords: Blueberry; Degree of methylation; Fiber; Low-temperature blanching; Pectin.

Practical application: Naturally structured and functional food products may be designed using a thermal process on raw plant material. In this study, the application of a low-temperature blanching modified *in situ* pectin structure in blueberry purees. These modifications may facilitate puree incorporation among other ingredients, in order to develop new functional foods.

2.1. Introduction

Native from North America, highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) is a very popular fruit in Canada, which is the world's second largest producer of blueberry, with 163,000 metric tonnes produced in 2014 (FCC 2016). Blueberry is very rich in phenolic compounds and presents a high antioxidant activity (Moyer et al. 2002), making it very appealing to health-conscious consumers. Moreover, blueberry contains a substantial amount of dietary fiber (DF > 2%) (USDA 2017). Blueberry purees are thus natural and healthy food ingredients which can be incorporated into high DF functional foods.

Fruit DF are polysaccharides from plant cell walls that consist of cellulose, hemicellulose and pectin. Pectin is a heterogeneous polysaccharide, mainly composed of galacturonic acid (GalA). Its structure and properties are affected by food processing, especially heat treatments such as pasteurization and blanching that cause partial pectin depolymerization through β -elimination and acid hydrolysis (Sila et al. 2009b; Van Buggenhout et al. 2009). Pectin depolymerization is pH- and temperature-dependent, and typically results in the softening of plant tissues and a loss in viscosity. Heat treatments also affect the pectin degree of methylation (DM) which corresponds to the percentage of GalA that is methyl-esterified at C-6. The DM is an indicator of the global charge density of pectin, and it governs its functional properties, especially its gelling mode. Charge density is a significant characteristic for interactions with other charged molecules like proteins or divalent ions, in particular calcium. Pectin DM varies depending on its source (plant type and species), as well as during ripening, post-harvest storage and processing (Sila et al. 2009b). Upon plant growth, the DM decreases as a result of pectin methyl-esterase (PME) activity, an endogenous enzyme naturally found in plant tissues, that hydrolyzes methyl ester groups on GalA. PME activity is temperature-dependent: a rise in temperature increases PME activity, resulting in lower DM. PME activity is optimal between 50-70°C and is inhibited at higher temperatures (Duvetter et al. 2009). Several works performed on vegetables and reviewed by Christiaens et al. (2014) have shown that a low-temperature blanching (LTB), typically 10-60 min at 50-70°C, is an efficient treatment to reduce tissue softening during subsequent high thermal processing. Indeed, such a blanching enhances endogenous PME activity, resulting in pectin de-methylation. The free carboxylic groups on GalA thus produced, indeed promote pectin ability to interact with divalent ions like calcium, resulting in lower pectin solubility and increased intercellular adhesion. Pectin seems to behave differently between fruits and vegetables, as well as the fruit type. Bengtsson et al. (2011) applied a LTB on apple suspensions and observed a decrease of the soluble pectin

content. However, neither the pectin chemical structure nor the DM were characterized. After an exogenous PME addition to strawberry samples, Fraeye et al. (2009) reported a drop in DM without any loss of pectin solubility. Besides, Fraeye et al. (2007b) obtained a very different DM after a prolonged enzymatic de-methylation depending on fruit type: DM of apple pectin was reduced from a value of 79% to 7%, whereas that of strawberry pectin reached 32%, from an initial value of 94%.

Heat processes are a relatively simple method to optimize pectin structure and properties, especially its solubility. To our best knowledge, the effect of heat treatments on blueberry fiber composition and pectin structure has never been reported. The objective of this work was to use heat treatments currently applied in the food industry to modulate blueberry pectin structure. We hypothesized that a LTB could activate PME activity and thus decrease the pectin DM. For this purpose, composition of different blueberry cultivars was characterized, and the impact of both heat treatments on fiber content and viscosity of blueberry purees, as well as on pectin solubility and structure, was investigated.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Chemicals

MeOH (certified ACS, Fisher Chemical, Fair Lawn, NJ, USA), 3-phenylphenol (Sigma-Aldrich Inc., Milwaukee, WI), Na₂CO₃ (Fisher Science Education, Rochester, NY, USA), NaBH₄ (Fluka, St-Louis, MO), CDTA (*trans*-1,2-diaminocyclohexane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid monohydrate, Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA), potassium acetate (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ), and deuterated MeOH (d₃-MeOH, CDN Isotopes, Pointe-Claire, QC, Canada) were acquired.

2.2.2. Plant material

Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) were obtained from Agridor (Beaumont, QC, Canada). Six cultivars ("Blueray", "Duke", "Northland", "Patriot", "Polaris", and "Reka") were harvested at their physiological maturity (July/August 2014), frozen at -18°C, vacuum-packed, and stored at -30°C until analysis (April 2015). After the characterization of these six cultivars, two were selected, Patriot (Pa) and Polaris (Po), to study the effects of heat treatments. They were harvested from the same location (July/August 2015), frozen at -30°C, vacuum-packed, and stored at -30°C until being pureed and heat treated (September/October 2015).

2.2.3. Characterization of purees from six blueberry cultivars

2.2.3.1. Composition and physicochemical characterization

Blueberries (200 g) from each cultivar were thawed at 4°C overnight then mixed for 1 min using a kitchen blender (Magic Bullet, Homeland Housewares, Los Angeles, CA) to obtain homogeneous purees. The pH (Symphony SB20 pH-meter, VWR, Radnor, PA) and the moisture content (72°C for 24 h) were determined (Silva et al. 2005). Titratable acidity (TA) (method 942.15), soluble solids (SS) (932.12), ash (525°C overnight, 940.26), protein (Kjeldahl, conversion factor of 6.25), lipid (Soxhlet extraction for 8 h, 945.16), and dietary fiber (991.43) analyses were made according to AOAC official methods (AOAC 2012). The ratio SS/TA was calculated as an indicator of overall sweetness (Retamales and Hancock 2012). Dietary fiber content was analyzed using a commercial assay kit (K-TDFR kit, Megazyme International, Bray, Co. Wicklow, Ireland). Briefly, samples were enzymatically digested to remove starch and proteins. Then, insoluble dietary fiber (IDF) and soluble fiber (SDF) were obtained after filtration, and after precipitation with EtOH, respectively. Proteins (Kjeldahl) and ashes (500°C for 5 h) were subtracted from each residue to obtain the final IDF or SDF quantities. Total dietary fiber (TDF) was the sum of IDF and SDF. All analyses were conducted at least in duplicate.

2.2.3.2. Extraction of alcohol-insoluble residue (AIR)

Cell wall material was isolated as AIR as described by Deng et al. (2014), with slight modifications. Blueberry puree (25 g) was stirred in 95% EtOH (150 mL) to extract low molecular weight solutes, and boiled under reflux with continuous stirring for 30 min to inactivate endogenous enzymes. The suspension was cooled to 23°C then filtered (GF/D, Whatman, Buckinghamshire, UK). The residue was sequentially washed with 85% EtOH (3 x 150 mL), chloroform/MeOH (1:1 v/v; 3 x 250 mL), and acetone (3 x 250 mL), yielding the crude cell wall extract (AIR). AIR was dried overnight at 37°C in an air oven, weighed and expressed as g per 100 g of dry weight of fruit. AIR was ground in liquid nitrogen using a mortar and pestle and stored at -18°C until analysis.

2.2.3.3. Pectin content

The pectin content in AIR was estimated as galacturonic acid content (GalA), the main constituent of pectin, according to Melton and Smith (2001a). AIR was hydrolyzed in duplicate in concentrated sulfuric acid, followed by a colorimetric assay with 3-

phenylphenol reagent, in order to reduce interferences from neutral sugars. Absorbance was measured at 525 nm against a standard curve of galacturonic acid (75-180 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.2.3.4. Degree of methylation

The degree of methylation (DM) of pectin was calculated for each AIR sample as the molar ratio of methanol (MeOH) to GalA. MeOH was determined after saponification using headspace gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) based on the method described by Kosmala et al. (2010). Samples (10 mg, in triplicate) were suspended in deionized water (0.5 mL) and saponified with NaOH (0.5 M; 1 mL) for at least 1 h at 23°C. $\text{d}_3\text{-MeOH}$ (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$; 1 mL) was used as internal standard. A calibration curve was prepared with 0.5 mL of deionized water, 1 mL of MeOH (0.5-10 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) and 1 mL of $\text{d}_3\text{-MeOH}$ (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Analysis was performed by GC-MS (Hewlett-Packard model 6890 Series II gas chromatograph attached to an Agilent model 5973N selective quadrupole mass detector; Palo Alto, CA) under an ionization voltage of 70 eV at 230°C, and equipped with an Agilent ChemStation software. Samples contained in sealed vials were heat treated (70°C for 15 min) in order to vaporize the MeOH released after saponification treatment of pectin. The headspace vapors (1 mL) were then injected, in split mode (2:1), using a headspace system (Agilent Technologies, model G1888 network headspace sampler), at 250°C. GLC separation was performed on a DB-wax capillary column (Agilent Technologies, 60 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) with a specific temperature program (40°C for 8 min then to 250°C at 30°C $\cdot\text{min}^{-1}$). Helium was used as the carrier gas under constant flow (1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$). Data were collected using selected ions (m/z 29; 30; 31; 33; 35). The plot of the peak area ratio (normal to deuterated forms) for ion pairs (m/z 31/35 $_d$) over a range of concentration ratios (MeOH/ $\text{d}_3\text{-MeOH}$) allowed determination of MeOH concentrations in the samples. The ion at m/z 35 $_d$ is the molecular ion for $\text{d}_3\text{-MeOH}$. The ion at m/z 31 was selected for MeOH instead of the molecular ion at m/z 32 in order to distinguish it from the molecular ion of ambient dioxygen.

2.2.4. Heat treatments and analysis

A schematic overview of the experimental setup is given in **Figure 2-1**.

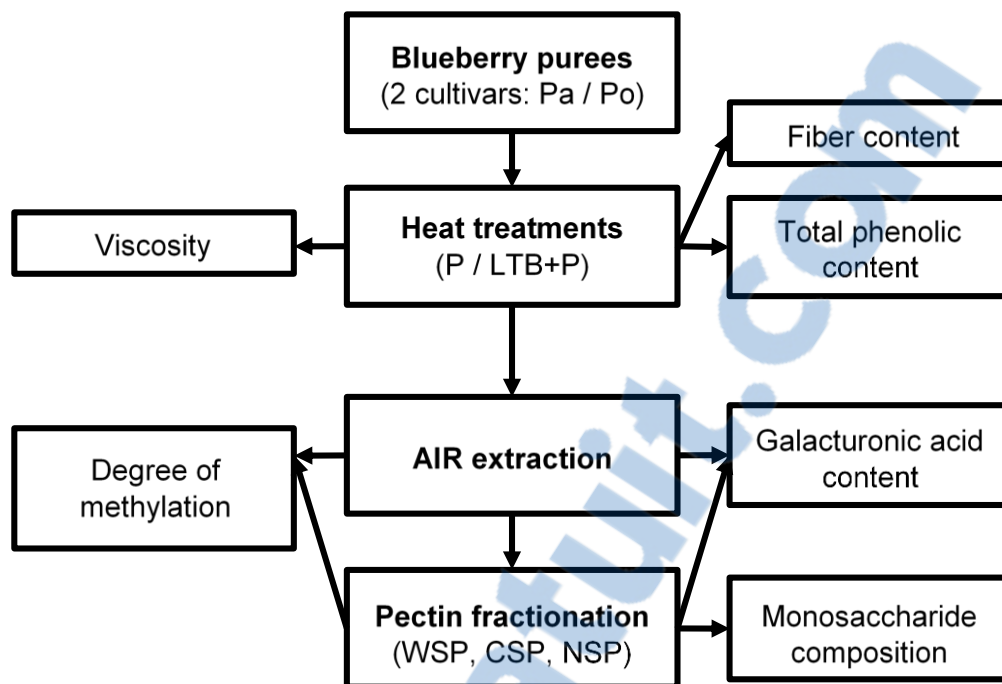


Figure 2-1. Schematic overview of the experimental setup

Pa: Patriot; Po: Polaris; P: 90-95°C/5 min; LTB+P: 60°C/1 h + 90-95°C/5 min; AIR: alcohol-insoluble residue; WSP: water-soluble pectin; CSP: chelator-soluble pectin; NSP: sodium carbonate-soluble pectin.

2.2.4.1. Heat treatments

Patriot and Polaris blueberry cultivars were thawed (4°C overnight) then homogeneous purees were obtained as described previously (section 2.2.3.1), except that they were mixed for 2 min. For each of the following two treatments, puree samples (320 g) were heated in semi-sealed erlenmeyer flasks (500 mL) in which the temperature was monitored by inserting a thermocouple (VWR, Radnor, PA). The first treatment (P) corresponded to a pasteurization to inactivate endogenous enzymes (90-95°C for 5 min). Pasteurized samples were used as reference. The second treatment corresponded to a low-temperature blanching followed by a pasteurization (LTB+P): samples were maintained at 60°C for 1 h in order to favor PME activity and then pasteurized to stop it (90-95°C for 5 min). All puree samples were stirred during treatment, then cooled to 20°C in ice bath. The analyses described in sections 2.2.4.2 to 2.2.4.7 were performed.

2.2.4.2. Fiber characterization

Fibers were characterized as total, insoluble, and soluble fiber, as described in section **2.2.3.1**, except that the time-consuming filtration, performed after enzymatic digestion, was replaced by a centrifugation (5,000 g x 15 min at 23°C). Moreover, ashes content was not measured because values previously determined were negligible or zero. AIR was extracted from each puree as described in section **2.2.3.2** with slight modifications. An aliquot of puree (100 g) was stirred in 95% EtOH (500 mL) but the suspension was not boiled because enzymes had already been inactivated by previous pasteurization treatments. After filtration, the residue was sequentially washed with 85% EtOH (4 x 250 mL) and acetone (4 x 200 mL). The step with chloroform/MeOH was not performed in order to ensure the absence of exogenous methanol in AIR, which could otherwise affect the measured DM values. Pectin content was estimated as GalA measured from AIR, as described in section **2.2.3.3**. All the results were expressed as g/100 g of puree, on a dry weight basis. The moisture content was determined by drying 3 g of puree (102°C for 18 h).

2.2.4.3. Viscosity

Puree viscosity was measured in duplicate at 20°C using a rheometer (ARES G2, TA Instruments, New Castle, DE), equipped with a four-blade vane geometry (diameter 27.637 mm, height 41.507 mm, gap 5.849 mm) under steady state measurements. A pre-shear of 50 s⁻¹ was applied for 1 min then the shear rate was increased from 1 to 200 s⁻¹. The Herschel-Bulkley model was used to describe the flow behavior ($R^2 > 0.999$).

2.2.4.4. Particle size

The mean particle size of the purees was determined using a laser diffraction analyzer (Master Sizer 3000, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) from diluted samples in deionized water, stirred at 2,500 rpm.

2.2.4.5. Extraction of pectin-rich fractions

In order to extract pectin-rich fractions and minimize pectin degradation, AIR was fractionated according to a protocol adapted from Vicente et al. (2007). An aliquot of AIR (1.5 g) was suspended in deionized water (130 mL) and stirred for 16 h at 23°C. The suspension was centrifuged (10,000 g x 10 min) at 23°C and the pellet was washed twice with water (2 x 10 mL). The supernatant and its water washings were pooled, filtered

(Whatman GF/C), and were designated as the water-soluble pectin (WSP) fraction. The residue was mixed and stirred with 130 mL of 50 mM CDTA in 50 mM potassium acetate buffer, at pH 6.5, for 8 h at 23°C. The mixture was then centrifuged and washed as described above and the combined filtrate was designated as the chelator-soluble pectin (CSP) fraction. The residue was suspended and stirred in 130 mL of 50 mM Na₂CO₃ in 20 mM NaBH₄ solution for 16 h at 4°C then for 3 h at 23°C. The suspension was centrifuged and washed as above. The combined filtrate was designated as the sodium carbonate-soluble pectin (NSP) fraction. The pH of the NSP fraction was adjusted to pH 6-6.5 with glacial acetic acid. The CSP fraction was dialyzed against 0.1 M NaCl for 24 h at 4°C. The three fractions were then dialyzed against deionized water for 3 days at 4°C to remove salt residues (M_w 15 kDa cut-off, Spectra/Por® 6, Spectrum Laboratory Inc., Rancho Dominguez, CA). One serial extraction was performed by AIR sample. GalA content was estimated from each fraction as described in section 2.2.3.3. Degree of methylation was determined for the AIR, WSP and CSP fractions, as described in section 2.2.3.4.

2.2.4.6. Monosaccharide composition

Neutral monosaccharides and galacturonic acid were identified as trimethylsilyl derivatives after acidic methanolysis of the polysaccharides from each pectin-rich fractions and subsequent GC analysis (Montreuil et al. 1986; Kamerling et al. 1975). Methanolysis was performed in 3 M MeOH-HCl for 4 h at 100°C and the methyl glycosides were then converted to the corresponding per-*O*-trimethylsilylated derivatives. Separation and quantification were achieved using a GC 2010 Plus System (Shimadzu Corporation, Mandel Scientific Co. Inc. Guelph, ON, Canada) equipped with an FID detector and a CP-Sil-5CB fused silica column (Chrompack, Varian, Mississauga, ON, Canada; 60 m × 0.32 mm i.d., 0.25 µm film thickness) in a split/splitless mode using helium at a flow of 1.5 mL.min⁻¹ as the carrier gas. Monosaccharides were identified according to their retention times and quantified using an internal standard method involving *myo*-inositol. All analyses were performed in triplicates.

2.2.4.7. Total phenolic content

Total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method (Singleton and Rossi 1965) adapted for microplate measurement, after extractions with 80% MeOH (2 x 20 mL, 20 min at 37°C) on lyophilized puree samples (0.2 g). The results are expressed as g of gallic acid equivalents/100 g of dried blueberry puree.

2.2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with SAS® 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Analysis of variance (ANOVA) using the GLM procedure was executed. For the characterization of cultivars, all dependent variables were analyzed using a one-way ANOVA and significance of the differences between the cultivars were determined using Tukey's multiple comparisons test ($\alpha = 0.05$). For heat-treatments, twelve purees were produced (2 cultivars x 2 heat treatments x 3 repetitions) with a complete randomized design. Two-way ANOVAs were used according to a factorial experiment 2 x 2, considering the effects "cultivar" (Cult) and "heat treatment" (HT). For significant interaction ($P \leq 0.05$), the means of the treatments and cultivars were individually compared with the Tukey's multiple comparisons test ($\alpha = 0.05$). For significant individual effect(s), the two means per cultivars or per heat treatments were compared with the same test and represented by bars with letters.

2.3. Results and discussion

2.3.1. Characterization of purees from six blueberry cultivars

The physicochemical characteristics and the composition of the six blueberry cultivars of 2014 are given in **Table 2-1**. The pH values ranged from 2.8 (Patriot) to 3.3 (Blueray). The SS/TA ratio (sugar/acid ratio) varied between 13.3 (Duke) and 19.6 (Blueray) meaning that Duke was the most acidic cultivar and Blueray the sweetest. Polaris tended to have the highest TDF content (19.0%), whereas Patriot had the lowest (13.6%). These values are in agreement with other studies on highbush blueberry: the USDA value is 15.2% (USDA 2017), and by summing lignin, cellulose, hemicellulose and pectin, Silva et al. (2005) measured 13.0% of dietary fiber. TDF content may also be estimated by measuring the AIR content. AIR is mainly composed of cell wall polysaccharides (fiber) with low amounts of co-precipitated soluble proteins (about 3-5%), lignin, salts of organic acids, and phenolic compounds. The AIR contents, similar on fresh weight to that of Vicente et al. (2007), confirmed the highest fiber content of Polaris. For the six cultivars, dietary fiber consisted of IDF and SDF in a ratio of approximately of 4:1, except Blueray (2.5:1). IDF is mainly composed of cellulose, hemicellulose, and a minor part of insoluble pectin, whereas SDF consists predominantly of pectin. Galacturonic acid (GalA) content was used to estimate pectin content since GalA is the main monosaccharide of pectin. Results showed the highest GalA content for Polaris (7.4%), while Reka had the lowest (4.7%). Values for the

other four cultivars were not significantly different, with values ranging from 5.1 to 5.9%. Values for GalA contents are in the range of the reported value of 3.4% in highbush blueberry (Silva et al. 2005). Pectin DM values ranged from 22%, for Polaris, to 41%, for Blueyay: all cultivars had therefore a low-methylated pectin (DM < 50%). Based on these results, two cultivars were selected for the subsequent work with heat treatments. Polaris was selected for its higher dietary fiber and pectin (GalA) contents, while Patriot was chosen since it is the most popular and the most produced highbush blueberry cultivar in the province of Quebec (AAC 2012), and is representative of the other cultivars for the fiber and pectin contents.

Table 2-1. Physicochemical characteristics and composition (g/100 g dry weight) of highbush blueberry cultivars in 2014

	Blueyay	Duke	Northland	Patriot	Polaris	Reka
Physicochemical characteristics						
pH	3.3 ± 0.0 ^a	3.1 ± 0.1 ^b	3.0 ± 0.0 ^b	2.8 ± 0.0 ^c	3.3 ± 0.1 ^a	3.1 ± 0.0 ^b
SS/TA	19.6 ± 0.1	13.3 ± 0.1	16.3 ± 0.1	13.4 ± 0.1	17.7 ± 0.1	15.6 ± 0.1
Composition						
Moisture	84.5 ± 0.0 ^c	85.8 ± 0.1 ^b	85.9 ± 0.1 ^b	87.3 ± 0.0 ^a	86.4 ± 0.2 ^{ab}	86.0 ± 0.8 ^b
Protein	2.2 ± 0.3 ^b	3.6 ± 0.1 ^a	2.4 ± 0.2 ^b	2.7 ± 0.2 ^{ab}	3.1 ± 0.4 ^{ab}	2.5 ± 0.1 ^b
Lipid	0.10 ± 0.03 ^a	0.16 ± 0.00 ^a	0.14 ± 0.02 ^a	0.12 ± 0.04 ^a	0.18 ± 0.00 ^a	0.16 ± 0.01 ^a
Ash	1.1 ± 0.0 ^a	1.1 ± 0.0 ^{ab}	1.0 ± 0.0 ^c	1.0 ± 0.0 ^b	1.1 ± 0.0 ^a	1.1 ± 0.0 ^{ab}
TDF	14.9 ± 0.1 ^b	16.0 ± 0.9 ^{ab}	15.6 ± 0.5 ^{ab}	13.6 ± 0.2 ^b	19.0 ± 2.0 ^a	16.0 ± 0.1 ^{ab}
IDF	10.6 ± 0.0 ^b	12.9 ± 1.2 ^{ab}	12.8 ± 0.4 ^{ab}	10.9 ± 0.3 ^b	15.5 ± 1.9 ^a	13.6 ± 0.3 ^{ab}
SDF	4.3 ± 0.1 ^a	3.1 ± 0.4 ^{bc}	2.8 ± 0.1 ^{bc}	2.7 ± 0.1 ^{bc}	3.6 ± 0.1 ^{ab}	2.4 ± 0.5 ^c
AIR	17.8 ± ND	18.5 ± ND	17.1 ± ND	16.9 ± 0.2	20.5 ± ND	17.7 ± ND
GalA ¹	5.9 ± 0.0 ^{ab}	5.3 ± 0.3 ^{ab}	5.1 ± 0.9 ^{ab}	5.9 ± 0.7 ^{ab}	7.4 ± 0.7 ^a	4.7 ± 0.9 ^b
DM (%)	41 ± 3 ^a	32 ± 4 ^{ab}	32 ± 5 ^{ab}	30 ± 5 ^{ab}	22 ± 2 ^b	31 ± 7 ^{ab}

Mean value ± standard deviation. Means within a line followed by the same letter (a–c) were not significantly different according to the Tukey's test ($\alpha = 0.05$). SS/TA represents the sugar/acid ratio. TA: Titratable acidity (% citric acid). SS: Soluble solids (°Brix). TDF: Total dietary fiber. IDF: Insoluble dietary fiber. SDF: Soluble dietary fiber. AIR: Alcohol-insoluble residue. DM: Degree of methylation from AIR. ND: not determined. ¹ Galacturonic acid from AIR, as an estimate of pectin content.

In 2015, the selected two cultivars, Polaris and Patriot, were harvested and their physicochemical characteristics and composition were determined (**Annex 1-1**). Globally, both cultivars were significantly less acidic and sweeter compared to 2014, with higher pH values of 3.1 and 3.6 for Patriot and Polaris, respectively. Polaris still had higher contents in dietary fiber, in AIR, and in pectin (GalA) than Patriot and these values were not significantly different than those from the previous year. However, the TDF and IDF

contents of Patriot in 2015 significantly differed from that of 2014; IDF content was lower in 2015, at 9.0%, compared to a value of 10.9% in 2014, resulting in a lower TDF content (11.8% in 2015 vs. 13.6% in 2014). GalA content were also significantly lower in 2015 (3.7% in 2015 vs. 5.9% in 2014). Various factors such as growing conditions, climate and storage time, may cause variations in the physicochemical characteristics from season to season (Retamales and Hancock 2012). It is likely that such parameters also have affected fiber composition from one year to the next. DM values of both cultivars were similar and significantly higher than values in 2014 (44 and 41% in 2015 vs. 30 and 22% in 2014 for Patriot and Polaris respectively). Cultivars harvested in 2015 were frozen at -30°C and analyzed a few weeks after their freezing, whereas cultivars harvested in 2014 were frozen and stored at -18°C for 4 months before being transferred at -30°C for 2 months then analyzed. It is likely that pectin was partially de-methylated during the slower freezing process and over storage time, since PME was likely not completely inactivated by the freezing (Van Buggenhout et al. 2009). Reports on DM of blueberry pectin are scarce but Lin et al. (2016) also measured DM values lower than 50%.

2.3.2. Influence of heat treatment on the purees

The present results showed that only the cultivar had a significant effect on the fiber amount after the heat treatment (Table 2-2).

Table 2-2. AIR, fiber and pectin contents (g/100 g dry weight) and total phenolic content (g gallic acid equivalent/100 g dry weight) of the heat-treated purees

Purees	AIR	TDF	IDF	SDF	GalA ¹	Total phenolic content
PaP	16.5 ± 0.7	13.2 ± 0.7	10.1 ± 0.4	3.1 ± 0.3	3.2 ± 0.5	1.39 ± 0.03
PaLTB+P	16.3 ± 1.0	12.5 ± 0.2	9.6 ± 0.3	2.8 ± 0.1	4.0 ± 0.7	1.31 ± 0.06
PoP	28.8 ± 0.8	21.8 ± 0.4	17.6 ± 0.5	4.2 ± 0.1	4.9 ± 0.2	1.36 ± 0.03
PoLTB+P	28.5 ± 0.7	21.3 ± 1.4	17.1 ± 1.3	4.3 ± 0.2	5.8 ± 1.2	1.32 ± 0.02
Cult	*	*	*	*	*	n.s
HT	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
Cult * HT	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s

Mean value ± standard deviation. Results of the two-way ANOVAs (cultivar (Cult) and heat treatment effects (HT), with interaction); n.s: not significant ($P > 0.05$). Pa: Patriot. Po: Polaris. P: pasteurization. LTB+P: low-temperature blanching + pasteurization. TDF: Total dietary fiber. IDF: Insoluble dietary fiber. SDF: Soluble dietary fiber. AIR: Alcohol-insoluble residue. ¹ Galacturonic acid from AIR, as an estimate of pectin content.

The Polaris purees had higher AIR, fiber and pectin (GalA) contents than the Patriot purees, as observed in the previous characterization realized on the raw purees (**Table 2-1**). There was no significant effect of LTB+P on the fiber and GalA amounts, compared to P. Yet, according to the literature, pectin is the fiber that is the most affected by heat treatments. The pH of blueberry purees and the moderated temperature (60°C) of the blanching appear to have prevented any fiber degradation. Indeed, the pH of blueberry purees was 3.1 and 3.6 for Patriot and Polaris cultivars, respectively (**Annex 1-1**). These values are in the pH range where pectin is generally very stable because this is near its pKa value (2.9-3.3). Furthermore, these pH values were too acidic to induce substantial β -elimination and not acidic enough to allow fast acid hydrolysis, the two main pectin degradation mechanisms leading to pectin depolymerization and solubilization (Fraeye et al. 2009; Diaz et al. 2007) and an increase of SDF and TDF (Colin-Henrion et al. 2009). Indeed, β -elimination occurs mainly at neutral or weakly acidic pH (pH > 4.5) and for temperature superior to 85°C, whereas acid hydrolysis is promoted only at pH < 3 (Sila et al. 2009b; Fraeye et al. 2007a). On the other hand, the presence of polygalacturonase has been found in blueberry (Deng et al. 2014). This enzyme, which hydrolyzes glycosidic links between GalA molecules of pectin, is inactivated by pasteurization, but similarly to PME, it is more active at temperatures around 50-60°C (Duvetter et al. 2009). Its activity lowered the pectin amount in tomato paste samples during the concentration process performed at around 65°C (Anthon et al. 2008). In blueberry purees, the polygalacturonase activity was likely minimal or inhibited at 60°C, since no decrease in pectin content was perceived with LTB+P treatment when compared to P treatment. Furthermore, the other endogenous enzymes affecting pectin structure, such as β -galactosidase and α -arabinofuranosidase, are thermo-labile and were inactivated at 60°C in tomato (Houben et al. 2013).

The viscosity of the heat-treated purees confirmed the limited effect of heat-treatment on fiber content and the significant effect of cultivar (**Annex 1-2**). For both Polaris and Patriot cultivars, the viscosity was not affected by LTB+P, reflecting the absence of significant pectin depolymerization. Moreover, regardless of the heat treatment, the Polaris purees had a higher viscosity (3.2 ± 0.2 Pa.s) than the Patriot purees (1.1 ± 0.1 Pa.s) that can be attributed to a higher fiber content (**Table 2-2**). Indeed, fiber amount and molecular weight are known for their capacity to increase the viscosity but the latter was not tested in this study. The viscosity was not affected by the mean particle size of purees since it was similar after both heat treatments (**Annex 1-2**).

Because of beneficial health effects of phenolic compounds, especially for their antioxidant capacity, the Folin assay was performed to get a global measure of total phenolic content (**Table 2-2**). Values for total phenolic contents were similar after both heat treatments and were in the range of reported values for unheated blueberry (Moyer et al. 2002), suggesting that the heat treatments performed in the present study did not degrade blueberry phenolic compounds. Nonetheless, beyond the phenolic amounts, heat treatments may affect the interactions between phenolic compounds and proteins or polysaccharides, which can modify their antioxidant activity (Le Bourvellec and Renard 2012). These interactions will be assessed in an upcoming study.

2.3.3. Influence of heat treatment on the pectin structure and solubility

2.3.3.1. Degree of methylation of pectin in AIR

DM of pectin found in AIR is presented in **Figure 2-2**.

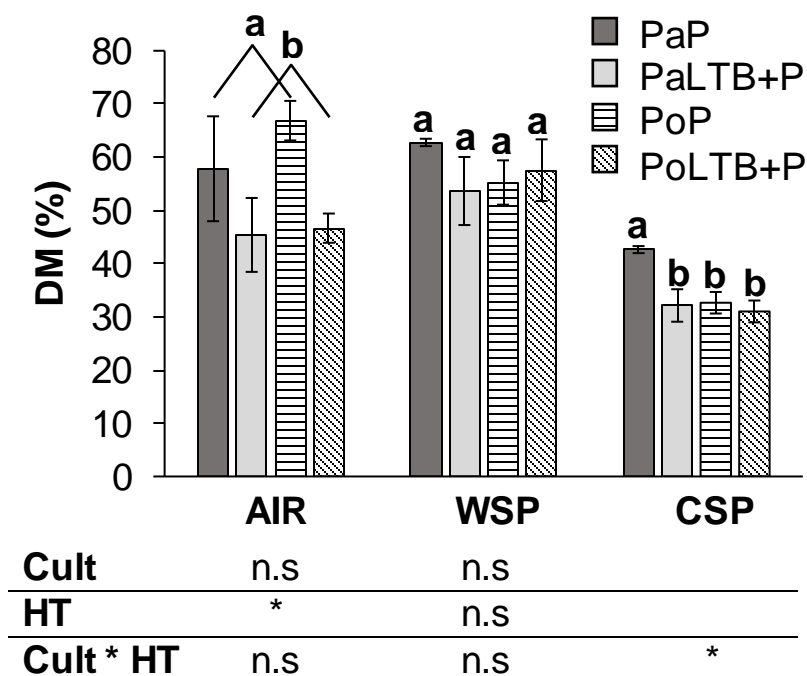


Figure 2-2. Degree of methylation of AIR and the water- and chelator-soluble pectin fractions (WSP and CSP) from the heat-treated purees

Mean value \pm standard deviation. Results of the two-way ANOVAs (cultivar (Cult) and heat treatment effects (HT), with interaction); n.s: not significant ($P > 0.05$). Means within a same series followed by the same letter (a–b) were not significantly different according to Tukey's test ($\alpha = 0.05$). For AIR, the mean of pasteurized cultivars (PaP + PoP) is significantly different from the mean of blanched cultivars (PaLTB+P + PoLTB+P). Pa: Patriot. Po: Polaris. P: pasteurization. LTB+P: low-temperature blanching + pasteurization. AIR: Alcohol-insoluble residue.

LTB+P treatment had a significant effect on DM of pectin in AIR. For both cultivars, DM decreased with LTB+P treatment in comparison to P treatment: the high-methylated pectin (DM > 50%) became low-methylated pectin (DM < 50%). This decrease likely reflected the enzymatic de-methylation. Indeed, PME activity is enhanced at temperatures ranging between 50 and 65°C (Duvetter et al. 2009). With high temperature, pectin can also be de-methylated by chemical hydrolysis. However, the extent of the reaction is significant only under alkaline or near neutral conditions (Sila et al. 2009b). Therefore, in the present study, chemical de-methylation of the blueberry purees was unlikely or limited because of their low pH values of 3.1-3.6 (**Annex 1-1**) (Diaz et al. 2007).

For the raw purees, DM of both Patriot and Polaris cultivars were higher (> 50%) after P treatment than DM determined for the cultivar characterization (< 50%). Yet, a short and high heat treatment like P is too fast to significantly change the DM (Sila et al. 2005), or it may result in slightly decreased DM because of a slight PME activity occurring before reaching 90°C (Christiaens et al. 2012a; Sila et al. 2006b). In the present study, the AIR extraction procedure was not exactly the same for the cultivar characterization and for the heat-treated puree analyzes. In the first case, blueberry purees were mixed with boiling EtOH in order to inactivate the enzymes, which could result in a decrease of DM before the inactivation temperature was reached throughout the purees.

2.3.3.2. Pectin solubility and distribution of the pectin-rich fractions

To investigate the pectin modifications that may have been induced by the heat treatments, pectin found in AIR was successively extracted into three pectin-rich fractions, depending on the pectin solubility. WSP fraction contains pectin that is weakly bound to cell walls, CSP fraction contains pectin with ionic cross-links, and NSP fraction contains pectin that is strongly bound to cell walls by covalent ester linkages. The relative amounts of each pectin-rich fractions in the different purees are presented in **Figure 2-3**. For both cultivars, most of the pectin was water-soluble, the WSP fraction accounting for over 50% of total pectin, in agreement with reported results for highbush blueberry (Vicente et al. 2007). Polaris purees contained a higher and lower proportions of pectin from NSP and CSP fractions, respectively, compared to Patriot purees. LTB+P treatment had a significant effect on the WSP amount compared to P treatment. Indeed, WSP amount decreased with LTB+P for both cultivars, whereas CSP amount tended to increase. No significant effect on NSP amount was observed due to LTB+P treatment. A reduction in content of water-soluble pectin (WSP) and a rise in insoluble pectin (CSP and NSP) were

also reported after a similar heat treatment (60°C/40 min) for carrot (Sila et al. 2006b) and broccoli (Christiaens et al. 2011; Christiaens et al. 2012a). The conversion from WSP to CSP was attributed to a de-methylation of water-soluble pectin that increased pectin overall charge and its ability to form ionic bounds, especially with endogenous calcium. Nevertheless, for both cultivars, the WSP fraction remained the major fraction (> 50%) even after the low-temperature blanching (LTB+P), unlike the reported data for vegetables for which the WSP fraction became lower than that of the combined insoluble fractions (Christiaens et al. 2012a; Christiaens et al. 2012b; Christiaens et al. 2011; Sila et al. 2006b).

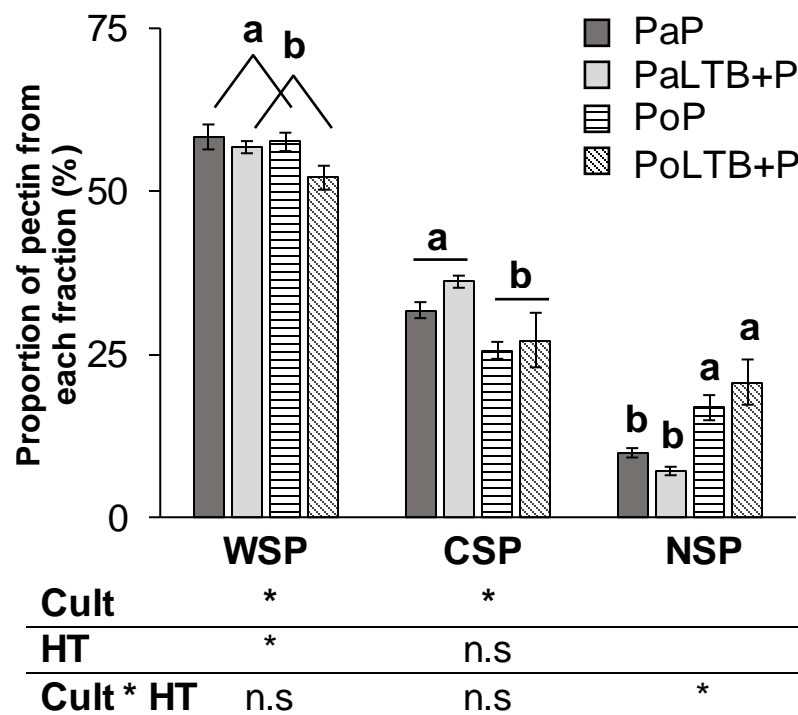


Figure 2-3. Relative amount of pectin-rich fractions

Mean value \pm standard deviation. GalA in the fraction/sum of the GalA amount of each fraction \times 100. For WSP, only the HT effect is represented: the mean of pasteurized cultivars (PaP + PoP) is significantly different from the mean of blanched cultivars (PaLTB+P + PoLTB+P). For CSP, the mean of Patriot cultivar (PaP + PaLTB+P) is significantly different from the mean of Polaris cultivars (PoP + PoLTB+P). Pa: Patriot. Po: Polaris. P: pasteurization. LTB+P: low-temperature blanching + pasteurization.

In contrast to vegetables, the changes in the proportion of pectin-rich fractions after a treatment enhancing PME activity were not very pronounced. Fraeye et al. (2009) also reported no significant pectin modifications in strawberry samples subjected to the activity

of an exogenous PME. According to these authors, these differences compared to vegetables might be explained by a lower ratio of endogenous calcium to pectin level that could limit the ionic cross-linkage formation, despite a lowered DM. Indeed, they observed a noticeable decrease of WSP amount and an increase of CSP amount after calcium addition during the activation of an exogenous PME, whereas no clear changes in relative pectin-rich fractions were noticed without calcium addition (Fraeye et al. 2009). Like strawberry, blueberry also has a very low content in calcium: 0.06 mg/g (USDA 2017), while fresh carrot contains 0.64 mg/g (Sila et al. 2005) and raw broccoli 0.32 mg/g (Christiaens et al. 2011). In addition to endogenous calcium content, the cross-linkage of pectin with divalent ions, particularly calcium, also depends on calcium location and pectin structure (Christiaens et al. 2014), which are highly source-dependent (Houben et al. 2011). For instance, a too low linearity in pectin structure might hinder the ionic cross-linkage (Houben et al. 2011). Furthermore, beyond the calcium amount, PME activity also plays a role in pectin cross-linkage related to firmness of fruits and vegetables (Javeri et al. 1991; Degraeve et al. 2003). For example, fruits usually have a lower pH than vegetables, which may reduce PME activity (Duvetter et al. 2009), but this was not measured in this study. All this confirms the importance and relevance of studying many types of fruits and vegetables, even several cultivars.

2.3.3.3. Monosaccharide composition of the pectin-rich fractions

Monosaccharide composition of each pectin-rich fraction was determined to better understand pectin behavior in relation to its solubility and DM. Polysaccharide methanolysis followed by trimethylsilyl derivatization and GC analysis is a fast and convenient method for pectin characterization, because it degrades monosaccharides to a lower extent than acid hydrolysis, and allows for the quantification of both neutral monosaccharides and GalA (Sundberg et al. 1996). Pectin is mainly composed of linear chains of GalA (55-90% in this study, **Annex 1-3**), known as homogalacturonan (HG). Rhamnose (Rha), accounting for about around 1%, is occasionally inserted into the chain forming "hairy" regions called rhamnogalacturonan (RG). The latter is branched with neutral monosaccharide side chains composed mainly of arabinose (Ara) (3-16%) and galactose (Gal) (4-23%). Similar proportions of arabinose and galactose were reported for apple and strawberry pectins (Fraeye et al. 2007b).

To better visualize the structure of each pectin-rich fraction, the ratio of GalA to neutral monosaccharides was calculated as a measure of the pectin linearity (**Fig. 2-4**). A high

ratio implies large amounts of HG and consequently low amounts of branched RG regions. For both Patriot and Polaris cultivars, WSP fraction and NSP fraction showed the lowest ratios of GalA to neutral monosaccharides, whereas CSP fraction presented the highest ratio, indicating that pectin in the CSP fraction was more linear (higher in HG). Patriot purees contained more arabinose and galactose than Polaris in WSP and CSP fractions, resulting in lower ratios. Patriot pectin was therefore globally more branched than Polaris pectin.

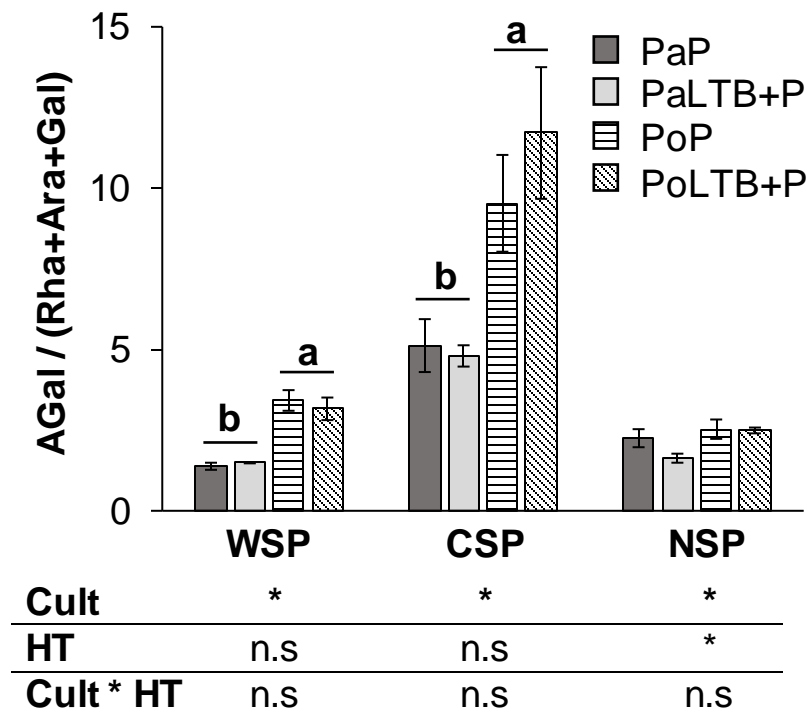


Figure 2-4. Ratio of GalA to neutral monosaccharides in pectin-rich fractions

Mean value \pm standard deviation. All monosaccharides were measured as trimethylsilyl derivatives after acidic methanolysis and subsequent GC analysis. For NSP, the mean of pasteurized cultivars is significantly different from the mean of blanched cultivars, and the mean of Patriot cultivar (PaP + PaLTB+P) is significantly different from the mean of Polaris cultivars (PoP + PoLTB+P): not represented to avoid clutter. Rhamnose (Rha), arabinose (Ara), and galactose (Gal) were the neutral monosaccharides considered. Pa: Patriot. Po: Polaris. P: pasteurization. LTB+P: low-temperature blanching + pasteurization.

Compared with the P treatment, the LTB+P treatment had no significant effect on the ratio of GalA to neutral monosaccharides for both cultivars. Yet, Christiaens et al. (2011) reported a decrease of WSP ratio and an increase of CSP ratio from broccoli samples treated by a low-temperature blanching compared to raw broccoli samples. This observation indicated that it was mainly the HG-rich pectin that forms new ionic cross-links

(CSP) following de-methylation. However, as discussed in the previous section, blueberry contains less endogenous calcium than broccoli. In addition, for all cultivars and heat treatments, our values of CSP ratio were higher than for broccoli (5-10 vs. 2 for broccoli), meaning higher pectin linearity and GalA proportion in blueberry. Therefore, most of endogenous calcium was likely already cross-linked with the GalA molecules, leaving no or limited calcium to form new ionic cross-links following the de-methylation. This would confirm that the available calcium amount has a role on converting the water-soluble pectin into cross-linked pectin, as described in **2.3.3.2**. This suggestion is also supported by the results of Christiaens et al. (2011) who observed a larger CSP ratio increase in the presence of added calcium. Therefore, the high pectin linearity and the low endogenous calcium content of blueberry would allow for a reduction of pectin DM without substantial loss the pectin solubility.

2.3.3.4. Degree of methylation in the pectin-rich fractions

Values of DM for pectin in WSP and CSP fractions is given in **Figure 2-2**. For both cultivars and treatments, pectin found in WSP fraction was high-methylated with a DM ranging from 53 to 63%, whereas DM of pectin in CSP fraction was low-methylated, at 31 to 43%. DM of pectin found in AIR, which consists of the three pectin-rich fractions, globally had intermediate values. These observations are consistent with the literature data for other fruits and vegetables (Christiaens et al. 2012a; Fraeye et al. 2009; Houben et al. 2011; Sila et al. 2006b). DM in NSP fraction could not be measured since the extraction of this fraction occurred in alkaline conditions which alter ester linkages.

Globally, DM values of the pectin-rich fractions did not significantly differ between the heat treatments. Christiaens et al. (2012b) and Sila et al. (2006b) also noticed no changes of DM in pectin-rich fractions from broccoli and carrot purees, respectively, after a low-temperature blanching (equivalent to LTB+P) compared with a high-temperature blanching (equivalent to P), despite a diminution of DM in AIR. As LTB+P modified pectin-rich fraction proportion, the pectin in AIR globally consisted in less high-methylated pectin (WSP) and more low-methylated pectin (CSP): this might explain the decrease of DM in AIR, although there was no significant changes of DM in fractions.

As no studies had been reported on blueberry fiber, the combination time/temperature of LTB was chosen according to the literature and preliminary tests. A temperature of 60°C is the most used to blanch vegetables and to activate endogenous PME (Christiaens et al. 2014). Since PME activity also depends on the pH, it would be relevant to test other

temperatures to find optimal conditions for PME activation in blueberry purees. Indeed, as seen previously, the pH of blueberry is lower than that of most vegetables. Moreover, reported LTB for vegetables typically lasts between 10 and 60 min (Christiaens et al. 2014). Pectin de-methylation seemed to continue beyond 60 min, since our preliminary tests showed that the charge density (Zeta-potential) of AIR samples decreased (60 min: -15.7 mV; 120 min: -17.3 mV; unpublished data). However, a long time heat process is not convenient for the food industries and could lead to the degradation of some bioactive molecules such as phenolic compounds. In addition, a too low DM could result in a higher reduction in pectin solubility through the conversion into CSP, as studied in the present work, and also through the depolymerization by the polygalacturonase. Indeed, this enzyme shows increasing activity with low-methylated pectin (Duvetter et al. 2009). Yet, in order to incorporate the purees into food products, soluble pectin is preferred because it contains more available free carboxylic groups enhancing its anionic nature and promoting interactions with other macromolecules wearing positive charges such as proteins. Interactions between pectin and proteins may provide useful functionalities for the development of food products, including rheological and textural properties (Turgeon and Laneville 2009). For example, pectin interactions with proteins may protect them against thermal aggregation (Ibanoglu 2005) or may be used as a fat-replacer ingredient, in yoghurt for instance (Krzeminski et al. 2014a). Finally, with a LTB lasting 60 min, the pectin found in the AIR of both Polaris and Patriot cultivars reached a DM < 50% that was sufficient to consider the pectin as low-methylated, while keeping most of the pectin soluble (high WSP). Compared to high-methylated pectin, low-methylated pectin carries more charges, through its free carboxylic groups, promoting even more the interactions with other ingredients, as explained previously, which could also help the development of food products.

2.4. Conclusion

The potential of a low-temperature blanching as a tool to modulate the pectin structure was investigated in blueberry. The present study showed that fiber content and composition of blueberry were cultivar-dependent and were not affected by neither a pasteurization nor a low-temperature blanching followed by a pasteurization. Rheological properties depended also on the cultivar and remained constant between both heat treatments, as well as the monosaccharide composition of pectin. However, pectin DM and solubility were modulated when using a low-temperature blanching treatment before

pasteurization. Such a treatment decreased DM values and the amount of the water-soluble pectin, possibly attributed to the enhanced PME activity. A LTB treatment is a relevant and simple process to generate a blueberry puree with a low-methylated pectin, while keeping the pectin mostly soluble and preserving the fiber level and the bioactive compounds (phenolic content). An upcoming study will investigate the impact of LTB+P compared to unheated blueberry purees studying pectin modifications and interactions with proteins. Indeed, these modifications may enhance the affinity of pectin towards other ingredients in order to facilitate the formulation of new functional foods. Further investigations of blueberry puree functionality will be conducted to provide more information in the food engineering field and the development of new applications.

2.5. Acknowledgements

This work was supported by the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec through the Innov'Action program (grant number: IA113114). The authors thank Diane Gagnon and Ronan Corcuff for their skillful help, and declare no conflict of interest.

Chapitre 3. Étude des interactions entre la pectine d'une purée de bleuets et des protéines de lactosérum : fonctionnalité et application

Transition contextuelle

Les travaux présentés dans le chapitre 2 ont permis de retenir deux cultivars de bleuets pour la suite du projet : Polaris, pour sa plus haute teneur en fibres et en pectine, et Patriot, en raison de sa plus large production au Québec. L'objectif qui était de diminuer le DM de la pectine afin d'augmenter ses sites d'interactions avec les protéines, a été atteint grâce à l'application d'un blanchiment à basse température sur les purées de bleuets.

Le chapitre 3 présente la deuxième phase du projet (objectif 2) dans laquelle des protéines de lactosérum, sous forme d'isolat, ont été ajoutées à la purée de bleuets dans le but de former des complexes entre elles et la pectine du bleuet. Ce chapitre se décline en deux parties : l'étude des mixtures protéines-purée seules puis l'application de ces mixtures dans une boisson modèle.

La première partie consistait à étudier la formation de complexes protéine-pectine au sein d'une purée de bleuets, en fonction du cultivar et du type de traitement (chauffage ou non) de la purée. En effet, pour évaluer si une plus haute teneur en pectine (Polaris) avait une influence sur la formation de complexes, nous avons continué à travailler avec les deux cultivars de bleuets (Patriot et Polaris). De plus, la purée ayant subi le blanchiment à basse température étudiée dans le chapitre 2 a été comparée à de la purée non traitée thermiquement afin d'étudier l'impact du DM de la pectine sur la formation de complexes. La purée non chauffée a été choisie comme comparaison car, dans une visée industrielle, il peut être plus intéressant d'utiliser de la purée non traitée thermiquement. En effet, cela évite une étape de chauffage qui nécessiterait davantage de temps et d'argent pour une entreprise. Finalement, l'impact de la formation de complexes sur les propriétés rhéologiques et texturales des mixtures résultantes était aussi à l'étude.

Dans la deuxième partie, ces mixtures ont été utilisées pour la fabrication de smoothies modèles dont la viscosité et la stabilité dans le temps ont été mesurées. En effet, il a été

montré dans le chapitre 1 de cette thèse que ce sont les deux principales problématiques rencontrées dans la formulation de boissons riches en fibres et en protéines. Les smoothies ne sont pas des aliments normalisés dans le *Règlement sur les aliments et drogues* de Santé Canada. Généralement, ce sont des produits à base de fruits ayant une consistance semi-liquide et douce (« *smooth* ») qui sont préparés en mélangeant dans des proportions adéquates du jus et des purées de fruits (Teleszko and Wojdyło 2014; Ruxton 2008). Dans le cadre de ce projet de doctorat, le choix du smoothie comme application alimentaire a été donc décidé pour commencer, puisqu'il s'agissait d'un type de boisson tout à fait adapté à l'incorporation directe d'une purée de bleuets. De plus, cela permettait de pouvoir faire relativement aisément un lien avec les propriétés observées des mixtures seules.

Ce chapitre 3 permet donc de mieux comprendre les systèmes mixtes « protéines-fruits » et mieux appréhender leurs possibles applications dans le domaine alimentaire. Il fait l'objet d'un article qui a été soumis dans *Food Hydrocolloids* sous le titre « **Study of interactions between pectin in a blueberry puree and whey proteins: functionality and application** ». Les auteurs sont Laura M. Chevalier, Laurie-Eve Rioux, Paul Angers et Sylvie L. Turgeon.

Résumé

Les protéines et les fibres, spécifiquement la pectine, sont connues pour former des complexes à pH acide, principalement par interactions électrostatiques entre ces deux macromolécules lorsqu'elles portent des charges opposées. Les complexes protéine-pectine pourraient améliorer la fonctionnalité des aliments, tout en les enrichissant à la fois en protéines et en fibres. Les études sur ces complexes dans des conditions telles que retrouvées dans les aliments sont rares. Le but de ces travaux était d'étudier les interactions entre des protéines de lactosérum et de la purée de bleuets, en particulier sa pectine, et d'évaluer l'impact sur la fonctionnalité de la purée seule ou incorporée dans une boisson modèle. Après l'incorporation d'un isolat de protéines de lactosérum (IPL) dans des purées à pH 3,5 et 6,5, les teneurs en pectine et protéines solubles ainsi que la viscosité des mixtures résultantes ont été déterminées. La diminution de la solubilité de la pectine et des protéines traduisait la formation de complexes protéine-pectine par interactions électrostatiques à pH 3,5, contribuant à augmenter la viscosité des mixtures. Le chauffage de la purée réalisé avant l'ajout de l'IPL augmentait la solubilité de la pectine et réduisait à la fois la formation de complexes insolubles et l'augmentation de la viscosité. Finalement, la purée non chauffée et enrichie avec l'IPL a été utilisée pour préparer des smoothies. La complexation protéine-pectine, probablement renforcée par la pasteurisation finale des smoothies, contribuait à réduire la viscosité des smoothies et peut être expliquée notamment par des particules de plus petites tailles. Bien que la stabilité des smoothies puisse être améliorée, les interactions entre la pectine dans une purée de bleuets et les protéines de lactosérum ont permis de former un nouvel ingrédient fonctionnel pouvant être utile dans la formulation de boissons riches en fibres et protéines.

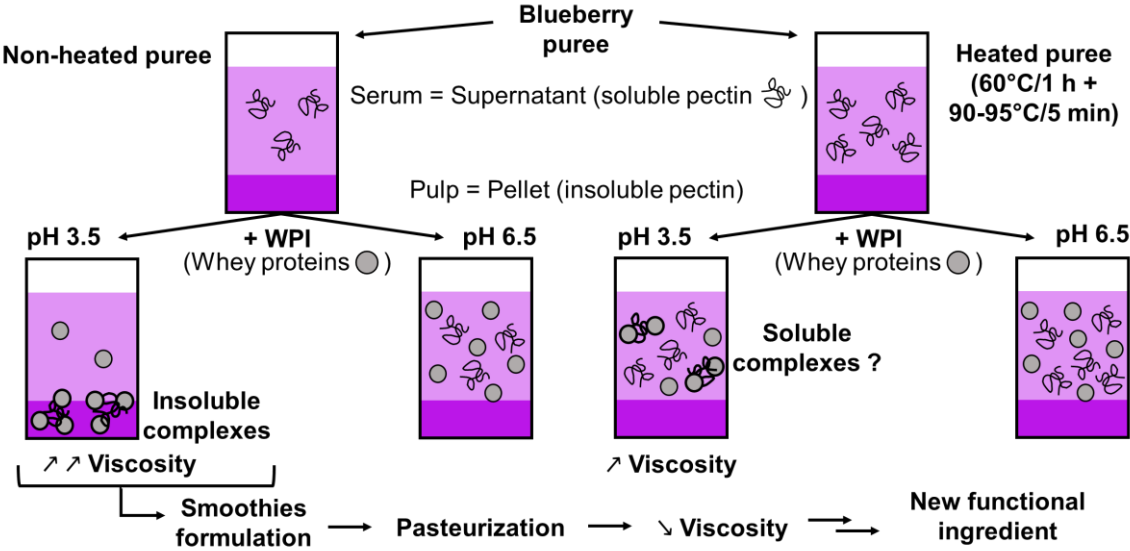
Mots-clés : Bleuets ; Fonctionnalité ; Boisson ; Pectine ; Interactions protéine-pectine ; Protéines de lactosérum.

Abstract

Protein and fiber, especially pectin, are known to form complexes at acidic pH, mostly due to electrostatic interactions between these two oppositely charged macromolecules. Protein-pectin complexes could improve the functionality of foods, while enriching the latter with both protein and fiber. Studies on these complexes under actual food conditions are scarce. The aim of this work was to study interactions between whey proteins and blueberry puree, in particular its pectin, and to evaluate the impact on the functionality of the puree alone or incorporated into a model beverage. After the addition of a whey protein isolate (WPI) into purees at pH 3.5 or 6.5, the soluble pectin and protein contents and the viscosity of the resulting mixtures were determined. The decrease in the solubility of pectin and proteins indicated the formation of protein-pectin complexes by electrostatic interactions at pH 3.5, contributing to increase the mixture viscosity. Heating the puree prior to the WPI addition increased the pectin solubility and reduced both the formation of insoluble complexes and the viscosity increase. Finally, the non-heated puree enriched in WPI was used to prepare smoothies. This time, the protein-pectin complexation, probably reinforced by the final pasteurization of the smoothies, contributed to reduce the smoothie viscosity and can be explained in particular by particles of smaller sizes. Although the smoothie stability can be improved, the interactions between blueberry pectin in a puree and whey proteins allowed to design a novel functional ingredient that may be helpful in formulating beverages rich in fiber and protein.

Keywords: Blueberry; Functionality; Beverage; Pectin; Protein-pectin interactions; Whey proteins.

Graphical abstract



3.1. Introduction

Protein and fiber are two food constituents of growing interest to health-conscious consumers. In recent years, the molecular interactions between these two macromolecules and the behavior of mixed systems have received increasing research attention in order to extend their food applications (Turgeon and Laneuville 2009). Indeed, some fiber present in plants, in particular pectin, are anionic polysaccharides which can form complexes with proteins, most often through electrostatic interactions when both have opposite charges. In addition to their nutritional contribution, protein-polysaccharide (P-PS) complexes have shown interesting functional properties, such as decreased aggregation and precipitation of proteins, improved thermal stability of proteins, and modification of the viscosity of mixed systems (Schmitt and Turgeon 2011; Turgeon and Laneuville 2009). These properties could favor the incorporation of both macromolecules into food products to develop new functional foods, high in fiber and protein. However, P-PS interactions depend on the molecular characteristics of the two macromolecules (e.g. charge density, structural characteristics, and molecular weight), their concentration and ratios, as well as the environmental conditions (e.g. pH, temperature, ionic strength, and the presence of other molecules). All these factors may affect the properties of the P-PS complex and limit their use in food formulations.

Although there is a significant amount of publications on P-PS mixed systems, studies have generally been conducted in diluted and aqueous systems, using purified macromolecules, far from the complex conditions of a real food matrix. The present study focused on the formation of complexes between proteins from a whey protein isolate (WPI) and a blueberry puree, a matrix that can easily be incorporated into a food product. Whey proteins are a mixture of globular proteins of which β -lactoglobulin is the most abundant and has been thoroughly studied for P-PS complexation. Whey proteins are soluble at acidic pH and have an isoelectric point (IEP) around pH 5.0-5.2 (Pritchard and Kailasapathy 2011; Edwards et al. 2008; Ju and Kilara 1998). Blueberry, a very popular fruit in Canada, contains more than 2% fiber and about 0.5% pectin (Chevalier et al. 2017a). Pectin is an anionic polysaccharide and is the only fiber in fruit that carries charges. Its structure consists mainly of linear chains of galacturonic acid. Its pKa is in the range of 2.9-3.3 (Brejnholt 2010), and therefore pectin is typically negatively charged in most food systems. The global charge density of pectin is governed by the amount of methyl-esterified carboxylic groups, referred as the degree of methylation (DM). Recently, it has been shown that a low-temperature blanching (1 h at 60°C) resulted in decreased

pectin DM in a blueberry puree, likely due to increased endogenous pectin methyl-esterase activity (Chevalier et al. 2017a). A lower DM value results in a higher global charge density, which enhances the interactions of pectin with proteins (Girard et al. 2002). Therefore, we hypothesized that pectin within a blueberry puree can form complexes in the presence of added WPI, and the application of such a heat treatment on the puree, prior to the addition of WPI, could improve protein-pectin complexation.

On the other hand, other components in blueberry may interfere in protein-pectin complex formation. Indeed, blueberry is rich in phenolic compounds (0.2-0.3%) (Prior et al. 1998; Chevalier et al. 2017a) that can interact with proteins and polysaccharides mainly due to hydrogen bonding and hydrophobic interactions. For example, protein-polyphenol interactions are well known, particularly for their contribution to astringent perception and haze formation in juices and wines. These polymers may form insoluble complexes, and several recent reviews have described these interactions in more detail (Le Bourvellec and Renard 2012; Ozdal et al. 2013).

The aim of the present work was to study the interactions and the formation of complexes between added whey proteins and pectin present in blueberry purees. The effect of a pre-heating step of the puree and the effect of the pH have been studied. The impact of complexes on the viscosity of the resulting mixtures was also assessed. Then, the whey protein-blueberry puree mixture containing complexes was incorporated into a model smoothie to demonstrate the potential of these complexes to enrich beverages in both fiber and protein.

3.2. Materials and methods

3.2.1. Chemicals

MeOH (certified ACS) was purchased from Fisher Chemicals (Fair Lawn, NJ), 3-phenylphenol and Folin & Ciocalteu's phenol reagent were obtained from Sigma-Aldrich Inc. (Milwaukee, WI), and deuterated MeOH (d₃-MeOH) was from CDN Isotopes (Pointe-Claire, QC, Canada).

3.2.2. Material

Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) were obtained from Agridor (Beaumont, QC, Canada). Two cultivars, "Patriot" and "Polaris", were harvested at their physiological maturity (July/August 2015), frozen at -30°C, vacuum-packed, and stored at -30°C until

being pureed and heat treated or not (March 2017). Whey protein isolate (WPI) was obtained from Davisco Foods International Inc. (BiPRO®, Le Sueur, MN).

3.2.3. Blueberry puree preparation and characterization

Blueberries from each cultivar were thawed at 4°C overnight then mashed with a food processor for 15 min at speed 6 (Thermomix TM31, Vorwerk, Germany) to obtain a puree. Then, for each cultivar, half of the puree was heated at 60°C for 1 h directly in the same food processor, under gentle stirring (speed 3), then pasteurized at 90-95°C for 5 min, and finally cooled at 20°C by transferring the puree in an ice bath. This puree was referred as the "heated" puree. The "non-heated" puree was obtained with the other half of the puree, stirred at the same speed, in the same food processor, and for the same total time as the heated puree, but at 4°C to prevent enzymatic activity. At the end of both treatments (heated or not), the purees were aliquoted, frozen and stored at -30°C.

Moisture content of the purees was determined by drying samples (3 g) at 102°C for 24 h in an air oven. The alcohol-insoluble residue (AIR) was extracted from purees as follows: puree sample (10 g) was mixed with 95% EtOH (30 mL) for 30 min then centrifuged (6,000 g for 10 min). The pellet was washed thrice with 75% EtOH (20 mL) then once with acetone (20 mL). Pellet was transferred in aluminum dishes and dried overnight at 37°C in an air oven. The AIR was then ground using a mortar and pestle then used for total pectin content determination. The total pectin content was estimated as galacturonic acid content (GalA) by colorimetric assay with 3-phenylphenol reagent (Blumenkrantz and Asboe-Hansen 1973), after acid hydrolysis of the AIR (Melton and Smith 2001a). The degree of methylation (DM) of pectin in AIR was determined by headspace GC-MS after saponification of AIR as described by Chevalier et al. (2017a). The results were expressed as the molar ratio of methanol to GalA (%). Puree samples were freeze-dried to determine protein content by the Dumas method (IDF standards 185:2002) ($N \times 6.25$) using a LECO FP-528 (LECO Corporation, Saint Joseph, MI) and total phenolic content by Folin-Ciocalteu method as described by Chevalier et al. (2017a). Phenolic compounds will be referred as polyphenols for the rest of this article. The composition of these initial purees is presented in **Table 3-1**.

Table 3-1. Moisture, protein, pectin, and polyphenol contents (g/100 g dry weight), and pectin degree of methylation of the initial purees

Purees	Moisture	Protein	GalA ¹	Polyphenols ²	DM (%)
PaNH	88.2 ± 0.1	3.4 ± 0.0	2.4 ± 0.3	1.5 ± 0.04	54 ± 5
PaH	88.2 ± 0.1	3.4 ± 0.1	2.3 ± 0.2	1.7 ± 0.01	73 ± 1
PoNH	89.4 ± 0.2	5.2 ± 0.3	3.3 ± 0.6	1.8 ± 0.02	59 ± 5
PoH	89.2 ± 0.1	5.1 ± 0.0	3.1 ± 0.4	1.7 ± 0.02	72 ± 5

Mean value ± standard deviation. Pa: Patriot. Po: Polaris. NH: non-heated. H: heated. DM: degree of methylation. ¹Galacturonic acid from AIR, as an estimate of pectin content. ²Total phenolic compounds, as gallic acid equivalent.

3.2.4. WPI-blueberry mixture preparation and analysis

Aliquots from blueberry purees were thawed at 4°C overnight. The pH of the puree was adjusted with the addition of droplets of appropriate solutions of HCl and NaOH to reach pH 3.5 (corresponding to the mean pH of blueberry) or 6.5, in order to be in associative or dissociative conditions, respectively. Then, WPI powder (0, 0.5, or 5%, w/w) was added into the puree and the mixture was stirred at 20°C under moderate magnetic agitation. The WPI concentration of 0.5% was chosen to have a whey protein:pectin ratio of about 1:1, since the total amount of pectin in the blueberry purees was reported to be about 0.5 g/100 g (wet basis) (Chevalier et al. 2017a). The concentration of 5% was used to study the effect of WPI concentration. After 1 h of stirring, the pH of the mixture was re-adjusted at pH 3.5 or 6.5. The total number of HCl or NaOH droplets was counted and if necessary, droplets of water were added to the mixture to equalize. After stirring for 2 h, the pH was again adjusted if necessary, then the moisture content of mixture was determined (3 g samples, at 102°C for 24 h). Mixture (45 g) was weighed into a 50-mL tube, centrifuged (3,000 g for 30 min at 20°C) and the soluble phase (supernatant) was further analyzed (section 3.2.4.1). The rest of the mixture was used for viscosity and firmness measurements (section 3.2.4.2).

3.2.4.1. Soluble pectin, whey proteins, and polyphenols

To determine the pectin content in the supernatant, the alcohol-insoluble residue (AIR) was first extracted from the supernatant as described in section 3.2.3, except for the last acetone wash which was replaced by a dilution of the pellet in 10 mL of distilled water. The pectin content in this diluted AIR was estimated as galacturonic acid content (GalA) by colorimetric assay with 3-phenylphenol reagent (Blumenkrantz and Asboe-Hansen 1973).

The protein amount in the supernatant was measured by the Dumas method (IDF standards 185:2002) ($N \times 6.38$) with a LECO FP-528 (LECO Corporation, Saint Joseph, MI). The amount of soluble whey proteins (in the supernatant) was calculated by subtracting the amount of soluble blueberry proteins measured in the mixtures without WPI addition. The polyphenol content in the supernatant was determined by the Folin-Ciocalteu method as previously described for the initial puree (section 3.2.3), except that no extraction was carried out, only a dilution of the supernatant (1:20 with distilled water) was performed. Absorbance of the supernatant was measured at 765 nm against a standard curve of gallic acid. Interference with proteins was removed by subtracting the absorbance of aqueous solutions of WPI corresponding to the measured protein content in the supernatant.

In order to present pectin, whey protein, and polyphenol solubility respectively, all results were expressed in percentage of soluble pectin, whey proteins, and polyphenols (amounts in the supernatant) relative to their respective contents of total pectin, whey proteins, and polyphenols (amounts in the mixture before centrifugation), on dry weight. The amounts in the mixture before centrifugation were calculated using the pectin and polyphenol contents of the initial puree (determined in section 3.2.3) and the protein content of WPI (also determined by Dumas method).

3.2.4.2. Viscosity and consistency measurements

Mixture viscosity (sample of 17 mL) was measured at 20°C using a rheometer (R/S+, Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA), equipped with coaxial cylindrical geometry (cone and plate at the bottom, angle cone of 120°, bob-cup gap of 1.06 mm). A controlled shear rate of 45 s⁻¹ was applied for 2 min: 1 min for pre-shear + 1 min for apparent viscosity record. The results corresponded to the average of the 20 points recorded during the second minute. The shear rate of 45 s⁻¹ was chosen to represent the shear rate range (40-50 s⁻¹) of food processed in the mouth (Wood and Goff 1973).

Mixture consistency was determined on samples (30 mL) allowed to stand overnight at 20°C in 50-mL beakers (diameter of 40 mm). A penetrometry test using a texture analyzer (TA-XT2, Texture Technologies Corp, Scarsdale, NY) equipped with a 5-kg load cell was performed at a speed of 2 mm.s⁻¹ with a 12-mm stainless steel cylindrical probe. Firmness was measured as the maximum load recorded during penetration of 15-mm.

3.2.5. Smoothie preparation and analysis

Three smoothie formulations were prepared with varying WPI concentration, in order to study the effect of protein addition and concentration on the stability of the beverage: S0, S0.5, S5 (0, 0.5, and 5% of WPI respectively). The description of the 3 formulations is presented in **Annex 2-1**. Firstly, raw blueberry puree was obtained by mixing the thawed fruits (50:50 w/w mix of Patriot and Polaris cultivars) with a food processor for 15 min at speed 6 (Thermomix TM31, Vorwerk, Germany). WPI (0.5 and 5%) was gradually added into the puree under agitation and then the mixture was stirred at speed 3 for 2 h at room temperature in order to disperse proteins in the purees and favor their solubilization. Blueberry puree without added WPI was also stirred for 2 h to obtain a smoothie without WPI (S0). After stirring for 2 h, the purees with WPI were acidified to the pH value of the puree without WPI (pH 3.2-3.3) using a 50% citric acid solution. Then apple juice was added and mixed until homogenization. The amount of apple juice was adjusted to match the amount of citric acid solution added. Smoothies were then pasteurized using a tubular heat exchanger (UHT/HTST Lab-25 HV, MicroThermic Inc., Raleigh, NC) at 72°C for 20 s, cooled at 20°C and immediately filled up into sterile 50-mL graduated plastic tubes. All smoothie samples were stored at 4°C until analyses. The mean particle size of smoothies was analyzed one day after the manufacturing (day 1), while viscosity, and visual stability were measured at day 1, 7, 14, 21, and 28. The stability was followed for 48 h after the manufacturing using the Turbiscan technique and the global Turbiscan stability index (TSI) (described below).

Global composition (moisture, protein, ash, lipid, and total fiber) of the smoothies was determined as mentioned by Chevalier et al. (2017a). Carbohydrate content was calculated by difference (total solids - (protein + lipid + ash + fiber)). The determination of energy value was performed using the following coefficients: carbohydrate = 4.0 kcal/g, lipid = 9.0 kcal/g, protein = 4.0 kcal/g, and fiber = 2.0 kcal/g. The pH of the smoothies was measured using a pH-meter (Symphony SB20, VWR, Radnor, PA).

The mean particle size (D[4,3]) of the smoothies was determined the day after their manufacturing, using a laser diffraction analyzer (Master Sizer 3000, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Samples were diluted in distilled water acidified to pH 3.5 with HCl to avoid complex dissociation due to pH change. Measurements were analyzed in triplicate, while stirring at 1,500 rpm with an obscuration of 10-17%.

The viscosity of the smoothies during the storage time was measured in duplicate at 4°C

using a rheometer (ARES G2, TA Instruments, New Castle, DE), equipped with a four-blade vane geometry (diameter 27.637 mm, height 41.507 mm, gap 5.849 mm) under steady state measurements. A pre-shear of 50 s^{-1} was applied for 1 min then the shear rate was increased from 1 to 200 s^{-1} . The results showed the viscosity values recorded at 45 s^{-1} , as explained in the section **3.2.4.2**.

The stability of the smoothies was followed by visual observation of the resting smoothie samples in the 50-mL tubes at 4°C . The development of a phase separation with the apparition of a clear serum layer was recorded as an indication of instability. However, the phase was generally observed in the lower part of the tubes and could not be collected. Stability was also followed over time using a Turbiscan Lab apparatus (Formulation, L'Union, France). Smoothies were manually shaken before being transferred ($\approx 22 \text{ mL}$) into specific glass cylindrical tubes. Tubes were closed and scanned every 15 min for 6 h, and then every hour until 48 h. As the Turbiscan Lab could not cool the samples, analyses were performed at room temperature. The Turbiscan technique is a tool for monitoring the destabilization kinetic of a system and assessing the extent of eventual phase separation. The global Turbiscan total stability index (TSI) is a relative number without unit that allows for measurement and comparison of the relative stability of different samples based from the variations in the rate of backscattering/transmission intensity of the sample over time (Kaombe et al. 2013). Calculation of the TSI values was done using the software TurbiSoft.

3.2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with SAS® 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

For the study of interactions, three repetitions of WPI-blueberry mixtures were prepared for each condition (puree heat treatment, pH, and WPI concentration). Viscosity and firmness measurements were performed in replicate for each mixture repetition. Analysis of variance (ANOVA) using the GLM procedure was executed. Two-way ANOVAs were used according to a factorial experiment $2 \times 2 \times 2 \times 3$, considering the effect of cultivar, puree heat treatment, pH, and WPI concentration. For significant interactions ($P \leq 0.01$), means were compared with the Tukey's multiple comparisons test.

For the study of smoothies, each formulation was repeated three times. Two-way ANOVAs were performed using the mixed procedure and according to a factorial experiment 3×2 , considering the effect of WPI concentration and storage time (repeated measure). For

significant effect(s) or interaction ($P \leq 0.05$), means were compared with the Tukey's multiple comparisons test.

3.3. Results and discussion

3.3.1. Pectin and whey protein solubility

Figures 3-1A and 3-1B show the pectin and whey protein solubility respectively. For whey protein and pectin solubility, means of the two cultivars were pooled and presented depending on puree heat treatment, pH of the mixtures, and WPI concentration (triple interaction significant ($P \leq 0.01$)). The triple interaction between cultivar, puree heat treatment, and pH was also significant for pectin solubility, but was not presented since the behavior of the two cultivars showed the same trend: the effect of cultivars was only due to their different pectin contents (Chevalier et al. 2017a).

3.3.1.1. Behavior in the mixtures without WPI addition

For both non-heated and heated purees without WPI addition (0%), pectin solubility varied significantly depending on the pH of the mixtures and the puree heat treatment (**Fig. 3-1A**). Pectin was less soluble at pH 3.5 (6%) than at pH 6.5 (24%). Some pectin depolymerization by β -elimination could occur during the 2 hours at pH 6.5, contributing in part to its increased solubility at this pH (Albersheim et al. 1960). In addition, at pH 3.5, pectin may strongly interact with other blueberry components to coprecipitate in the pellet, limiting its solubility. These other components were not blueberry proteins whose solubility remained constant for both pH values, at about 45% of total blueberry proteins (data not shown). However, polysaccharides, especially pectin, may interact with polyphenols depending on the pH (Renard et al. 2017; Lin et al. 2016), which could explain the lower pectin solubility at more acidic pH. Pectin-polyphenol interactions will be discussed in the section **3.3.2**. Regarding the puree heat treatment (performed prior to pH adjustment and WPI addition), it contributed to increase pectin solubility. The amount of soluble pectin was significantly increased compared to the non-heated purees, due to the thermosolubilization of pectin. Indeed, elevated temperatures may 1) change the interactions between pectin and cell wall components promoting pectin dissociation and leaching, and 2) promote pectin depolymerization by β -elimination and acid hydrolysis, releasing some smaller soluble pectin molecules from the cell wall network (Christiaens et al. 2012a; Colin-Henrion et al. 2009; Sila et al. 2009b).

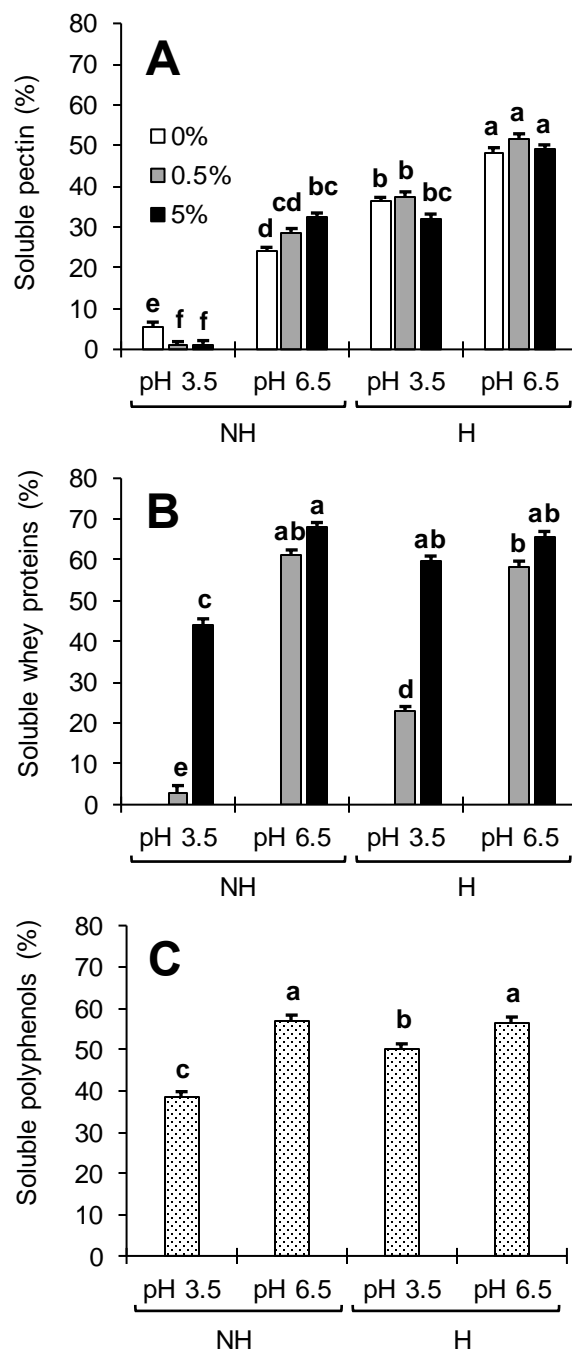


Figure 3-1. Pectin (A), whey protein (B), and polyphenol (C) solubility in the WPI-blueberry mixtures

Means (\pm standard error). Bars with the same letter were not significantly different according to Tukey's test ($\alpha = 0.01$). 0%: mixture without WPI. 0.5%: mixture with 0.5% of WPI. 5%: mixture with 5% of WPI. NH: non-heated puree. H: heated puree.

3.3.1.2. Behavior in the mixtures with WPI addition

When 0.5% of WPI was added to the non-heated purees, the pH of the mixtures had a significant effect on pectin and whey protein solubility. For non-heated purees, at pH 3.5, the pectin solubility with 0.5% of WPI significantly decreased compared to 0% of WPI (**Fig. 3-1A**). At pH 6.5, such a decrease was not observed, meaning that the addition of WPI reduced the pectin solubility only at acidic pH. The whey protein solubility behavior showed a similar trend (**Fig. 3-1B**). For non-heated purees, whey proteins added in the mixtures with 0.5% of WPI had a very low solubility at pH 3.5 (3%), whereas at pH 6.5 about 60% of whey proteins were soluble. In aqueous solution, under the same centrifugation conditions, whey proteins from WPI are highly soluble at both pH 3.5 and 6.5 (> 95%, data not shown) and do not form aggregates (Ju and Kilara 1998). The global lower solubility of whey proteins in blueberry puree, as compared to aqueous solution, might be explained by a difference in ionic strengths of the solutions, and the presence of minerals, salts, other macromolecules, etc. that could modulate protein conformation, interactions, and hydration properties. However, a remarkable result is the low solubility of whey proteins in the mixtures at pH 3.5 compared to pH 6.5. This concurrent pH-dependent behavior for both pectin and whey proteins is consistent with the formation of complexes between these two macromolecules bearing oppositely charged functional groups (De Vries and Cohen Stuart 2006). Indeed, at pH 3.5, which is higher than the apparent pKa of pectin (pH \approx 2.9-3.3 (Breinholt 2010)) but at the same time lower than the IEP of whey proteins (pH \approx 5.0-5.2 (Edwards et al. 2008; Pritchard and Kailasapathy 2011; Ju and Kilara 1998)). Under these pH conditions, pectin was negatively charged whereas proteins carried positive charges (Jones et al. 2010b; Lutz et al. 2009b), which resulted in electrostatic associative interactions between these two biopolymers and in the formation of protein-pectin complexes (Tolstoguzov 1997; Thongkaew et al. 2015). These complexes sedimented in the pellet during the centrifugation, resulting in a loss of whey protein and pectin solubility at pH 3.5. At pH 6.5, both whey proteins and pectin were globally negatively charged, which prevented protein-pectin complexation and loss of solubility. Some authors reported that complexes can be formed onto some positive patches of proteins above IEP (Schmitt et al. 1998; Doublier et al. 2000; Park et al. 1992; Grymonpré et al. 2001; Lutz et al. 2009a). However, this complexation occurred at pH values closer to the IEP of proteins (pH \approx 5.5-6.0), meaning that, in the present study, the protein-pectin complexation at pH 6.5 was likely minor.

When more WPI was added (5%) in non-heated purees, pectin and whey protein solubility were again lower at pH 3.5 than at pH 6.5, meaning that protein-pectin complexes were formed at pH 3.5. However, at this pH, the pectin solubility was similar to the value as obtained when 0.5% of WPI was added (**Fig. 3-1A**). This observation may suggest that it was not possible for more proteins to complex with pectin. This is in agreement with the higher amount of soluble whey proteins at pH 3.5, at 44% for 5% of added WPI compared to 3% for 0.5% of added WPI (**Fig. 3-1B**). Assuming that all the pectin and whey protein solubility difference between pH 3.5 and 6.5 resulted from a whey protein-pectin complexation, the results suggest that for the mixtures with 0.5% of WPI, 94% of total whey proteins were complexed with about 80% of soluble pectin. This ratio corresponds to 21 g of whey proteins that complexed with 1 g of pectin. Reported optimal mass ratio for protein:pectin to form complexes is between 2:1 and 5:1 (Bédié et al. 2008; Jones et al. 2009; Jones et al. 2010b; Girard et al. 2002; Girard et al. 2004), with higher ratios resulting in over-aggregation of proteins onto the complexes and a protein self-aggregation. In the mixtures with 5% of WPI, only 40% of total whey proteins were complexed, which corresponds to 102 g of whey proteins complexed with 1 g of pectin. It was likely that a part of the decrease in protein solubility resulted from protein-protein interactions and over-aggregation onto the complexes. It was also possible that whey proteins interacted and coprecipitated with other blueberry constituents such as polyphenols (discussed in section **3.3.2**). Besides, for both blueberry cultivars, for similar conditions, such as a given pH, either 3.5 or 6.5, and WPI concentration, either 0.5 or 5%, similar amounts of whey proteins sedimented (data not shown). Although the Polaris cultivar is higher in total pectin than the Patriot cultivar (**Table 3-1**), the two cultivars had the same amount (in weight) of soluble pectin in mixtures without WPI (data not shown). These results suggest that some of Polaris pectin could have precipitated with some Polaris proteins, also higher in this cultivar. In addition, the higher amount of total fiber of the Polaris cultivar (Chevalier et al. 2017a) might have entrapped and retained more pectin. All these observations highlight that the amount of soluble pectin and the presence of other fruit constituents are important factors governing the protein complexation yield.

In addition to the pH of the mixtures, the puree heat treatment (prior to WPI addition) had also a significant effect on pectin and whey protein solubility. Heating the puree contributed to increase the amount of soluble pectin in the mixture without added proteins, as explained in the previous section (**3.3.1.1**) and also in the mixtures with added proteins. Indeed, for both pH values and for heated purees, pectin solubility remained similar at both

0.5% and 5% of WPI compared to the heated puree with 0% of WPI (**Fig. 3-1A**). Moreover, whey proteins were more soluble for heated purees than non-heated purees at pH 3.5 for both 0.5% and 5% of WPI respectively (**Fig. 3-1B**). Therefore, when purees were heated before protein addition, less sedimentable (insoluble) protein-pectin complexes were formed compared to mixtures with non-heated purees. A few insoluble protein-pectin complexes could be formed at pH 3.5 for heated purees with 0.5% of WPI since only 23% of whey proteins were soluble (**Fig. 3-1B**). However, less pectin might have been involved in complex formation and thus no pectin solubility decrease could be detected. Therefore, although more pectin was solubilized after puree heat treatment (thermosolubilization), this soluble pectin seemed to interact to a lesser extent with proteins. The lower affinity of the thermosolubilized pectin toward proteins might support this behavior. Indeed, the thermosolubilization of pectin was shown to preferably occur on linear and high-methylated pectin (Heutink 1986; Ouden and Vliet 2002; Massiot et al. 1996; Christiaens et al. 2012a; Sila et al. 2009b). The high-methylated pectin contained less available free carboxylic groups able to interact with proteins and is saturated with proteins faster than low-methylated pectin (Girard et al. 2002). The characterization of the initial purees (**Table 3-1**) confirmed these observations since the pectin DM of heated purees was higher (72%) than that of non-heated purees (56%). This DM increase was quite surprising because Chevalier et al. (2017a) showed that a low-temperature blanching (60°C/1 h) decreased the pectin DM of blueberry purees (heated in an Erlenmeyer flask in a water bath using a rotary movement). Indeed, the specific temperature of 60°C usually promotes the pectin methyl-esterase activity that decreases the pectin DM (Christiaens et al. 2014). However, in the present study, as larger amounts of puree were required, the heating was applied directly in the food processor (Thermomix) equipped with sharp blades for the stirring. This continuous and hot shearing, followed by a longer cooling time (at least 30 min), may have promoted cell wall disruption and thermosolubilization of pectin to a greater extent than PME activity.

Another explanation to the higher solubility of pectin and whey proteins in heated purees is that the protein-pectin complexes formed resulted in less sedimentable particles that remained in the supernatant. Indeed, it was found that high-methylated pectin forms more stable complexes with soy proteins than low-methylated pectin (Lam et al. 2007). This result was also reported for casein dispersions (Pereyra et al. 1997). As higher methylated pectin contains a lesser amount of electrostatic interactive sites, fewer protein molecules can bind, leading to more stable complexes. In addition, some portion of the high-

methylated pectin chains may remain free and available for solvent interactions, forming dispersions resistant to centrifugal sedimentation (Pereyra et al. 1997). Furthermore, as the soluble pectin concentration was largely increased with the puree heat treatment, some unbound pectin remained in solution, probably increasing the serum viscosity and thus preventing complex precipitation (Pereyra et al. 1997). In the present study, the viscosity of the supernatants (serum) was not measured, but the viscosity of the mixtures was characterized (section 3.3.3). Further assays and investigations could be conducted to study the formation of protein-pectin soluble complexes. Measurement of the particle size in the supernatants was performed using a Zetasizer Nano-ZS but samples were too polydisperse to provide good quality data (data not shown). However, only the puree heat treatment seemed to have an effect on the average diameter size that tended to increase for all heated purees, while the WPI concentration appeared to have no effect. Other analyses could be performed, such as increasing the centrifugation force, determining the turbidity of supernatants, or increasing the ionic strength to destabilize and precipitate the potential soluble complexes, but these tests were not performed in the present study. Nevertheless, the qualitative visual observation of some mixture samples let to rest at 20°C overnight was coherent with the solubility measurements and the complex formation (data not shown). Indeed, the non-heated purees with added WPI showed at pH 3.5 a phase separation, with an upper layer of clear serum of about 5 mL compared to a total puree volume of 30 mL, whereas no phase separation was observed at pH 6.5. The phase separation can be a consequence of the formation of protein-polysaccharide complexes which are present in the lower phase (Tolstoguzov 1997). For all heated purees, no phase separation was observed, confirming that few or no insoluble complexes were formed.

3.3.2. Polyphenol solubility

Figure 3-1C presents the solubility of polyphenols as affected by the pH of the mixtures and the puree heat treatment. Cultivar had a significant effect, regardless of the puree treatment and pH. Indeed, Polaris cultivar had slightly less soluble polyphenols than Patriot cultivar (data not shown). The cultivar effect was not presented since it was certainly only due to the higher fiber content of the Polaris cultivar (Chevalier et al. 2017a) that entrapped and retained more polyphenols (Padayachee et al. 2015). In the context of the present study, this section focuses on the interaction between the puree heat treatment and the pH which was significant ($P \leq 0.01$).

For both non-heated and heated purees, a higher polyphenol solubility was observed at pH 6.5 compared to pH 3.5. A similar pH-dependent behavior was observed for pectin, with lower solubility at pH 3.5 than at pH 6.5 regardless of WPI addition (**Fig. 3-1A**), as explained in the section **3.3.1.1**. This common lower solubility at pH 3.5 supported a pectin interaction with polyphenols, resulting in their respective decrease in solubility. It is known that polyphenols may interact with polysaccharides (Renard et al. 2017), especially pectin (Le Bourvellec et al. 2005). Renard et al. (2001) and Le Bourvellec et al. (2004) found that proanthocyanidins are the kind of polyphenols that are the most bound to cell wall polysaccharides, by a combination of hydrogen bonds and hydrophobic interactions. However, no significant effect of pH in the range of 2.5 to 7 on the complex formation between apple cell walls and procyanidins was reported by Renard et al. (2001) who, unlike the present study, have worked on isolated cell wall material and polyphenols, whose conformation and structure might have been modified during the extraction procedure. Such characteristics can affect the extent of interactions between polyphenols and cell walls (Renard et al. 2017). Furthermore, in blueberry puree, other components can influence these interactions. For instance, minerals can modify the ionic strength, whereas vitamins and sugars may affect the hydrophobic interactions or hydrogen bonds. Lin et al. (2016) pointed out some ionic interactions between anthocyanins and blueberry pectin, depending on pH. Indeed, at acidic pH, anthocyanins present a flavylium cation form able to interact with the free carboxyl groups of pectin (Lin et al. 2016). Further investigations on the impact of pH and other environmental conditions on blueberry components would contribute to better understand the pectin-polyphenol interactions in a real fruit matrix.

For heated purees, the polyphenol solubility was higher at pH 3.5 compared to non-heated purees (**Fig. 3-1C**). This result suggests that lower amounts of insoluble complexes between pectin and polyphenols were formed in heated purees or that the interactions were weakened, increasing the polyphenol solubility. Indeed, high temperatures weaken hydrogen bonds and it has been reported that they decrease association between apple cell walls and procyanidins (Le Bourvellec et al. 2004). Moreover, heating may have modified the conformation and structure of pectin and/or polyphenols, which can result in weaker interactions (Renard et al. 2017). For example, pectin and polyphenols might have been partially depolymerized, especially since blueberry puree is an acidic matrix. It was observed that decreasing the size of pectin polymer reduces the stability of pectin-polyphenol complexes (Ben-Shalom et al. 1984). In addition, decreasing the molecular

weight of proanthocyanidins may reduce their apparent affinity for apple cell wall material (Le Bourvellec and Renard 2005; Renard et al. 2017). Besides, the solubilized pectin after heat treatment can develop a gel-like network capturing polyphenols and preventing their self-precipitation, stabilizing them in the supernatant (Le Bourvellec et al. 2005; Le Bourvellec and Renard 2012).

Interestingly, for each pH and each puree treatment, the addition of WPI had no impact on the polyphenol solubility since the polyphenol solubility was similar for mixtures with 0%, 0.5%, and 5% of WPI (data not shown). This means that there was no or few whey protein-polyphenol interactions. These limited interactions could be explained by several reasons. Firstly, protein interacts mostly with condensed tannins (proanthocyanidins) (Le Bourvellec and Renard 2012; Naczki et al. 2006). The Folin assay used in this study allows to measure the total phenolic compounds and might not be able to detect a small decrease associated with one type of polyphenols. Moreover, the proanthocyanidins have also been shown to be the polyphenol type the most strongly bound and entrapped with the cell wall polysaccharides (Guyot et al. 2003; Le Bourvellec et al. 2011), reducing their availability to interact with added whey proteins. It is therefore possible that all the polyphenols able to bind with proteins were already complexed with blueberry polysaccharides. Further works on specific extraction and measurement of total and soluble proanthocyanidins could complete our results. Besides, some authors showed that the proteins strongly associated with polyphenols are rich in proline, with open and flexible structure, as gelatin (Le Bourvellec and Renard 2012; Naczki et al. 2006). Whey proteins have a globular and compact structure with a low proline content (Pritchard and Kailasapathy 2011), which may hinder hydrogen bonds and hydrophobic interactions with polyphenols. On the other hand, it is possible that some whey protein-polyphenol interactions occur but form stable and non-sedimentable complexes. Indeed, some authors reported that an excess of proteins may prevent polyphenol precipitation with proteins: at low polyphenol:protein ratio, several polyphenols can bind to the same protein molecules, resulting in soluble complexes (Le Bourvellec and Renard 2012; Naczki et al. 1996).

3.3.3. Rheological and textural properties of the WPI-blueberry mixtures

In order to study the impact of whey protein-blueberry pectin interactions on the mixture functionality, apparent viscosity and consistency (firmness) were measured (**Fig. 3-2A** and **3-2B**). Means were pooled by cultivar and presented depending on puree heat treatment, pH of the mixtures, and WPI concentration (significant triple interaction ($P \leq 0.01$)).

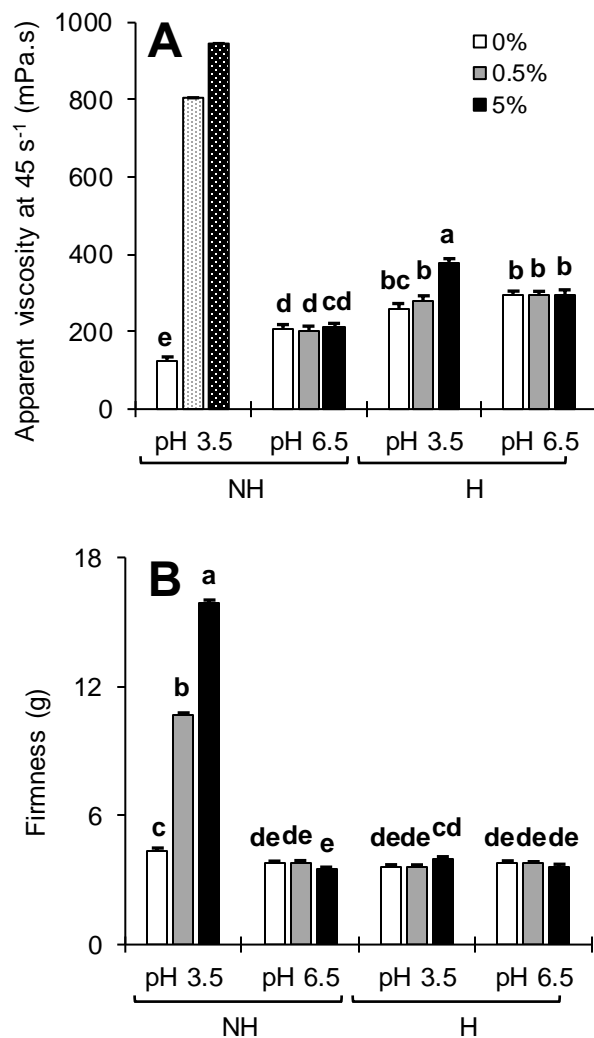


Figure 3-2. Viscosity (A) and firmness (B) of the WPI-blueberry mixtures

Means (\pm standard error). Bars with the same letter were not significantly different according to Tukey's test ($\alpha = 0.01$). Dotted bars (▨ and ▩) were means obtained with the Patriot cultivar only (not considered in the Tukey's test). 0%: mixture without WPI. 0.5%: mixture with 0.5% of WPI. 5%: mixture with 5% of WPI. NH: non-heated puree. H: heated puree.

For Polaris non-heated purees, aggregates of pulp appeared when purees were thawed overnight. At pH 3.5, after the addition of 0.5 and 5% of WPI, aggregates were larger and not suitable for the viscosity measurement performed with a cone and plate geometry. Therefore, the corresponding data were not used for statistical analysis. Only the data obtained for Patriot cultivar in these conditions (**Fig. 3-2A**, NT, pH 3.5, 0.5 and 5%) were presented but not considered in the Tukey's test. However, in a qualitative way, it could be

affirmed that the WPI addition increased the viscosity of the non-heated purees at pH 3.5. This observation was supported by the results of consistency showing a higher firmness for the non-heated purees at pH 3.5 with 0.5 and 5% of WPI (**Fig. 3-2B**). Similarly, the addition of soy proteins and bovine serum albumin was shown to increase the viscosity and consistency of tomato products (for pH values of 4.2-4.8) (Takada and Nelson 1983; Thakur et al. 1996; Tiziani and Vodovotz 2005). The increase observed in the present study at pH 3.5 was not only due to protein addition, but rather to protein-pectin complex formation. At pH 6.5, where no or few complexes were formed, the viscosity and consistency did not increase, despite the WPI addition. This increase was also observed for heated purees at pH 3.5, but to a very smaller extent and only for the mixtures with 5% of WPI. This result was in agreement with the minor protein-pectin insoluble complexes found previously in the heated purees (section **3.3.1.2**).

In the literature, both synergistic and antagonistic effects on the viscosity of protein-polysaccharide mixed systems have been reported, depending on the different concentration regimes, the type of biopolymers, and the food environment (reviewed by Turgeon and Laneuville (2009) and Schmitt and Turgeon (2011)). The strength of protein-polysaccharide interactions and the protein:polysaccharide ratio play a major role on viscosity, especially by affecting the complex size. Bertrand (2008) found that, at mass ratios $\leq 16:1$ (whey protein:low-methylated pectin), formation of protein-pectin complexes and a higher molecular volume controlled the rheological behavior by increasing the viscosity. Higher ratios ($\geq 20:1$) promoted protein-protein interactions at the expense of protein-polysaccharide interactions, leading to a flow behavior similar to protein alone. In this study, at pH 3.5 in non-heated purees, the mass ratios of added whey proteins to soluble pectin (measured as galacturonic acid in the supernatant at 0% of WPI) were estimated at about 25:1 and 190:1 at 0.5 and 5% of WPI respectively. These ratios could not be directly compared to the one established by Bertrand (2008) because the present system was not a diluted aqueous solution, but a fruit puree, with a different ionic strength, and the presence of many other components that may have interacted. To our knowledge, no studies have presented the impact of protein-polysaccharide complexes on the viscosity of real and complex food systems as a fruit puree. Nevertheless, the increase of viscosity observed in the presence of WPI at pH 3.5 likely resulted from both protein-pectin complexes, protein-protein aggregates, and/or over-aggregation of proteins onto the complexes (Laneuville et al. 2000). All these structures may have contributed to increase the molecular volume and size of particles, resulting in increased viscosity.

On the other hand, regardless of the WPI addition, the viscosity of heated purees was higher than that of non-heated purees, despite a small mean particle size of the former (data not shown). This higher viscosity was likely related to the increase in soluble pectin amount caused by the heating treatment, as discussed previously (section 3.3.1). Several studies on fruit or vegetable suspensions highlighted that an increase in the soluble pectin amount due to thermal treatments leads to an increase in viscosity of the serum that contributes to increase the consistency and viscosity of the whole suspensions (Osorio et al. 2008; Castro et al. 2013; 2012; Moelants et al. 2013; Bengtsson et al. 2011; Espinosa-Muñoz et al. 2013). Espinosa-Muñoz et al. (2013) reported that the consistency of apple purees can be increased by addition of pectin that plays a lubricating role and thickens the serum. In the present study, the contribution of the soluble pectin to increase the viscosity was also observed in non-heated purees at pH 6.5. Indeed, these purees were more viscous since they contained more soluble pectin than purees at pH 3.5.

The stabilization of whey proteins and the viscosity monitoring appeared to be improved due to the solubilization of pectin after a heat treatment of the purees. However, in the food industry, it is more convenient to apply heat treatments (ex: such as pasteurization) at the end of the food process to ensure microbiological quality and shelf stability.

3.3.4. Case study: Application of WPI-blueberry mixture in the smoothies

As an example of the convenient application for the WPI-blueberry mixture, smoothies were prepared in conditions promoting protein-pectin complexation, i.e. with non-heated purees at acidic pH. Only the WPI concentration varied. As no major effect of the cultivar was observed in the first part of this study, a mix 50:50 (w/w) of both Patriot and Polaris cultivar was used in the formulation. The global composition of the three smoothies was provided in **Annex 2-2**. All smoothies were considered, based on Canadian standards, as "high in fiber" since one portion of 250 mL of smoothie (\approx 250 g) provided at least 4 g of fiber (CFIA 2016a). Besides, one portion of the smoothie with 5% of WPI contained 10 g of protein, which is the usual content of protein-rich beverages found on the market.

3.3.4.1. Viscosity and particle size of the smoothies

The viscosity of the smoothies was stable over storage time (**Fig. 3-3**). However, the addition of WPI decreased significantly the viscosity compared to the smoothie without WPI (S0). Indeed, S0.5 and S5 had a mean viscosity of 162 ± 4 and 204 ± 5 mPa.s, respectively, significantly smaller than S0 (258 ± 6 mPa.s). This viscosity decrease can be

related to the mean particle size ($D[4,3]$) of the smoothies (**Fig. 3-3, Annex 2-3**). The mean particle size of S0.5 and S5 were 448 ± 44 and $367 \pm 22 \mu\text{m}$, respectively, significantly smaller than that of S0 ($682 \pm 47 \mu\text{m}$). The higher viscosity measured in S5 compared to S0.5 was attributed to the higher total solid content due to the higher WPI amount (11.5% in S0.5 vs. 14.8% in S5, data not shown). This decrease in viscosity upon the addition of WPI was very promising since the protein fortification of beverages is usually associated with an increase of consistency/viscosity, which may reduce the beverage palatability and convenience, as well as the appreciation by consumers (Deshpande et al. 2005; Folkenberg et al. 1999).

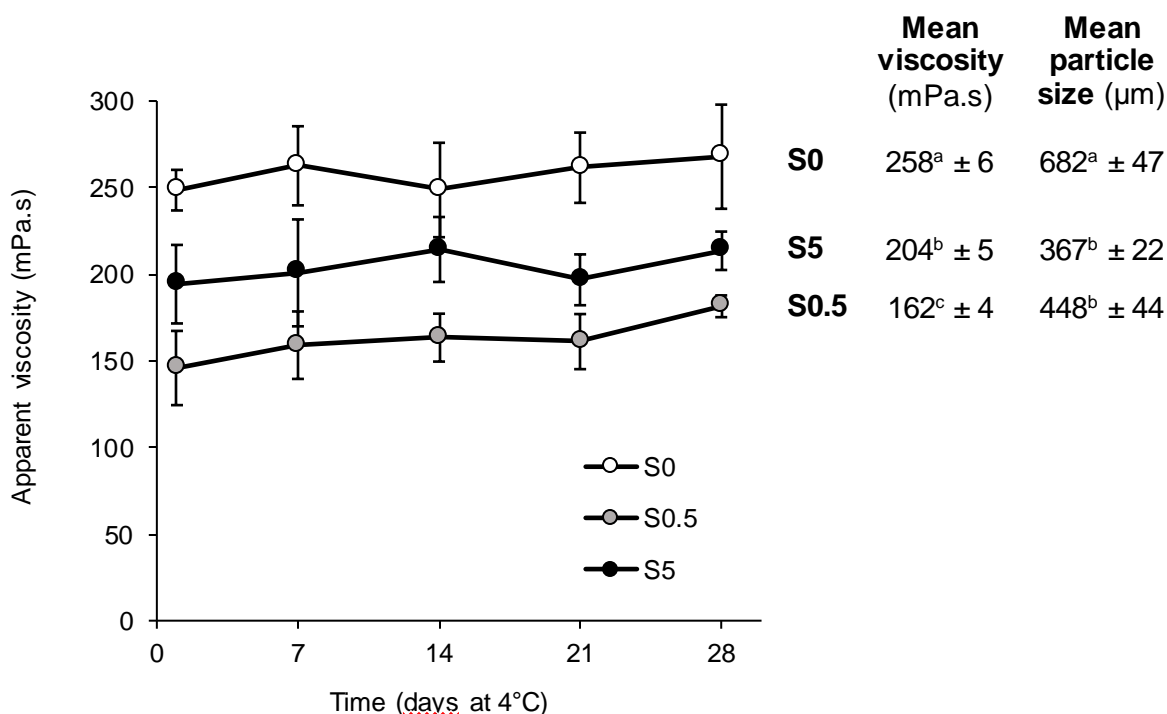


Figure 3-3. Apparent viscosity of the smoothies at 45 s^{-1} over storage time and mean particle size depending on the WPI concentration

Means (\pm standard deviation). Means with the same letter were not significantly different according to Tukey's test ($\alpha = 0.05$). S0: smoothie without WPI. S0.5: smoothie with 0.5% of WPI. S5: smoothie with 5% of WPI.

The first part of this study showed that the addition of WPI in a non-heated puree at acidic pH formed whey protein-pectin complexes that contributed to increase the viscosity. In the preparation of smoothies, WPI was also added to a non-heated puree, at a pH of about 3.3, suggesting that the formation of whey protein-pectin complexes certainly occurred. However, the major difference with the first part was the final smoothie pasteurization

(72°C/20 s). This heating step may have enhanced and/or strengthened the protein-pectin interactions, forming compact and smaller complexes, which contributed to reduce the mean particle size and the viscosity (Laneuville et al. 2000; Tolstoguzov 1996; Gentes et al. 2010; Krzeminski et al. 2014b; Jones et al. 2009; 2010a; Wagoner and Foegeding 2017). The mechanism is still not well understood but could be due to the complex internal restructuring associated to partial protein denaturation and unfolding in response to heat (Gentes et al. 2010; Wagoner and Foegeding 2017). These conformational changes expose charged groups of the protein side chains, thereby maximizing the interactions between protein and pectin and favoring a smaller hydrodynamic size. In addition to the strengthening of complexes and the decrease of mean particle size, pasteurization probably promoted partial pectin solubilization. As proposed in the first part of this study, the higher soluble pectin amount could play a lubricating role (Espinosa-Muñoz et al. 2013) and reduce the contribution of protein-pectin complexes to the viscosity increase.

3.3.4.2. Stability of the smoothies

In addition to having an adequate viscosity, the other challenge in the formulation of protein-rich beverages is the stability over time which may be dependent on the protein addition, precipitation, and aggregation. The smoothie without WPI (S0) showed no visual instability over storage time (28 days) (**Annex 2-4**). For S0.5, a small phase separation appeared after a few days, mostly in the middle or the top of the tubes, and increased over time. For S5, the phase separation began at day 1, in the bottom of the tubes. This separation increased over time, notably during the first two weeks of storage.

The global Turbiscan stability index (TSI) results confirmed this instability, increasing with the WPI concentration. Indeed, S5 had the highest TSI, meaning the higher instability and phase separation, followed by S0.5, whereas S0 kept a low TSI (**Fig. 3-4**).

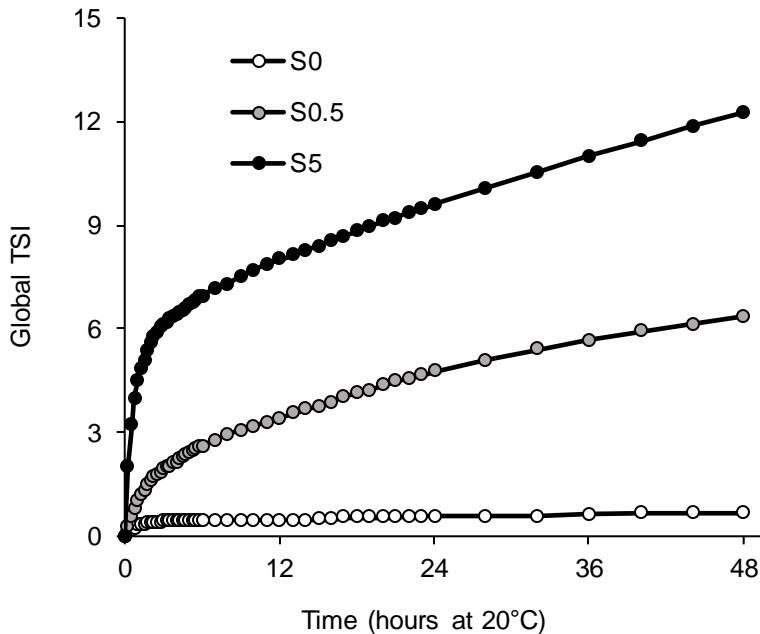


Figure 3-4. Global Turbiscan stability index of the smoothies over time (20°C) depending on the WPI concentration

TSI: Turbiscan stability index. S0: smoothie without WPI. S0.5: smoothie with 0.5% of WPI. S5: smoothie with 5% of WPI.

Further work should be done to enhance the stability of the smoothies with WPI. For instance, it was shown that increasing the heating temperature from 70 to 90°C decreases the size of β -lactoglobulin-pectin particles and protein aggregates in solution due to a faster protein unfolding, enhancing their stability (Jones and McClements 2010). Kazmierski et al. (2003) also obtained a better stability of whey protein-fortified orange juice at 85°C, compared to 65 and 75°C, explained by the formation of soluble aggregates (protein-protein and protein-pectin complexes). The authors proposed that the pectin of orange juice as well as other components such as organic/polyphenols and salt provided an increased protective effect at elevated temperature. Finally, a step of homogenization could be considered. Indeed, Jaramillo et al. (2011) found that the homogenization of a model soy beverage enhanced the solubility of soy protein-pectin complexes, increasing the stability of the beverage. Nevertheless, in the present study, phase separation was eliminated by a gentle shaking of the smoothie. In a view of food development and commercialization, the use of an opaque packaging could be an easy solution.

3.4. Conclusion

This work opened new avenues on the study of protein-polysaccharide interactions, with fruit ingredients as natural sources of polysaccharide, instead of purified molecules. The first part of this study consisted in evaluating the formation of interactions between added whey proteins and components of blueberry purees from two cultivars, in particular pectin. The low solubility of blueberry pectin and whey proteins at acidic pH showed that insoluble protein-pectin complexes were formed in a non-heated puree, mainly by associative interactions. This behavior was similar for both blueberry cultivars and the amount of soluble pectin in blueberry limited the formation of complexes. These complexes contributed to increase the viscosity of the mixture. Although whey proteins did not alter the blueberry polyphenols, it would be interesting to study more thoroughly the effect of some polyphenols, in particular proanthocyanidins, on protein-pectin interactions. The application of a heat treatment on the puree before WPI addition led to high-methylated pectin solubilization that could limit the formation of insoluble aggregates (protein-pectin complexes or protein-protein aggregates) and stabilize the mixture. In the future, this stabilization could be promising to facilitate the incorporation of other types of protein that usually precipitate at acidic pH. Further investigations could provide more information about the possible formation of soluble complexes.

In the second part of this study, the mixture containing protein-pectin complexes was used in a smoothie formulation. The complexation, likely strengthened by the final pasteurization step, contributed to reduce the viscosity of the smoothies, an important parameter to consider in the development of beverage rich in proteins. The partial pectin solubilization due to the elevated temperature upon pasteurization could also play a dominant role in the viscosity monitoring. Although some work should be done to improve the stability of the smoothies with WPI, this study showed that the interactions between whey proteins and pectin play an important role in the food structure and functionality. Protein-pectin complexes in a blueberry puree contribute to form a new functional food ingredient, helping to formulate beverages rich in fiber and protein. An upcoming study will investigate the impact of these interactions in a solid food model, in order to broaden the potential of this functional ingredient over the food engineering and innovation fields.

3.5. Acknowledgements

This project was supported by the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec through the Innov'Action program [grant number: IA113114]. The

authors thank Mara Hannan-Desjardins for her skillful help in smoothie formulation and analyses, and declare no conflict of interest.

Chapitre 4. Utilisation de la purée de bleuets en interaction avec des protéines de lactosérum pour développer des barres riches en protéines

Transition contextuelle

Les travaux présentés dans le chapitre 3 ont mis en évidence la formation de complexes insolubles entre les protéines de lactosérum et la pectine du bleuet à un pH acide similaire à celui du bleuet. Ces complexes se formaient lorsque la purée était non traitée thermiquement. Ils ont permis de produire des boissons riches en fibres et en protéines sans hausse de la viscosité.

La dernière phase du projet est présentée dans le chapitre 4. Elle avait pour but d'aller encore plus loin dans l'utilisation des complexes en tant qu'aide au développement d'aliments fonctionnels et correspond au troisième objectif de ce projet. Cette fois-ci, les complexes étudiés au chapitre précédent ont été incorporés, sous forme lyophilisée, au sein d'un autre aliment : les barres de collation. Dans la littérature, les complexes ont été étudiés et mis en application uniquement à travers des matrices liquides ou semi-liquides comme les boissons ou les yogourts. À notre connaissance, ce type de matrice de nature solide n'a encore jamais été exploré dans le cadre de l'utilisation des complexes. Les barres nutritives sont des collations en forte demande sur le marché. Pourtant, leur enrichissement en protéines, bien que recherché des consommateurs, s'accompagne d'un durcissement des barres au cours du temps, comme décrit dans le chapitre 1 de cette thèse. Cela peut réduire l'appréciation générale des consommateurs. Depuis quelques années, les barres nutritives enrichies en protéines font l'objet de plusieurs recherches visant à mieux comprendre ce phénomène de durcissement et essayant de le limiter *via* l'utilisation de protéines de différentes natures, de différents types d'ingrédients protéiques (isolat, hydrolysate, protéines extrudées, etc.) (Banach et al. 2014; Hogan et al. 2012; Loveday et al. 2010; Lu et al. 2016; McMahon et al. 2009) ou encore *via* l'incorporation d'agents liants ou de stabilisants (sirop de fructose, sorbitol) (McMahon et al. 2009). Ces recherches ont mis en évidence que les propriétés d'hydratation des protéines et leurs

interactions entre elles et avec la matrice jouent un rôle important dans la texture des barres. Le dernier objectif de ce projet visait donc à étudier en quoi la complexation des protéines avec la pectine du bleuet peut influencer la texture des barres riches en fibres et protéines. Les barres modèles ont été préparées avec de la pâte de dattes servant d'agent sucrant et de liant naturel.

Ce chapitre 4 fait l'objet d'un article qui sera soumis prochainement dans *Journal of Food Science*, intitulé « **Use of blueberry puree interacting with whey proteins in high-protein bar development** ». Les auteurs sont Laura M. Chevalier, Laurie-Eve Rioux, Paul Angers et Sylvie L. Turgeon.

Résumé

Les barres riches en protéines et en fibres sont des produits alimentaires très populaires sur le marché actuel. Cependant, l'addition de protéines entraîne généralement le durcissement des barres au cours du temps, attribué à l'agrégation des protéines et à la migration de l'eau entre les composants des barres. Les protéines sont des macromolécules chargées qui peuvent former des complexes en présence de certaines fibres possédant des charges opposées, comme la pectine présente naturellement dans les fruits. Cette étude visait à étudier l'impact des complexes protéine-pectine, formés en mélangeant un isolat de protéines de lactosérum (IPL) dans de la purée de bleuets, sur le durcissement de barres modèles. Ces complexes, en diminuant la solubilité des protéines et l'activité de l'eau (a_w) de la poudre résultante, contribuaient à augmenter la dureté initiale des barres. Néanmoins, la vitesse de durcissement des barres au cours du temps était liée à l'augmentation de l' a_w des barres, indiquant qu'une migration d'eau était impliquée dans les changements de texture. Plus spécifiquement, les barres avec les complexes présentaient une a_w plus stable au cours du temps, participant à réduire l'ampleur du durcissement. Ces travaux démontrent le potentiel d'un mélange IPL-bleuet, sous forme complexée, pour moduler les changements de texture des barres et à participer à la conception d'aliments fonctionnels riches en protéines et en fibres.

Mots-clés : Bleuet, Dureté, Barres riches en protéines, Propriétés d'hydratation; Interactions protéines de lactosérum-pectine.

Application pratique : Un ingrédient naturel et pratique a été développé en utilisant des protéines de lactosérum et de la purée de bleuets comme source de fibres. Il peut être facilement incorporé dans des formulations alimentaires pour obtenir des produits riches en protéines et en fibres, comme par exemple des barres. De plus, les interactions entre les protéines et la pectine de bleuet contribuent à la texture et à la stabilité des aliments, aidant à formuler des produits sains et de qualité.

Abstract

High-protein and high-fiber bars are food products very popular in the current market. However, the protein addition usually leads to bar hardening over time, especially attributed to protein aggregation and water migration within the bar components. Proteins are charged macromolecules which can form complexes in presence of some oppositely charged fiber, such as pectin, naturally present in fruit. This study aimed to study the impact of protein-pectin complexes, formed by mixing whey protein isolate (WPI) into blueberry puree, on the hardening of model bars. These complexes, by decreasing protein solubility and water activity (a_w) of resulting powder, contributed to increase the initial bar hardness. Nevertheless, the rate of bar hardening over time was related with the bar a_w increase, indicating that water migration was involved in textural changes. More specifically, bars with complexes presented a more stable a_w over time, contributing to reduce the extent of hardening. This work demonstrated the potential of WPI-blueberry mixture, under complexed form, to modulate the textural changes of bars and design functional foods rich in proteins and fiber.

Keywords: Blueberry; Hardness; High-protein bars; Hydration properties; Whey protein-pectin interactions.

Practical Application: A natural and convenient ingredient was developed using whey proteins and blueberry puree as source of fiber. It can be easily incorporated in food formulations to get high-protein and high-fiber products, for example bars. Furthermore, the interactions between proteins and blueberry pectin may contribute to the texture and stability of foods, helping to formulate healthy food products.

4.1. Introduction

In recent years, functional foods rich in protein and fiber are in high and in growing demand on the global food market for weight loss/management, more energy, cardiovascular and digestive health, and healthy aging (IFIC Foundation 2017b). Snack bars present a relevant opportunity to offer foods fortified in both protein and fiber to health-conscious consumers, seeking out natural ingredients and convenience products (Stones 2016; Wyers 2016). Fruit bars are popular because the fruit natural nutrients as dietary fiber, vitamins, and minerals are concentrated in the bar (Orrego et al. 2014). High-protein bars, composed mainly of protein (10 g or more per reference amount customarily consumed, often dairy protein), fat, and carbohydrates, are also trendy foods that are no longer intended only for athletes but also for a large proportion of the population (Wyers 2016). However, incorporation of high levels of protein may harden bars over time which limits their shelf-life and acceptability.

Several mechanisms responsible for bar hardening have been proposed such as protein aggregation mainly through intermolecular disulfide bonds (Zhou et al. 2008a; b), phase separation between proteins and carbohydrates (sugars and polyols) (Loveday et al. 2010; McMahan et al. 2009), Maillard reactions (Zhou et al. 2013), and moisture migration (Loveday et al. 2009; Loveday et al. 2010; Lu et al. 2016; Hogan et al. 2012). Hogan et al. (2012) and Lu et al. (2016) highlighted the importance of the hydration behavior of individual components and of the bar preparation mode in moisture migration and contribution to textural changes. As discussed by Hogan et al. (2012), hardening is not caused by one single mechanism but results from many different chemical, physical, thermodynamic and process related factors. Protein-water-carbohydrate systems are hence in thermodynamic equilibrium whose stability depends on affinity and strength of molecular interactions between the proteins, solvent, and co-solvent molecules. Controlling these interactions may be a relevant strategy to influence the textural properties and stability of bars.

Only low molecular weight carbohydrates and/or polyol have been used in high-protein bars (Loveday et al. 2009; Loveday et al. 2010; Lu et al. 2016; Hogan et al. 2012; McMahan et al. 2009). Yet, some high molecular weight carbohydrates, more specifically polysaccharides like fruit pectin, may interact with proteins. These associative interactions induce protein-polysaccharide complex formation. These complexes have different functional properties compared to each individual component and this may modify food

structure and texture (Schmitt et al. 1998; Tolstoguzov 1997; Turgeon and Laneville 2009). For instance, whey protein-pectin complexes show a lower water retention capacity compared to individual ingredients (Bertrand 2008). Besides, pectin interactions with proteins at acidic pH has been reported to limit heat induced protein aggregation (Ibanoglu 2005). In acidified milk drinks, pectin is used to stabilize casein micelles by steric repulsion and prevent their aggregation (Tromp et al. 2004). Complexation between proteins and pectin, a fiber naturally found in fruit puree, is proposed as a new approach to prepare high-protein and high-fiber bars. Recently, it was shown that complexes can be formed at acidic pH through the mixing of whey protein isolate (WPI) within a raw blueberry puree that naturally contains pectin (Chevalier et al. 2017b). Indeed, when the pH of the system is between the pKa of pectin (≈ 3) and the IEP of proteins (≈ 5 for whey proteins), these two macromolecules carry opposite charges enabling electrostatic association (Girard et al. 2002; Jones et al. 2009). The functionality of these complexes has never been tested in a solid food model. The objective of this work was to use a blueberry puree fortified with WPI to develop bars with a high content in fiber and protein, while studying the impact of protein-pectin complexes on bar texture and hardening in relationship with their hydration properties.

4.2. Materials and methods

4.2.1. Ingredients

Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum L.*) from "Patriot" cultivar, selected because of its dominant production in Quebec, were harvested in 2015 (Beaumont, QC, Canada). They were stored at -18°C until their use. The protein ingredient was a whey protein isolate (WPI) (BiPRO®, Davigo Foods International Inc., Le Sueur, MN), chosen for its high protein content (95%, dry basis) and its high solubility and stability at low pH. Fresh "Moshkan" dates and whole almonds were purchased from a local supermarket. Citric acid monohydrate was obtained from Elnova Ltd (Rougemont, QC, Canada).

4.2.2. WPI-blueberry preparation and bar manufacturing

Two types of bar were prepared, designed as the "complexed" and the "non-complexed" bars (C and NC bars). The formulation was the same (**Annex 3-1**) between the two types but the WPI incorporation mode was different (**Fig. 4-1**). Firstly, raw blueberry puree was prepared by mixing thawed fruits using a food processor for 15 min at speed 6 (Thermomix TM31, Vorwerk, Germany). In one batch of puree (C bars), WPI powder was gradually

added into the puree and the mixture was stirred at speed 3 for 2 h at 20°C in order to let the proteins hydrate and solubilize. This step was called the "complexation step", since the acidic blueberry pH (around 3.0) allows proteins to electrostatically interact with blueberry pectin, forming WPI-pectin complexes (Chevalier et al. 2017b). The addition of WPI rose the pH at about pH 4.3 but this remained lower than the IEP of whey proteins. Then, the WPI-blueberry mixture was freeze-dried and ground in powder using a rolling pin to get the C powder. The other batch of puree (NC bars) was also stirred for 2 h at 20°C, freeze-dried, and then WPI was manually mixed in the puree powder using a large spoon until a uniform powder is obtained, called the NC powder.

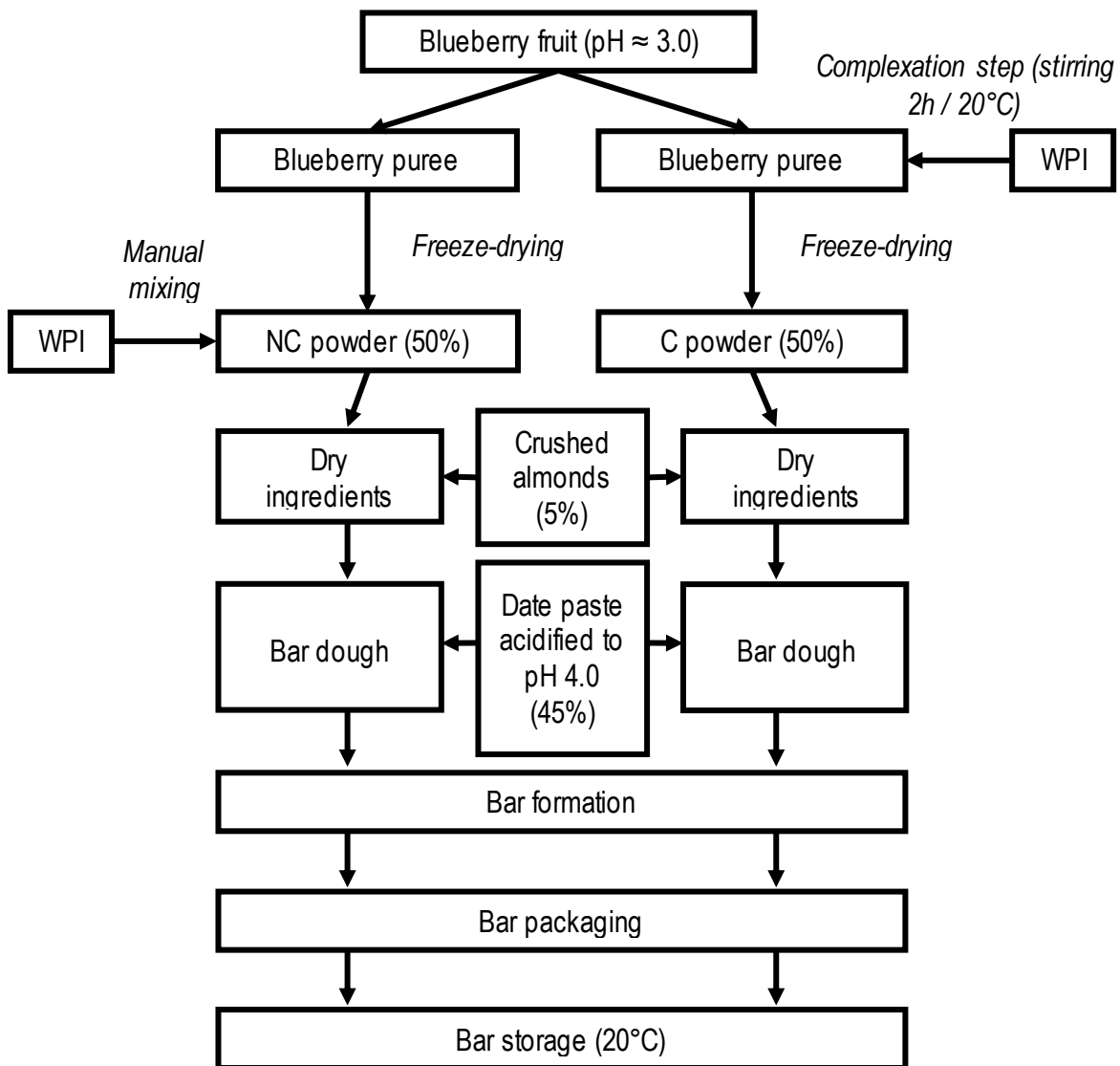


Figure 4-1. Flow chart illustrating the preparation of NC (non-complexed) and C (complexed) powders and bars

Values in brackets are the amounts used in the formulation (% = g/100 g).

In order to create palatable and tasty bars, representative of the commercial bars found on the market, almonds and dates were added. Almonds were crushed with a food processor for 5 x 5 s at speed 5 (Thermomix TM31, Vorwerk, Germany) and mixed with C or NC powder in a kitchen stand mixer equipped with a spiral dough hook (KitchenAid, Whirlpool Corporation, Benton Harbor, MI). Separately, fresh dates were pitted, crushed for 3 x 1 min at speed 10 with the same food processor (Thermomix TM31), and then acidified to pH 4 with a 50% citric acid solution to maintain the WPI-blueberry complexation. This date paste was gradually incorporated and thoroughly mixed with the dry ingredients using the kitchen stand mixer (KitchenAid) at speed 4 until obtaining an homogeneous mass (about 3 min). In the NC bar formulation, 4 g of water were added to reach the same moisture content as the C bars (based on powder moisture measurements). After mixing, the dough was flatten using a rolling pin and then cut in bars of approximately 55 g (4 x 8.5 x 1.2 cm). The bars were individually packed in an aluminum foil, sealed in a Ziploc® plastic bag, and stored at room temperature (20°C) for 28 days. Bar texture, moisture content, water activity, color, pH, and °Brix were analyzed during storage at day 1, 3, 7, 14, and 28 (section 4.2.3).

4.2.3. Bar analysis

4.2.3.1. Bar composition

Composition (moisture, protein, ash, lipid, and total fiber) of the bars was determined according to the AOAC official methods as described by Chevalier et al. (2017a). For protein, lipid, and total fiber, bar sample was stirred in distilled water (1:10 w/v) for 30 min, then mixed for 1 min using a kitchen blender (Magic Bullet, Homeland Housewares, Los Angeles, CA) prior to be freeze-dried for analysis. Carbohydrate content was obtained by difference (total solids - (protein + lipid + ash + fiber)). The energy value was determined using the following coefficients: carbohydrate = 4.0 kcal/g, lipid = 9.0 kcal/g, protein = 4.0 kcal/g, and fiber = 2.0 kcal/g.

4.2.3.2. Bar physico-chemical characteristics

A bar sample was dissolved and homogenized in distilled water (1:10 w/v). The pH of this mixture was measured using a pH-meter (Symphony SB20, VWR, Radnor, PA) while soluble solids (SS) were determined with a digital refractometer (AR200, Reichert Technologies, Depew, NY) and expressed in °Brix.

4.2.3.3. Bar color

Color changes during storage of the bars were evaluated using a colorimeter (Minolta CR-300, Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan). The bars were removed from their package and 3 measurements were made at different locations. The results were expressed as L*(lightness), a*(red-greenness) and b*(blue-yellowness) readings.

4.2.3.4. Bar texture

Hardness of the bars was measured at different storage intervals according to Hogan and others (2012), using a texture analyzer (TA-XT2, Texture Technologies Corp, Scarsdale, NY) with 5-kg load cell. Hardness was measured at 20°C as the maximum load recorded during 6-mm penetration of a stainless steel cylindrical probe (5-mm diameter) at 1 mm.s⁻¹. The hardness test was performed at 6 locations per bar. One bar was tested per analysis day.

4.2.3.5. Bar water activity and moisture content

Water activity (a_w) and moisture content of the bars were analyzed at different storage times. Measurements of a_w were performed using an a_w -meter (Aqualab, Series 3 TE, Decagon Devices Inc., Pullman, WA). Moisture content was determined by drying samples (2 g) at 102°C for 24 h in an air oven.

4.2.4. WPI-blueberry powder characterization

Free moisture content and a_w measurements of C and NC powders were performed as described in the section **4.2.3.5**.

Protein solubility was determined based on the protocol of Banach et al. (2013): powder samples (C powder, WPI, or freeze-dried blueberry puree) were weighted and dissolved in 40 mL distilled water in a 50-mL centrifuge tube to reach a protein content of 1% (w/v). The protein content of each ingredients was determined by the Dumas method (IDF standards 185:2002) ($N \times 6.38$) with a LECO FP-528 (LECO Corporation, Saint Joseph, MI). The pH of dispersions was adjusted to the pH value of bars (4.26 ± 0.02) using appropriate solutions of HCl and NaOH. The dispersions were stirred for 1 h then centrifuged at 10,000 g for 10 min. Protein in the supernatant was determined by the Dumas method. Solubility was expressed as the percentage of the protein content in the supernatant divided by total protein content in the dispersion.

Global solubility determination was adapted from Banach et al. (2013) and Robertson et al. (2000): sample (2 g) was weighed into a 50-mL centrifuge tube and 20 mL of distilled water was added. After adjusting the pH to 4.26 and stirring for 1 h, tubes were centrifuged at 6,000 g for 15 min. Supernatants were collected in aluminum weigh dishes, dried at 105°C overnight in an air oven, then weighted to get the total soluble solids. Global solubility was expressed as follows:

$$\text{Global solubility (\%)} = \frac{\text{total soluble solids (g)}}{\text{initial dry sample (g)}} \times 100$$

As the determination of protein and global solubility required hydration of powder samples for 1 h at pH 4.26, NC powder could not be tested. Indeed, this hydration step could favor the formation of new WPI-blueberry pectin complexes which were not initially present in NC powder and which could skew the solubility results. Therefore, for NC powder, the assays were performed on WPI and freeze-dried blueberry puree separately, and the results were estimated by summing the contribution of both individual ingredients.

To confirm the formation of protein-pectin complexes, mostly due to electrostatic interactions, solubility tests of C powder were performed again but the pH was adjusted to 6.5, with NaOH droplets in order to be in dissociative conditions. Indeed, pH 6.5 is superior to the IEP of whey proteins, limiting the complex formation between proteins and pectin found in blueberry puree (Chevalier et al. 2017b). The corresponding results were presented under the name of C6.5 powder.

4.2.5. Statistical analysis

Bars were prepared in three batches. One new bar was used for each analyzed storage time. For powder characterization, one batch of WPI-blueberry powder was prepared. All analyses were done in triplicate. Statistical analysis was conducted with SAS® 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Analysis of variance (ANOVA) using the mixed procedure was executed. For bar analysis, two-way ANOVAs ($P \leq 0.05$) were used according to a factorial 2 x 2 experiment, considering the effect of bar type and storage time. Storage time was considered as a repeated measure. For powder characterization, means were compared with the Tukey's multiple comparisons test ($\alpha = 0.05$).

4.3. Results and discussion

4.3.1. Bar composition

Table 4-1 presents bar compositions and the calculated energy values. Both bar types had similar composition. Each bar (55 g) provided a similar energy value and contained at least 10 g of protein and 4 g of fiber, which means that these bars can be considered in Canada as "high in protein" and "high in fiber". Indeed, a food product is considered as "high in protein" when the food has a protein rating of 20 or more (CFIA 2016b). The protein rating is equal to the protein in a Reasonable Daily Intake (RDI) multiplied by the Protein Efficiency Ratio (PER). Whey proteins generally have a PER of 3.2 (Falvo and Hoffman 2004). Although there is no RDI specified for snack bars in the Food and Drug Regulations of Canada, RDI is considered to be one average serving of the food. Therefore, for one bar of 55 g, the protein rating is at least 32 (= 10 g x 3.2). Regarding a dietary fiber claim, a food product is considered as "high in fiber" when the food contains 4 g or more of fiber per serving of stated size (55 g) (CFIA 2016a).

Table 4-1. Bar composition (g/serving of 55 g, wet basis) and energy value

	NC bar	C bar
Moisture	12.50 ± 0.12*	12.07 ± 0.02
Protein	10.42 ± 0.20	11.15 ± 0.50
Total fiber	4.74 ± 0.21	4.51 ± 0.12
Ash	0.86 ± 0.01*	0.89 ± 0.01
Lipid	1.04 ± 0.08	0.85 ± 0.17
Carbohydrate	25.53 ± 0.80	25.44 ± 0.50
Energy value	163 kcal	162 kcal

Means ± standard deviation. Means within a line followed by * were significantly different ($P \leq 0.05$). Carbohydrate = total solids - (protein + lipid + ash + fiber). Energy value: carbohydrate = 4.0 kcal/g, lipid = 9.0 kcal/g, protein = 4.0 kcal/g, and fiber = 2.0 kcal/g. NC: non-complexed. C: complexed.

4.3.2. Bar physico-chemical and color characteristics

Globally, the pH and °Brix remained stable for 28 days for both bar types (**Table 4-2**). Similar stability was reported by Vidhya and Narain (2011) in fruit bars prepared with milk powder and apple wood pulp and stored for 90 days. This low pH (4.26 ± 0.01) allowed the complexation maintenance between whey proteins and blueberry pectin and is effective for microbiologic conservation.

Table 4-2. Bar physico-chemical characteristics and color changes over time

	Bar type	Storage time at 20°C (days)				
		1	3	7	14	28
°Brix	C	6.33 ^a	6.09 ^b	6.34 ^{ab}	6.07 ^b	6.07 ^{ab}
	NC					
pH	C	4.26 ± 0.01				
	NC					
L*	C	28.99 ^{ac}	27.00 ^c	27.99 ^{bc}	29.35 ^{ab}	29.24 ^a
	NC	34.46 ^{wx*}	31.98 ^{y*}	31.74 ^{y*}	33.23 ^{xy*}	34.92 ^{w*}
a*	C	7.47				
	NC	10.96 [*]				
b*	C	0.88 ^{bc}	0.82 ^c	1.21 ^{bc}	1.90 ^{ab}	2.27 ^a
	NC	1.25 ^y	0.72 ^y	1.18 ^x	1.69 ^x	3.05 ^{w*}

*For a same storage time, means followed by * were significantly different ($P \leq 0.05$) between the two bar types. For a same bar type, means followed by the same letter (a-c for C bar or w-y for NC bar) were not significantly different ($P > 0.05$). When the bar type had no significant effect all along the storage, results of each bar type were averaged. For the pH, neither bar type nor time significant effect was observed. NC: non-complexed. C: complexed.*

Table 4-2 presents the L* a* b* values of bars over time. The NC bars were lighter (L* superior) and slightly redder (a* superior) than C bars. These differences were also visually observed for the powders prior to their incorporation in the bar formulation. When the WPI was incorporated into the fresh puree (C bars), the WPI particles were more hydrated and coated by the puree: the obtained mixture resulted in a powder and bars with a global darker purple color than the NC bars. For both bars, no significant changes over storage time were observed for L* and a* values. Regarding the parameter b*, values increased with storage time for both bars. This brown color development may reflect Maillard browning reactions and has also been reported on high-protein bars prepared with dairy proteins (Banach et al. 2014; McMahon et al. 2009). Maillard browning in high-protein bars has been related to free amine amount (Banach et al. 2014). It is possible that the complexation step in C bars limited the amount of free amine available to participate in Maillard reactions, that might explain the lower b* values measured in C bar at day 28, compared to NC bars.

4.3.3. Bar texture and changes over time

Hardening is the main texture change usually happening in high-protein bars (Loveday et al. 2009; Loveday et al. 2010; Lu et al. 2016; Hogan et al. 2012; McMahon et al. 2009; Banach et al. 2014). **Figure 4-2** shows the evolution of hardness of C and NC bars during

storage. Two phenomena were observed, an initial difference in hardness between the two bar types and an increasing of hardness over time. These two observations will be individually discussed in the following sections (sections 4.3.3.1 and 4.3.3.2).

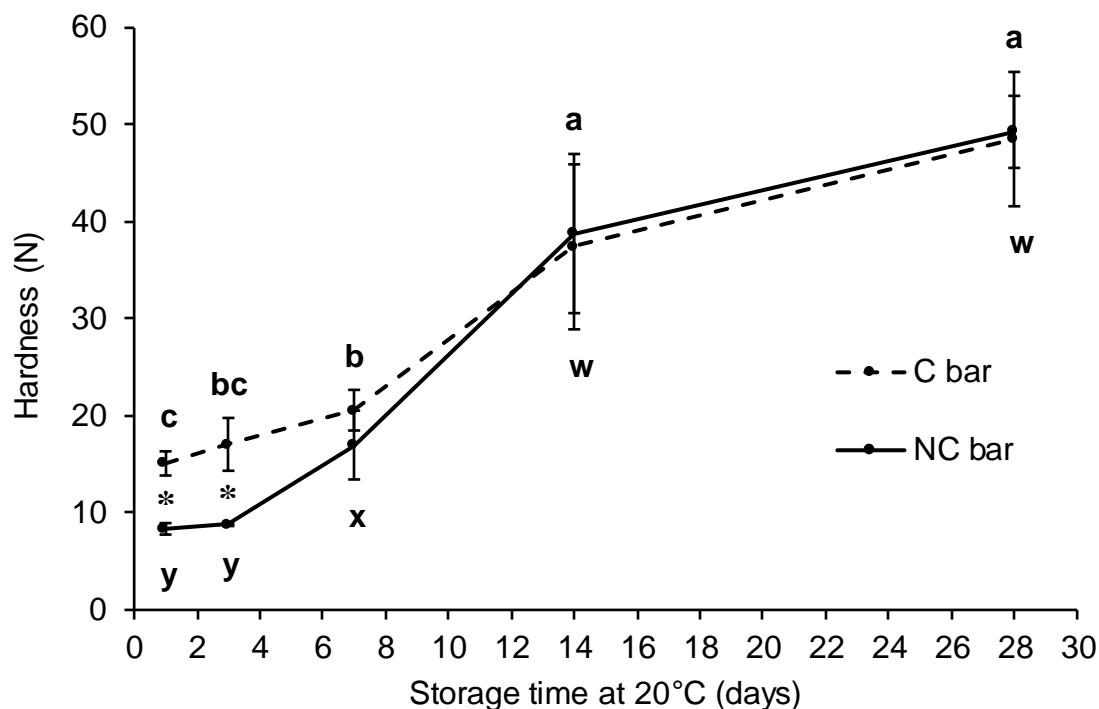


Figure 4-2. Bar hardness changes over time

Means \pm standard error. For a same storage time, means with * were significantly different ($P \leq 0.05$) between the two bar types. For a same bar type, means followed by the same letter (a-c for C bar or w-y for NC bar) were not significantly different ($P > 0.05$). NC: non-complexed. C: complexed.

4.3.3.1. Initial bar hardness related to the hydration properties of ingredient powders

The initial bar hardness was different between the two bar types. Over the first week, NC bars were softer than C bars, and this difference was significant for the 3 first days. Then, from day 7, NC and C bars showed similar hardness (**Fig. 4-2**). Therefore, conditions allowing complex formation of proteins with the pectin of the puree had an effect on initial hardening after the bar manufacturing. Hogan et al. (2012) found that the powder particle size affected the hardening process: bigger particles were more densely packed and provided harder bars. It is possible that the protein-pectin complexes formed in C bars had increased molecular size, promoting the hardening in the early hours of storage. Some authors used scanning electron microscopy or confocal laser scanning microscopy to get

more information on particle morphology. However, microscopy analysis was not performed since the present bars had heterogeneous structure and composition due to the incorporation of crushed almonds, blueberry puree, and date paste in the formulation. These fruit preparations are colored, contain some seeds, pieces of fruit skin, etc. This complexity probably would interfere with an accurate image analysis.

Besides, the hydration properties of proteins may be an important factor for bar hardness. For example, whey protein hydrolysate appears to provide a softer texture than intact WPI (Hogan et al. 2012; McMahon et al. 2009; Hogan et al. 2016). McMahon et al. (2009) suggested that, owing to the higher hydrophilicity of peptides and amino acids, hydrolyzed whey proteins were more solvated than intact proteins, which promoted their interaction with sugar/polyol co-solvent molecules. This prevented the phase separation of proteins from these low molecular weight carbohydrates, proposed as the main factor of bar hardening and subsequent protein aggregation. The softer texture of bars containing hydrolyzed proteins has also been attributed to their lower glass transition temperature (T_g) that increases their hygroscopicity and promotes powder solubilization and plasticization (Hogan et al. 2016; Zhou and Labuza 2007). In the present study, the same protein ingredient (WPI) was used in both C and NC bars. However, its incorporation mode was different, which likely affected its hydration properties. Some of these properties were evaluated.

Figure 4-3 presents the protein solubility (**A**) and global solubility (**B**), respectively.

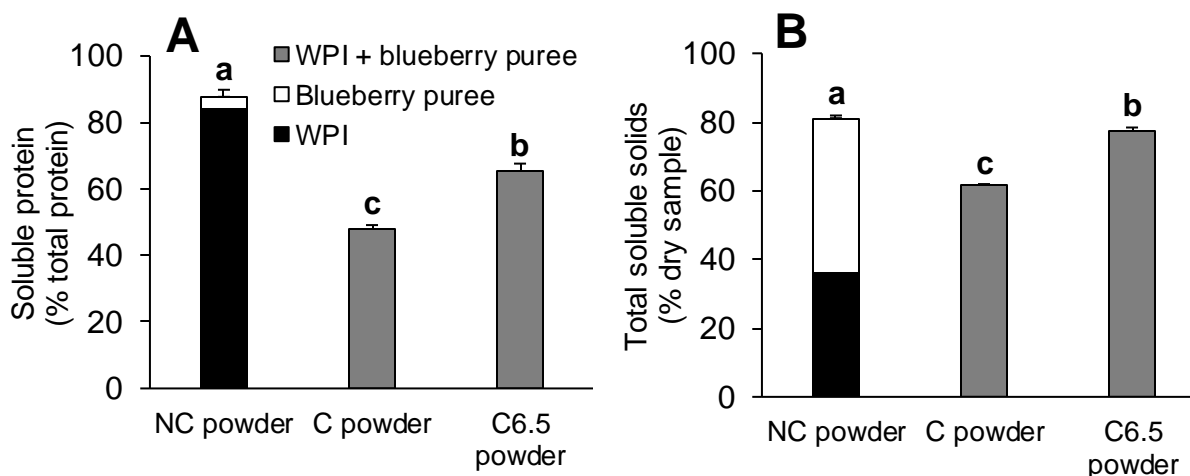


Figure 4-3. Protein solubility (A) and global solubility (B) of powders

Means (\pm standard deviation) followed by the same letter (a-c) were not significantly different ($P > 0.05$). NC: non-complexed. C: complexed. C6.5: powder adjusted at pH 6.5. Blueberry puree was under freeze-dried form.

Our results show that both protein and global solubilities are significantly reduced in C powder compared to NC powder. It confirmed the formation of insoluble protein-pectin complexes that were found in the pellet after centrifugation. This complex formation at acidic pH was in agreement with our previous results studying the interactions between whey proteins and pectin into blueberry puree (Chevalier et al. 2017b). The difference in global solubility between the two powders is mainly attributed to the difference in protein solubility. The complex formation was confirmed by the solubility results of C6.5 powder. Indeed, protein and global solubilities were enhanced compared to C powder, which means that the complexation in C powder was mostly governed by electrostatic interactions, as expected. However, some proteins remained probably complexed because only 65% of total protein were soluble (**Fig. 4-3A**). It is likely that 1 h at pH 6.5 (time for powder hydration) was not long enough to break all the protein-pectin complexes. Regarding the lower solubility of C powder compared to NC powder related to the bar hardening, the complexation of C powder may have formed larger particles contributing to increase the initial bar texture. Besides, being less soluble, their hydration and dissolution within date paste were likely slower, whereas the best solubility of NC powder may allow for a more rapid plasticization and uniformity of bars (Loveday et al. 2010; Lu et al. 2016). The importance of protein ingredient solubility in the bar hardness is consistent with previous studies on high-protein bars. Indeed, several authors reported that whey protein ingredients provide softer texture and more uniform bar microstructure than caseinate ingredients (Hogan et al. 2012; Loveday et al. 2010; Lu et al. 2016). This difference was attributed to the best relative solubility of whey protein powders. In high-protein bars prepared with calcium caseinate or WPI, Loveday et al. (2010) observed that calcium caseinate powders remained undissolved, whereas WPI powders were almost completely dissolved in bars from the first day after the bar manufacturing. Thus, bars with calcium caseinate were harder than bars with WPI that acted as a plasticizer of the bar matrix. Lu et al. (2016) reported similar observations regarding bar microstructure: WPI bars showed a more uniform structure with most protein particles hydrated, which was not the case for bars made with sodium caseinate. In the present study, complexes found in C powder probably hydrated gradually over storage time, explaining why the hardness difference between both bar types decreased during storage.

In addition to the solubility of C and NC powders, their moisture content and water activity (a_w) were determined to better understand their contribution to the initial bar hardness. C and NC powder had the same moisture content (9.75%, data not shown). However, C

powder presented an a_w value of 0.062, significantly lower than NC powder (0.170) (data not shown). This lower a_w may be another explanation of the harder texture of C bars at the early stage of storage. Indeed, hardening resulted from moisture migration from areas of high to low a_w (Hogan et al. 2012; Labuza and Hyman 1998). Reducing discontinuities in vapor pressure of water between food ingredients or micro-regions allows to stabilize osmotic equilibrium into food matrix, decreasing the rate of moisture transfer. Therefore, reducing a_w differences between ingredients (powder vs. liquid phase) could help to maintain bar stability. For instance, by increasing the a_w of WPI powder from 0.151 to 0.707, it was shown that initial bar hardness at day 1 passed from about 20 to 2 N, and the extent of hardening over storage time was reduced (Hogan et al. 2012). As the date paste is a humid ingredient (high a_w), the a_w difference is smaller with NC powder. Thus, the higher a_w of NC powder could contribute to reduce the initial hardening in the first few days. Furthermore, the higher a_w of NC powder may allow more water to plasticize the proteins and carbohydrates, also contributing to an initial softer bar texture. However, the use of C powder could be more relevant in other food products having an a_w value between the a_w values of the two powders, i.e. about 0.10, such as crackers or biscuits, since it would be further balanced with the food system.

In the present study, the lower a_w of C powder, compared to NC powder, could be attributed by the capacity of whey proteins to form a surface film around the fruit particles upon drying (Bhusari et al. 2014; Adhikari et al. 2009; Correia et al. 2017; Bazarria and Kumar 2016). This reduces the hygroscopicity of C powder particles and might initially slow their plasticization and solubilization in the bar matrix. Nonetheless, this drying envelop may decrease the stickiness of freeze-dried blueberry particles due to the high proportion of low molecular weight blueberry components such as fructose, glucose, and organic acids. This may thus prevent the development of paste-like structure instead of powder. Therefore, the C powder would be more suitable for handling and storage before being used in food preparation, a major asset in the food industry. In order to investigate whether the a_w reduction of C powder was only due to the freeze-drying of the WPI within the puree, or also due to the protein-pectin complexation, the following test was performed. A sample of fresh blueberry puree was prepared and its pH was adjusted at 6.5. WPI was then added. At this higher pH, complexation should be limited (Chevalier et al. 2017b). Then, the WPI-blueberry mixture was freeze-dried. The a_w of this resulting powder was an intermediate value between the a_w values of both NC and C powder (0.13,

data not shown). Therefore, the complexation seemed to promote the drying carrier role of WPI and could be further investigated as a tool to produce low hygroscopic powders.

4.3.3.2. Bar hardening over time related to the hydration properties of bars

For both bar types, bar hardness increased over storage time but the extent of hardening occurred mainly during the first two weeks. Indeed, the rate of hardening slowed down from day 14 and reached a force of 49 N at day 28 (**Fig. 4-2**). In addition, the extent of hardening varied depending on the bar type. NC bars presented the strongest hardness increase between day 3 and day 14, whereas the hardness increase for C bars was more gradual. It was reported that the protein usual hydration during bar storage may lead to moisture induced inter-molecular interactions, leading to protein aggregation that also contributes to bar hardening (Lu et al. 2016; Zhou et al. 2008b). In C bars, the formation of molecular interactions between whey proteins and pectin (Chevalier et al. 2017b), likely hindered or slowed the protein aggregation, explaining why the hardening increase of C bars over storage was slower than that of NC bars.

Maillard reactions have been suggested as a potential mechanism causing high-protein bar hardening, due to a decrease in protein solubility and their consequent aggregation (Zhou et al. 2013). As discussed in section **4.3.2**, an increase in browning was observed over storage time for both bar types. However, it did not explain their different extent of hardening since the browning development (b^* value, **Table 4-2**) was similar between the two bar types until day 14. Furthermore, at day 28, although NC bars had a higher b^* value compared to C bars, the two bar types had the same hardness. McMahon et al. (2009) also reported both an increase in browning and hardening during a 34-day storage at 32°C but the extent of the browning was not correlated with the hardness: the bars with an excessive browning were the softer bars. These authors concluded that Maillard browning was not a significant factor in high-protein bar hardening. Similar observations were done by Hogan et al. (2012).

Water migration has been shown to be an important factor in texture changes (Loveday et al. 2009; Loveday et al. 2010; Lu et al. 2016; Hogan et al. 2012). Hogan et al. (2012) found the migration of moisture from areas of high to low a_w contributes to the bar hardening. In the present study, whey proteins were under dry state (freeze-dried) when they were incorporated to the date paste. The latter being fully hydrated, a water migration certainly occurred over time from the date paste, in particular its carbohydrates, to whey proteins as

reported by Lu et al. (2016). Interaction of small molecules (water and low molecular weight carbohydrates) with proteins lowered the mobility of the former and caused further bar hardening. However, the accurate water movements and mobility changes are not so clear in our bars. Indeed, there could have had a competition of water attraction between whey proteins and carbohydrates from blueberry powder since the latter have a higher hygroscopicity than proteins. In parallel, fiber molecules present in blueberry puree also have strong hygroscopicity and water-holding capacity. The literature on high-protein food models shows that only low molecular weight carbohydrates such as glucose, fructose, or polyol are incorporated in such models. Therefore, our novel bar model brought an additional challenge to elucidate the mechanism of hardening of high-protein bars. The bar moisture and a_w changes over time of both bar types were measured to try to better understand the thermodynamic changes, especially water movements, related to bar hardening over time.

Table 4-3. Bar hydration characteristics over time

	Bar type	Storage time at 20°C (days)				
		1	3	7	14	28
Moisture (%)	C	21.95 ^a	21.29 ^b	21.61 ^{ab}	21.38 ^b	20.71 ^c
	NC	22.72 ^{w*}	22.34 ^{wx*}	22.18 ^{x*}	21.28 ^y	21.56 ^{y*}
a_w	C	0.576 ^{bcd}	0.573 ^d	0.577 ^{bc}	0.587 ^b	0.602 ^a
	NC	0.578 ^{yz}	0.579 ^{z*}	0.585 ^{y*}	0.603 ^{x*}	0.619 ^{w*}
Δa_w = ($a_w - a_{w1}$)	C	-	-0.004 ^c	0.001 ^c	0.010 ^b	0.026 ^a
	NC	-	0.001 ^z	0.007 ^{y*}	0.024 ^{x*}	0.041 ^{w*}

*For a same storage time, means followed by * were significantly different ($P \leq 0.05$) between the two bar types. For a same bar type, means followed by the same letter (a-d for C bar or w-z for NC bar) were not significantly different ($P > 0.05$). NC: non-complexed. C: complexed. a_w : water activity. a_{w1} : water activity at day 1.*

The first day after manufacturing, C and NC bar moisture contents were 21.9% and 22.7%, respectively (**Table 4-3**). This slight difference can be due to rounding in the calculations of ingredient weights. The moisture content of both bar types decreased over storage time, from 21.9 to 20.7% (day 28) for C bars, and from 22.7 to 21.6% for NC bars. Although bars were packed in aluminum foil and stored in plastic Ziploc® bags, these latter were likely not hermetically sealed: a moisture loss was therefore possible. However, the slight moisture decrease over time was likely not responsible of the rate and extent of hardening over the storage. Indeed, Banach et al. (2014) observed hardening of high-protein bars stored at room temperature for 42 days, although the moisture content of these bars increased over time, likely due to higher relative humidity of ambient air. They also showed

that, despite of having the same moisture content, bar hardness and the extent of hardening over time were significantly different depending on the protein ingredient used in the bar formulation. McMahon et al. (2009) and Hogan et al. (2012) reported the moisture availability, represented by a_w , was a more critical factor contributing to thermodynamic changes in non-equilibrium food matrices such as high-protein bars.

The a_w of both bar types increased over time (**Table 4-3**), but remained inferior to 0.65 in all bars, which inhibited microbial growth and ensured a good shelf life and stability (Loveday et al. 2009). The first day after the bar manufacturing, the a_w was similar in the both bar types (0.577), then the a_w of NC bars become significantly higher from day 3 until the end of the storage (day 28). Several previous studies observed that the high-protein bar hardening was related to an a_w increase (Banach et al. 2014; Hogan et al. 2012; McMahon et al. 2009). An increase in a_w indicates an increase in water mobility, leading to bar hardening. Indeed, water molecules, initially bound to other constituent molecules, are released into the bulk phase, enhancing water migration phenomenon. It is likely than complexes formed in C bars retained more bound water, which also acts as a plasticizer and maintains protein flexibility. Beyond individual a_w values, the extent of variation in a_w during the course of storage, i.e. $\Delta a_w = a_w - a_{w\text{ initial}}$ was calculated, with $a_{w\text{ initial}} = a_{w1} = a_w$ at day 1 (**Table 4-3**). A bigger Δa_w means more osmotic instability, allowing more water migration and thermodynamic changes. From day 7, Δa_w was significantly higher for NC bars than for C bars, indicating more instability in NC bars. This is consistent with the stronger hardness increase for NC bars. McMahon et al. (2009) also reported that bars whose a_w at the end of storage (34 days at 32°C) was significantly different from a_w at day 1 hardened in a higher extent than bars whose a_w was stable. Hogan et al. (2012) found a correlation between Δa_w and hardness for bars with several WPI powders, as well as for bars with different dairy protein ingredient. For the WPI bars, the correlation between Δa_w and hardness was strong until the end of storage ($R^2 = 0.95$ after a 12-day storage). For the other bars, the bigger Δa_w occurred during the first 24 h (between day 0 and day 1) and corresponded to the higher hardness increase. In the present study, no analyses were performed on the day of the bar manufacturing. However, Hogan et al. (2012) stored their bars at 37°C to accelerate thermodynamic changes. As the present bars were stored at room temperature (20°C), it was assumed that variations in a_w and hardness between day 0 and day 1 were less pronounced. A NMR analysis would give further information on moisture transfer and molecular interactions (Loveday et al. 2009; Loveday et al. 2010; Lu et al. 2016).

4.4. Conclusion

The objective of this work was to study the potential of a freeze-dried WPI-blueberry mixture in the development of high-protein and high-fiber bars, especially regarding the monitoring of bar hardening. The parameter that was investigated was the incorporation mode of WPI in bar formulation: either WPI was mixed in the acidic blueberry puree before freeze-drying, in order to form whey protein-blueberry pectin complexes, or WPI was added in the freeze-dried blueberry puree, forming thus a dry ingredient without complexes. The lower solubility and a_w of WPI-blueberry complexed powder compared to the non-complexed powder delayed the plasticization and solubilization of powder, making complexed bars initially harder. Nevertheless, it could be relevant to study the use of complexed powder in food products having a low a_w , in which water migration are very limited, such as biscuits or crackers for instance. Over time, both bar types hardened, correlated to an a_w increase, enhancing possible water migration. The complexation may retain more bound water and decrease the protein aggregation over time, which can reduce the bar hardening extent over storage.

No formal sensorial analysis has been performed on the bar yet, but some preliminary taste tests made with in-house people revealed that complexed bars had a less powdery taste due to the high protein content. Although a real sensorial analysis should be required, this protein incorporation mode could open new opportunities to incorporate more proteins in food products, without loss of gustatory quality.

It has also been found in this study that the interactions between proteins and blueberry components before freeze-drying seems to reinforce the drying aid from proteins. This promising result would require more specific investigations, since it could become an interesting process to prepare nutritional and non-sticky fruit powders, facilitating their handling and storage. Based on these results, the freeze-dried WPI-blueberry (or other fruits) mixture should be further studied in developing a natural and convenient ingredient helping to formulate high-protein and high-fiber healthy foods.

4.5. Acknowledgements

This work was supported by the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec through the Innov'Action program (grant number: IA113114). The authors thank Mara Hannan-Desjardins for her involvement in bar development and manufacturing and her valuable help for bar analyses, and declare no conflict of interest.

Conclusion générale

Les travaux inédits et appliqués de cette thèse s'inscrivent parmi l'ensemble des recherches effectuées sur les complexes protéine-polysaccharide. L'objectif général de cette thèse visait à montrer que la complexation entre les protéines et les fibres de fruits peut être une approche pertinente et fructueuse pour enrichir davantage les aliments en ces deux nutriments à la fois. Ce projet de doctorat proposait de créer un nouvel ingrédient fonctionnel à base originale d'une purée de bleuets comme source de fibres, en interaction avec des protéines de lactosérum. L'hypothèse générale était que la formation de complexes entre des protéines de lactosérum et de la pectine de bleuets permettrait d'enrichir des aliments et boissons en protéines et en fibres tout en aidant à structurer et stabiliser ces matrices alimentaires et à contrôler leur texture et leur viscosité. Cette hypothèse a été validée. En effet, la formation de complexes protéine-pectine a été démontrée dans de la purée de bleuets. En outre, il a été montré que ces complexes contribuent à diminuer la viscosité des boissons qui est souvent trop grande lors de tels enrichissements. Dans les barres, bien qu'ils n'empêchent pas leur durcissement au cours du temps, ils influencent quand même la texture initiale et son évolution au cours des premières semaines d'entreposage. Finalement, basé sur leur composition, ces produits alimentaires pouvaient être considérés comme « source élevée de fibres » et contenaient au moins 10 g de protéines par portion.

Principaux résultats et apports scientifiques

Chapitre 2 : L'originalité et la force de ce projet reposait sur la « matrice fibreuse », à savoir la purée de bleuets, utilisée pour l'étude et l'application des interactions protéine-polysaccharide (P-PS). La caractérisation et l'étude de cette matrice en fonction du cultivar de bleuets et du traitement thermique de la purée ont fait l'objet du premier objectif de cette thèse. Si la composition du bleuet était déjà globalement connue, sa proportion en fibres solubles et insolubles selon la méthode d'analyse officielle des fibres (AOAC 991.43) ne l'était pas. De plus, cette caractérisation a mis en évidence l'effet du cultivar sur les teneurs en fibres et en pectine. Le degré de méthylation de la pectine du bleuet en corymbe n'avait encore jamais été rapporté dans la littérature. Pour le laboratoire, ce projet a été l'opportunité de mettre au point une méthode par CG-MS à espace de tête afin de déterminer ce degré. D'autre part, les travaux appliquant des traitements thermiques sur le bleuet se sont toujours intéressés à ses polyphénols et leurs propriétés

antioxydantes, mais jamais à ses teneurs en fibres et en pectine, et encore moins à la structure même de cette dernière. Ce premier objectif a montré que ni une pasteurisation ni un blanchiment à basse température ne modifiaient les quantités de fibres totales, solubles et insolubles du bleuet ainsi que la quantité de pectine. En revanche, le blanchiment à basse température diminuait le degré de méthylation de la pectine, probablement en favorisant l'activité de la pectine méthyl-estérase endogène. Cette diminution s'accompagnait d'une réduction de la solubilité de la pectine. Ces résultats sont en accord avec les travaux de la littérature effectuant le même type de traitement sur les légumes (revus par Sila et al. (2009a) et Christiaens et al. (2014)). Toutefois, une découverte a été apportée par nos travaux dans le cas du bleuet. En effet, contrairement aux légumes, la réduction de la solubilité de la pectine demeurait limitée, si bien que la pectine soluble restait majoritaire par rapport à la pectine insoluble. Ce résultat peut s'expliquer par la faible quantité de calcium dans le bleuet et par la forte linéarité de la pectine du bleuet, ce qui limite les possibilités de chélation de la pectine. Le fil conducteur du projet étant l'étude et l'application des complexes P-PS, nous n'avons pas entrepris davantage de travaux afin de valider ces hypothèses. De même, il pourrait être intéressant de poursuivre les recherches pour optimiser le barème temps/température du blanchiment afin d'étudier plus profondément les possibilités de modulation du degré de méthylation de la pectine. Le cas échéant, une attention particulière devrait être portée sur les polyphénols du bleuet et leur capacité antioxydante qui est sensible aux températures élevées.

Chapitre 3 : La deuxième phase de ce projet avait pour objectif d'étudier la formation de complexes entre un isolat de protéines de lactosérum et la purée de bleuets et également d'évaluer l'impact sur la fonctionnalité (viscosité, texture et stabilité) des mixtures résultantes seules ou incorporées dans une boisson modèle de type smoothie.

Dans un premier temps, les résultats de solubilité après centrifugation ont démontré la formation de complexes entre les protéines de lactosérum et la pectine du bleuet. Ces complexes étaient de nature majoritairement électrostatique puisqu'ils étaient observés à pH 3,5, soit le pH moyen naturel du bleuet, et non à pH 6,5, un pH où les protéines et la pectine sont chargées négativement. Grâce à son faible pH, le bleuet s'avère donc un fruit bien approprié pour la formation de complexes. Cependant, ces complexes insolubles contribuaient à augmenter la viscosité des mixtures résultantes, ce qui à première vue pourrait être un frein à leur utilisation dans les boissons par exemple. L'augmentation de la

concentration en protéines ne permettait pas de former davantage de complexes, due à la quantité limitée de pectine disponible dans le bleuets. Le cultivar n'influençait pas la formation de complexes. En revanche, le traitement thermique de la purée avant l'ajout de protéines avait un effet significatif. Des complexes insolubles étaient formés avec de la purée non chauffée, alors qu'ils étaient absents ou demeuraient solubles avec de la purée chauffée (blanchiment à basse température + pasteurisation). Contrairement à ce que nous attendions au vu des résultats obtenus dans le premier objectif, le blanchiment à basse température réalisé dans cette deuxième phase n'a pas diminué le degré de méthylation de la pectine. Les hautes températures accompagnées du cisaillement de la purée ont entraîné la solubilisation de la pectine hautement méthylée. Ce résultat a mis en lumière le fait que le volume de purée à traiter, son mode de chauffage et le type d'appareil utilisé jouent un rôle fondamental dans les propriétés de la purée et le comportement de la pectine (degré de méthylation et solubilité). La plus haute quantité de pectine soluble et son haut degré de méthylation (> 70%) semblaient stabiliser les complexes les rendant ainsi peu sédimentables. Ces résultats concernant l'impact du chauffage de la purée sur la structure et la solubilité de la pectine et par conséquent sur la formation et la stabilisation des complexes sont inédits et prometteurs. En effet, cette stabilisation ainsi que la haute quantité de pectine soluble limitaient l'augmentation de la viscosité des mixtures. Cela pourrait aider à contrôler les propriétés rhéologiques des boissons enrichies en fibres et protéines. Toutefois, ces résultats nécessiteraient d'être complétés par des travaux supplémentaires visant à valider la formation de complexes solubles et à caractériser leur structure, composition, taille et morphologie. La stabilisation des complexes pourrait aussi aider à incorporer d'autres types de protéines dans les aliments qui, seules, sont peu solubles en milieu pH acide, comme les protéines végétales par exemple.

Dans un second temps, ce deuxième objectif consistait en une mise en application directe des mixtures dans lesquelles la formation de complexes, bien qu'insolubles, venait d'être démontrée. Des smoothies ont donc été développés en incorporant les mixtures obtenues avec de la purée non chauffée au préalable. Il a été montré que les complexes permettaient de diminuer la viscosité des smoothies. Cela était très probablement dû à l'étape finale de pasteurisation, typique de la fabrication industrielle des smoothies, qui renforçait les interactions protéine-pectine, produisant ainsi des particules de plus petite taille. Ce résultat contribue grandement à l'avancée scientifique en termes d'application industrielle des complexes puisqu'il démontre que les interactions protéine-pectine

permettent de contrôler la viscosité des boissons, un défi majeur de l'industrie alimentaire. Néanmoins, il pourrait être pertinent de faire la même étude mais dans des conditions dissociantes (pH 6,5) afin de confirmer que la diminution de viscosité des smoothies est due uniquement à la complexation maximisée par la pasteurisation ou bien également à d'autres phénomènes, comme la solubilisation de la pectine par exemple.

Chapitre 4 : La troisième et dernière phase de ce projet a permis d'élargir le potentiel d'applications des complexes formés au sein d'une purée de bleuets, tout en contribuant à l'avancée des connaissances quant à l'impact des protéines sur la texture d'aliments solides. Comme pour les smoothies, des barres modèles riches en fibres et en protéines ont été développées en incorporant les mixtures présentant des complexes démontrés, c'est-à-dire celles obtenues avec de la purée non chauffée. En revanche, ces mixtures étaient lyophilisées avant d'être mélangées aux amandes et à la pâte de dattes, les deux autres ingrédients utilisés dans la formulation des barres. Les résultats de ces barres dites « complexées » ont été comparés à ceux de barres « non-complexées » dans lesquelles la purée de bleuets était lyophilisée seule puis mélangée à la poudre de protéines de lactosérum. Deux principaux et nouveaux résultats ont été démontrés.

D'une part, la complexation des protéines avec la pectine du bleuet n'a pas empêché les barres de durcir au cours du temps. Après un mois d'entreposage à température pièce, les deux types de barres avaient la même dureté (49 Newtons), similaire néanmoins à certaines barres commerciales riches en protéines (résultat non montré). Cependant, la cinétique de durcissement des barres « complexées » était plus lente au cours des deux premières semaines que celle des barres « non-complexées ». Cela était expliqué par une meilleure stabilité de l'activité de l'eau (a_w) des barres « complexées » dont l'influence sur le durcissement a été mise en évidence. Il se pourrait aussi que la complexation des protéines avec la pectine limite l'agrégation des protéines et l'accroissement conséquent de la dureté. D'autres analyses sur les barres au cours du temps aideraient à valider cette hypothèse et à mieux comprendre les mécanismes de durcissement des barres. Par exemple, l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (RMN) permettrait de mieux évaluer les phénomènes de migration d'eau et migration moléculaire suggérés comme responsables du durcissement des barres (Loveday et al. 2009; Loveday et al. 2010; Lu et al. 2016). L'observation de la microstructure des barres par microscopie confocale à balayage laser pourrait peut-être aider à visualiser les complexes et/ou les agrégats de protéines, ainsi que d'éventuelles séparations de phases pouvant aussi contribuer au

changement de la texture (Hogan et al. 2012; Loveday et al. 2009; Loveday et al. 2010; Lu et al. 2016; McMahon et al. 2009). Toutefois, il est important de rappeler que l'hétérogénéité et la complexité des ingrédients utilisés dans la formulation des barres (purée de bleuets, amandes, pâte de dattes) peut limiter la qualité et l'interprétation des images observées.

D'autre part, la complexation des protéines avec la pectine a montré un effet significatif sur la texture initiale des barres : les barres « complexées » étaient plus dures que les barres « non complexées ». La comparaison des propriétés d'hydratation de la poudre dite « complexée » (obtenue après lyophilisation de la mixture protéines-purée) avec celles de la poudre « non complexée » (obtenue par mélange des protéines avec la purée lyophilisée) ont permis d'expliquer cette différence de texture. En effet, cette différence est due à la complexation des protéines qui diminuait leur solubilité. Cette faible solubilité retardait la solubilisation et la plastification des protéines au sein de barre, rendant cette dernière plus dure au cours des premiers jours d'entreposage. Un autre résultat inédit a été démontré : la poudre « complexée » présentait une valeur d' a_w plus faible que la poudre « non complexée », probablement en raison de la capacité des protéines à diminuer l'hygroscopicité des sucres et des fibres du bleuet lors du séchage (lyophilisation). Cette plus faible a_w , plus éloignée de l' a_w élevée de la pâte de dattes, a certainement aussi contribué à la texture initiale plus dure des barres « complexées ». Bien que les complexes n'aient pas permis de contrer les phénomènes de durcissement des barres, ces travaux ont souligné l'importance des propriétés d'hydratation des protéines vis-à-vis de la texture des aliments solides. Ils ont mis en évidence que les complexes ont bien un impact sur la texture de ce type d'aliment : ils augmentent la dureté initiale mais ralentissent la cinétique de durcissement au cours du temps. En plus de ces conclusions, la fonction d'agent séchant des protéines, très certainement renforcée par leur complexation, ouvre de nouvelles voies d'exploration pour produire des poudres alimentaires fonctionnelles, riches en fibres et protéines.

Portée des découvertes et retombées du projet

Ces travaux constituent une approche inédite et novatrice qui cherchait à répondre de manière concrète et appliquée à des problématiques industrielles réelles. Ils contribuent à l'avancement des connaissances scientifiques en améliorant la compréhension du comportement des systèmes mixtes P-PS dans des milieux concentrés, semi-liquides et solides, non purs, et sous des conditions environnantes complexes et représentatives des

produits alimentaires. Les interactions P-PS et les propriétés fonctionnelles résultantes ont toujours été étudiées à partir d'ingrédients purifiés et en milieux peu concentrés. Ces travaux se distinguent par le fait qu'ils se rapprochent de la réalité et des conditions industrielles. L'utilisation d'une matrice complexe malgré les contraintes pour l'application de certaines méthodes analytiques est plus représentative de la complexité des aliments formulés avec plusieurs ingrédients.

Il a été démontré que des complexes entre des protéines ajoutées et de la pectine d'une purée de bleuets peuvent bel et bien se former dans des mixtures protéines-purée. Le pH acide du fruit, supérieur au pKa de la pectine et inférieur au pI des protéines, est optimal pour favoriser les interactions électrostatiques. L'ensemble de ces travaux a révélé l'importance des propriétés de la pectine *in situ*, plus précisément son degré de méthylation et sa solubilité, vis-à-vis de la formation, de la stabilité et solubilité des complexes. Les résultats étant similaires pour deux cultivars de bleuets dont les teneurs en fibres et en pectine sont différentes, il serait possible de généraliser ces conclusions à l'ensemble des cultivars de bleuets en corymbe, et probablement même à des bleuets nains (sauvages) qui sont davantage produits au Québec et utilisés dans la transformation alimentaire (MAPAQ 2016). Sous réserve de valider cette supposition, cette généralisation permettrait d'élargir la portée de ces découvertes à toute l'industrie du bleuet, l'industrie fruitière la plus importante au Canada. D'autre part, de manière concrète et appliquée, il a été mis en évidence que ces complexes sont un outil pour moduler la structure et les propriétés texturales et rhéologiques de différentes matrices alimentaires. Ils contribuent à réduire la viscosité des boissons pasteurisées, à augmenter la dureté initiale des barres de collation et à ralentir la cinétique de durcissement de ces barres au cours du temps. Ces résultats ouvrent de nouvelles voies de travail et d'exploration des complexes sous un angle à la fois nutritionnel et technologique, aussi bien dans le domaine de la recherche que dans celui de l'industrie.

Par ailleurs, l'exploitation du bleuet comme source de fibres pour enrichir des aliments est inédite et appropriée au vu de la grande production et de la popularité de ce fruit en Amérique du Nord. En termes de perspectives industrielles potentielles, l'utilisation directe d'une purée de bleuets dans la formulation d'aliments ou de boissons sera pertinente et attrayante autant pour les consommateurs que pour les industriels. En effet, en termes de perspectives industrielles potentielles, elle sera appréciée par les consommateurs qui préfèrent des listes simples d'ingrédients sur les étiquettes et valorisent les ingrédients

« naturels » et peu transformés, plutôt que l'ajout d'additifs par exemple. L'incorporation de la purée plutôt que de pectine isolée permettra de conserver les vitamines, minéraux et antioxydants naturels du bleuët. Cela pourra aussi probablement permettre de limiter l'ajout de sucres ou d'agents liants et procurer une saveur agréable et fruitée. De plus, les producteurs de bleuëts, nombreux dans la région du Québec et au Canada pourront y voir une nouvelle plus-value de l'utilisation de ce petit fruit et le développement d'un ingrédient local sera un atout pour l'industrie alimentaire québécoise et canadienne.

Limites des travaux

La « matrice fibreuse » qu'est la purée de bleuëts constituait l'élément de base du projet qui en faisait son originalité et sa distinction par rapport aux études de la littérature sur les complexes P-PS. Pourtant, la principale limite rencontrée au long de ce projet était due à la complexité de cette matrice. En premier lieu, il s'agit d'un milieu composé d'environ 10-12% de solides totaux de nature diverse (polysaccharides, polyphénols, sucres, minéraux, protéines, etc.). Dans le cadre de ce projet visant l'étude des complexes P-PS, nous nous sommes intéressés aux protéines, à la pectine et aux polyphénols totaux, qui sont les trois composés connus pour interagir les uns avec les autres. Il faut garder à l'esprit que d'autres interactions intra- et intermoléculaires ont pu contribuer aux résultats observés. Une déconstruction de la matrice par extractions par solvant et/ou par système de résines échangeuses d'ions (Sankaran et al. 2015) pourrait permettre de mieux appréhender l'importance et la contribution des différents composés du bleuët. Toutefois, les résultats pourraient s'avérer délicats à interpréter et peu représentatifs de la réalité, puisqu'une telle déconstruction entraînerait par exemple une modification de la force ionique et des réseaux et interactions intermoléculaires. En second lieu, la purée de bleuëts est une matrice hétérogène (pépins, pulpe, morceaux de peau) et très colorée. Cela limite fortement l'utilisation de certaines analyses couramment employées dans la littérature pour caractériser la formation et la stabilité des complexes P-PS qui doivent être réalisées dans des milieux extrêmement dilués, comme par exemple la turbidimétrie. La mesure de la taille des complexes et celle de la charge (Zéta-potentiel) sont d'autres exemples d'analyses dont l'interprétation peut être faussée par la présence de particules hétérogènes au sein de la purée. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier la formation de complexes *via* la solubilité des protéines et de la pectine respectivement après centrifugation. La force et le temps de centrifugation ont été choisis d'après la littérature et des tests préliminaires, de façon à ce que la pulpe (culot) et le sérum (surnageant) des

purées soient facilement séparés tout en minimisant la précipitation des protéines seules. Ainsi, cette méthode supposait que les complexes, en raison de leur plus haut volume moléculaire, étaient retenus dans le culot. Ces complexes étaient alors qualifiés d'insolubles. La comparaison des résultats avec ceux obtenus dans des conditions dissociantes (pH 6,5 > pI) apportait la validation de la présence d'interactions électrostatiques. Néanmoins, cette méthode ne permettait pas de détecter la formation de complexes solubles, c'est-à-dire qui demeuraient suffisamment stables pour ne pas précipiter avec le culot. Augmenter la force de centrifugation, mesurer la turbidité et la taille de particules des surnageants ou encore augmenter la force ionique pour déstabiliser les éventuels complexes pourrait aider à valider la formation et la stabilité des complexes solubles.

Concernant les applications des complexes dans les barres et les smoothies, travailler également dans des conditions dissociantes (pH 6,5) permettrait de valider l'importance et la contribution des complexes dans les comportements et propriétés observés. Cependant, contrairement aux systèmes modèles utilisés dans les travaux de la littérature sur les complexes, l'objectif de ce projet était d'étudier les complexes dans de véritables aliments et boissons, qui auraient pu faire l'objet d'une analyse sensorielle. Ainsi, tous les ingrédients devaient être de grade alimentaire, or il est difficile d'augmenter le pH des aliments sans l'utilisation de solutions basiques. Par ailleurs, dans le cadre de ce doctorat, aucune analyse sensorielle formelle des produits n'a pu être réalisée. Or, il a été souligné dans la revue de littérature de cette thèse que l'enrichissement en protéines entraîne parfois des saveurs et des sensations désagréables en bouche. Une analyse sensorielle permettrait d'évaluer la qualité gustative des produits et pourrait révéler, dans le cas des barres, dans quelles mesures la complexation des protéines limite (ou non) ces désagréments. Notons toutefois qu'un suivi microbiologique des produits serait à effectuer si une telle analyse devait avoir lieu.

Finalement, pour l'étude sur les barres, encore une fois la complexité et l'hétérogénéité des ingrédients choisis ont limité les possibilités d'analyses effectuées dans le temps. Afin de compléter ces travaux, il pourrait être intéressant de développer un système modèle plus simple, sans pâte de dattes, pour tenter de mieux caractériser et comprendre les mécanismes de durcissement. En outre, une mesure de la cinétique et de la capacité d'adsorption d'eau des ingrédients par approche gravimétrique et contrôle de l'humidité relative (Mamaliga et al. 2004; Mir and Nath 1995) pourrait améliorer la compréhension

des propriétés d'hydratation des complexes et celle de leur impact sur les changements de texture des barres.

Perspectives

Dans le but d'enrichir les travaux de cette thèse et d'élargir la portée des résultats, plusieurs voies de recherche pourraient être envisagées.

Tester d'autres conditions de complexation pourrait apporter des informations supplémentaires quant à la formation, la composition, la stabilité et les propriétés des complexes. Par exemple, modifier la force ionique par l'ajout de sels ou encore moduler la température des mixtures permettrait d'étudier la contribution des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène. Accroître le temps d'agitation des protéines au sein de la purée avant l'utilisation des mixtures dans les applications alimentaires pourrait laisser plus de temps aux protéines pour s'hydrater et interagir avec la pectine, ce qui pourrait modifier l'arrangement intra- et intermoléculaire des biopolymères et la structure des complexes. En outre, ces travaux ont montré que la complexation des protéines ajoutées était limitée par la quantité de pectine soluble dans le bleuet. Travailler avec des fruits plus riches en pectine comme les pommes et les agrumes (Baker 1997) pourrait être judicieux afin de réduire le ratio protéine:pectine et ainsi pouvoir ajouter davantage de protéines. Plus largement, il pourrait être intéressant de réaliser des travaux similaires avec d'autres fruits dans le but de généraliser ces résultats et ainsi d'offrir un plus large éventail de possibilités pour les producteurs fruitiers et les fabricants de produits alimentaires. Dans une perspective de développement durable, travailler non pas avec des purées de fruits mais avec des marcs de fruits, coproduits de la fabrication de jus, davantage concentrés en fibres, pourrait être une approche pertinente.

Concernant les applications alimentaires, d'autres aliments pourraient être développés en y incorporant les mixtures protéines-purée présentant des complexes. Cela permettrait de compléter le panel d'applications des complexes et surtout de mieux comprendre les effets de ces complexes sur les propriétés et la fonctionnalité des aliments. Par exemple, la faible a_w des poudres « complexées » révélée dans l'étude sur les barres (chapitre 4) pourrait être un atout dans la fabrication d'aliments à faible a_w globale comme les biscuits ou les craquelins. De même, la réduction de l'hygroscopicité de ces poudres pourrait s'avérer utile pour enrichir les produits de boulangerie en fibres et protéines tout en limitant la rétention d'eau des fibres responsable de la diminution du volume et de

l'augmentation de la fermeté de ces aliments (Foschia et al. 2013).

Enfin, pour compléter les différents aspects de l'étude de complexes, il serait important d'étudier si la complexation des protéines avec la pectine modifie la bioaccessibilité et la biodisponibilité de ces deux nutriments. À première vue, comme les interactions P-PS sont majoritairement de nature électrostatique, elles devraient être dissociées au niveau de l'intestin où le pH devient neutre ($\approx 6-8$) et n'altéreraient pas l'absorption des protéines ni celles de la pectine. Cependant, la viscosité des fibres entraîne souvent une réduction de l'absorption des nutriments (Dikeman and Fahey 2006; Schneeman and Gallaher 1985). Dans le cas des smoothies, la diminution de viscosité observée en présence de complexes pourrait aider à limiter cette réduction. D'autre part, la protéolyse et la vitesse de digestion des protéines peuvent être ralenties par la formation de complexes P-PS qui entraîne une gêne stérique et limite l'accès des enzymes digestives aux sites de clivage des protéines (Mouécoucou et al. 2003; Peyron et al. 2006). Cela pourrait affecter la bioaccessibilité et la biodisponibilité des acides aminés et ralentir la sensation de satiété (Koopman et al. 2009; Abou-Samra et al. 2011; Nilsson et al. 2004). Toutefois, il a été montré que l'effet de la pectine sur la digestibilité des protéines dépend de son degré de méthylation et de sa concentration (Mouécoucou et al. 2003; Peyron et al. 2006). Dans certains cas, la protéolyse peut être au contraire accélérée par la complexation qui limite l'agrégation des protéines, rendant ces dernières plus solubles et accessibles pour les enzymes digestives (Mouécoucou et al. 2004b). Afin de valider ou invalider ces hypothèses et résultats, une étude de digestibilité *in vitro* des barres et smoothies est prévue pour la suite de ce projet. Enfin, toujours par rapport aux effets physiologiques des complexes, des travaux ont révélé que les interactions P-PS peuvent diminuer les propriétés allergènes de certaines protéines (protéines des cacahuètes, du lait ou des œufs) par effet de « masquage » des épitopes de ces dernières ou bien en diminuant l'accessibilité des épitopes en raison des changements de conformation des peptides (Mouécoucou et al. 2004a; Peyron et al. 2006). Ces résultats contribuent à favoriser l'utilisation des complexes dans les aliments et peuvent être une piste intéressante à continuer d'investiguer.

Bibliographie

- AAC. 2010. Aperçu statistique de l'industrie canadienne du bleuet. Available from: http://publications.gc.ca/collections/collection_2012/agr/A118-44-2012-fra.pdf. [Accessed 2017 07-08].
- AAC. 2011. Tendances canadiennes et mondiales du marché des aliments de santé et de mieux-être. Available from: <http://www.ats-sea.agr.gc.ca/inter/4367-fra.htm>. [Accessed 2017 07-08].
- AAC. 2012. Crop profile for highbush blueberry in Canada. Available from: <http://publications.gc.ca/pub?id=9.695619&sl=1>. [Accessed 2017 07-08].
- AAC. 2016a. Aperçu de l'industrie de la transformation des aliments et des boissons. Available from: <http://www.agr.gc.ca/fra/industrie-marches-et-commerce/statistiques-et-information-sur-les-marches/par-produit-secteur/secteurs-des-aliments-et-boissons-transformes/aperçu-de-l-industrie-de-la-transformation-des-aliments-et-des-boissons/?id=1174563085690>. [Accessed 2017 07-05].
- AAC. 2016b. Aperçu statistique de l'industrie fruitière du Canada 2015. Available from: http://www.agr.gc.ca/resources/prod/doc/pdf/fruit_report_2015-fr.pdf. [Accessed 2017 07-08].
- AAC. 2016c. Possibilités et défis de l'industrie canadienne des aliments fonctionnels et des produits de santé naturels. Available from: <http://www.agr.gc.ca/fra/industrie-marches-et-commerce/reglements-sur-les-aliments/enjeux-strategiques-et-reglementaires-en-alimentation/rapports-et-analyses/possibilites-et-defis-de-l-industrie-canadienne-des-aliments-fonctionnels-et-des-produits-de-sante-naturels/?id=1410206902299#alt>. [Accessed 2017 05-08].
- Abou-Samra R, Keersmaekers L, Brienza D, Mukherjee R, and Macé K. 2011. Effect of different protein sources on satiation and short-term satiety when consumed as a starter. *Nutrition Journal* 10(139):2-9.
- ACIA. 2014a. Exigences particulières concernant les allégations relatives à la teneur nutritive - Allégations relatives aux fibres alimentaires. Available from: <http://www.inspection.gc.ca/aliments/etiquetage/l-etiquetage-des-aliments-pour-l-industrie/allegations-relatives-a-la-teneur-nutritive/exigences-particulieres-concernant-les-allegations/fra/1389907770176/1389907817577?chap=12>. [Accessed 2017 06-29].
- ACIA. 2014b. Exigences particulières concernant les allégations relatives à la teneur nutritive - Allégations relatives aux protéines. Available from: <http://www.inspection.gc.ca/aliments/etiquetage/l-etiquetage-des-aliments-pour-l-industrie/allegations-relatives-a-la-teneur-nutritive/exigences-particulieres-concernant-les-allegations/fra/1389907770176/1389907817577?chap=3>. [Accessed 2017 06-29].
- Adhikari B, Howes T, Bhandari BR, and Langrish TAG. 2009. Effect of addition of proteins on the production of amorphous sucrose powder through spray drying. *Journal of Food Engineering* 94(2):144-153.
- Ahmed AER and Labavitch JM. 1978. A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *Journal of Food Biochemistry* 1(4):361-365.
- Akhavan T, Luhovyy BL, Brown PH, Cho CE, and Anderson GH. 2010. Effect of premeal consumption of whey protein and its hydrolysate on food intake and postmeal glycemia and insulin responses in young adults. *The American Journal of Clinical Nutrition* 91(4):966-975.

- Albersheim P, Neukom H, and Deuel H. 1960. Splitting of pectin chain molecules in neutral solutions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 90(1):46-51.
- Anderson GH and Moore SE. 2004. Dietary proteins in the regulation of food intake and body weight in humans. *Journal of Nutrition* 134(4):974S-979S.
- Anderson JW, Baird P, Davis Jr RH, Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, Waters V, and Williams CL. 2009. Health benefits of dietary fiber. *Nutrition reviews* 67(4):188-205.
- Anthon GE, Diaz JV, and Barrett DM. 2008. Changes in pectins and product consistency during the concentration of tomato juice to paste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(16):7100-7105.
- AOAC. 2012. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists International 19th ed. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- Ayala-Zavala JF, Vega-Vega V, Rosas-Domínguez C, Palafox-Carlos H, Villa-Rodriguez JA, Siddiqui MW, Dávila-Aviña JE, and González-Aguilar GA. 2011. Agro-industrial potential of exotic fruit by products as a source of food additives. *Food Research International* 44(7):1866-1874.
- Baker RA. 1997. Reassessment of some fruit and vegetable pectin levels. *Journal of Food Science* 62(2):225-229.
- Balasundram N, Sundram K, and Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99(1):191-203.
- Banach J, Clark S, and Lamsal B. 2013. Characterization of extruded and toasted milk protein concentrates. *Journal of Food Science* 78(6):E861-E867.
- Banach J, Clark S, and Lamsal B. 2014. Texture and other changes during storage in model high-protein nutrition bars formulated with modified milk protein concentrates. *LWT-Food Science and Technology* 56(1):77-86.
- Banque de Développement du Canada. 2013. Cinq tendances de consommation qui changent la donne. Available from: https://www.bdc.ca/Resources%20Manager/study_2013/etude_BDC_tendances_consommation.pdf?ref=shorturl-tendancesconsommateur. [Accessed 2017 07-01].
- Bartelme MZ. 2015. No Holds Barred. *Food Technology* 2:27-40.
- Bazaria B and Kumar P. 2016. Effect of whey protein concentrate as drying aid and drying parameters on physicochemical and functional properties of spray dried beetroot juice concentrate. *Food Bioscience* 14:21-27.
- Bédié GK, Turgeon SL, and Makhlof J. 2008. Formation of native whey protein isolate–low methoxyl pectin complexes as a matrix for hydro-soluble food ingredient entrapment in acidic foods. *Food Hydrocolloids* 22(5):836-844.
- Beecher J, Drake M, Luck P, and Foegeding E. 2008. Factors regulating astringency of whey protein beverages. *Journal of Dairy Science* 91(7):2553-2560.
- Ben-Shalom N, Shomer I, and Kanner J. 1984. Pectin-hesperidin interaction in a citrus cloud model system: The effect of pectin degradation. *LWT-Food Science and Technology* 17:125-128.
- Bengtsson H, Wikberg J, and Tornberg E. 2011. Physicochemical characterization of fruit and vegetable fiber suspensions. II: Effect of variations in heat treatment. *Journal of Texture Studies* 42(4):281-290.
- Bertrand M-E. 2008. Étude des propriétés gélifiantes et viscosifiantes de systèmes mixtes isolat de protéines de lactosérum-polysaccharides en conditions associatives. [Ph.D Thesis]. Québec, Canada: Université Laval. 138 p.
- Bhusari SN, Muzaffar K, and Kumar P. 2014. Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. *Powder Technology* 266:354-364.

- Bigliardi B and Galati F. 2013. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology* 31(2):118-129.
- Bizzozero J. 2017. Trending Ingredients in Snacks & Bars. Available from: <https://www.naturalproductsinsider.com/articles/2017/02/trending-ingredients-in-snacks-bars.aspx>. [Accessed 2017 06-30].
- Blumenkrantz N and Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54(2):484-489.
- Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson M-P, Maubois J-L, and Beaufrère B. 1997. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(26):14930-14935.
- Bonjour J-P. 2005. Dietary protein: An essential nutrient for bone health. *Journal of the American College of Nutrition* 24(sup6):526S-536S.
- Bordenave N, Hamaker BR, and Ferruzzi MG. 2013. Nature and consequences of non-covalent interactions between flavonoids and macronutrients in foods. *Food & Function* 5(1):18-34.
- Brejnholt SM. 2010. Pectin. In: Imeson A, editor. *Food stabilisers, thickeners and gelling agents*. Chichester, UK: Wiley-Blackwell. p. 237-265.
- Campbell WW, Trappe TA, Wolfe RR, and Evans WJ. 2001. The recommended dietary allowance for protein may not be adequate for older people to maintain skeletal muscle. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 56(6):M373-M380.
- Castro A, Bergenståhl B, and Tornberg E. 2012. Parsnip (*Pastinaca sativa* L.): Dietary fibre composition and physicochemical characterization of its homogenized suspensions. *Food Research International* 48(2):598-608.
- Castro A, Bergenståhl B, and Tornberg E. 2013. Effect of heat treatment and homogenization on the rheological properties of aqueous parsnip suspensions. *Journal of Food Engineering* 117(3):383-392.
- CFIA. 2016a. Specific nutrient content claim requirements-dietary fibre claims. Available from: <http://www.inspection.gc.ca/food/labelling/food-labelling-for-industry/nutrient-content/specific-claim-requirements/eng/1389907770176/1389907817577?chap=12>. [Accessed 2017 03-11].
- CFIA. 2016b. Specific nutrient content claim requirements-protein claims. Available from: <http://www.inspection.gc.ca/food/labelling/food-labelling-for-industry/nutrient-content/specific-claim-requirements/eng/1389907770176/1389907817577?chap=3>. [Accessed 2017 03-11].
- Chen H-C and Camire ME. 1997. Recovery of anthocyanins, pectin, and dietary fiber from cull lowbush blueberries. *Journal of Food Quality* 20(3):199-209.
- Chen W-S and Soucie WG, inventors; Google Patents, assignee. 1985. Edible fibrous serum milk protein/xanthan gum complexes. US4559233 A.
- Chevalier LM, Rioux L-E, Angers P, and Turgeon SL. 2017a. Low-temperature blanching as a tool to modulate the structure of pectin in blueberry purees. *Journal of Food Science* 82(9):2070-2077.
- Chevalier LM, Rioux L-E, Angers P, and Turgeon SL. 2017b. Study of interactions between pectin in a blueberry puree and whey proteins: functionality and application *Food Hydrocolloids* In press.
- Christiaens S, Mbong VB, Van Buggenhout S, David CC, Hofkens J, Van Loey A, and Hendrickx M. 2012a. Influence of processing on the pectin structure-function relationship in broccoli purée. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 15:57-65.

- Christiaens S, Van Buggenhout S, Chaula D, Moelants K, David CC, Hofkens J, Van Loey A, and Hendrickx M. 2012b. In situ pectin engineering as a tool to tailor the consistency and syneresis of carrot purée. *Food Chemistry* 133(1):146-155.
- Christiaens S, Van Buggenhout S, Houben K, Fraeye I, Van Loey A, and Hendrickx M. 2011. Towards a better understanding of the pectin structure–function relationship in broccoli during processing: Part I—macroscopic and molecular analyses. *Food Research International* 44(6):1604-1612.
- Christiaens S, Van Buggenhout S, Houben K, Kermani ZJ, Moelants KRN, Ngouémazong ED, Van Loey A, and Hendrickx M. 2014. Process-structure-function relations of pectin in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56(6):1021-1042.
- Colin-Henrion M, Mehinagic E, Renard CMGC, Richomme P, and Jourjon F. 2009. From apple to applesauce: Processing effects on dietary fibres and cell wall polysaccharides. *Food Chemistry* 117(2):254-260.
- Correia R, Grace MH, Esposito D, and Lila MA. 2017. Wild blueberry polyphenol-protein food ingredients produced by three drying methods: Comparative physico-chemical properties, phytochemical content, and stability during storage. *Food Chemistry* 235:76-85.
- Cui SW, Nie S, and Roberts KT. 2011. Functional Properties of Dietary Fiber. *Biotechnology* 4:517-525.
- Davidson MH and McDonald A. 1998. Fiber: forms and functions. *Nutrition Research* 18(4):617-624.
- De Freitas V, Carvalho E, and Mateus N. 2003. Study of carbohydrate influence on protein–tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry* 81(4):503-509.
- De Roeck A, Sila DN, Duvetter T, Van Loey A, and Hendrickx M. 2008. Effect of high pressure/high temperature processing on cell wall pectic substances in relation to firmness of carrot tissue. *Food Chemistry* 107(3):1225-1235.
- De Souza VR, Pereira PAP, da Silva TLT, de Oliveira Lima LC, Pio R, and Queiroz F. 2014. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry* 156:362-368.
- De Vries R and Cohen Stuart M. 2006. Theory and simulations of macroion complexation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 11(5):295-301.
- De Wit J. 1998. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science* 81(3):597-608.
- Degraeve P, Saurel R, and Coutel Y. 2003. Vacuum Impregnation Pretreatment with Pectinmethyl-esterase to Improve Firmness of Pasteurized Fruits. *Journal of Food Science* 68(2):716-721.
- Deng J, Shi Z, Li X, and Liu H. 2014. Effects of cold storage and 1-methylcyclopropene treatments on ripening and cell wall degrading in rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fruit. *Food Science and Technology International* 20(4):287-298.
- Deshpande RP, Chinnan MS, and McWatters KH. 2005. Nutritional, physical and sensory characteristics of various chocolate–flavored peanut–soy beverage formulations. *Journal of Sensory Studies* 20(2):130-146.
- Diaz JV, Anthon GE, and Barrett DM. 2007. Nonenzymatic degradation of citrus pectin and pectate during prolonged heating: Effects of pH, temperature, and degree of methyl esterification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(13):5131-5136.
- Dikeman C and Fahey G. 2006. Viscosity as Related to Dietary Fiber: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46(8):649-663.
- Doublier JL, Garnier C, Renard D, and Sanchez C. 2000. Protein–polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 5(3–4):202-214.

- Drake M, Chen X, Tamarapu S, and Leenanon B. 2000. Soy protein fortification affects sensory, chemical, and microbiological properties of dairy yogurts. *Journal of Food Science* 65(7):1244-1247.
- Duvelter T, Sila DN, Van Buggenhout S, Jolie R, Van Loey A, and Hendrickx M. 2009. Pectins in processed fruit and vegetables: Part I—Stability and catalytic activity of pectinases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8(2):75-85.
- Edwards PB, Creamer LK, and Jameson GB. 2008. Structure and stability of whey proteins. In: Singh H, Boland M, and Thompson A, editors. *Milk Proteins – from expression to food*. 2nd ed. San Diego, CA, USA: Academic Press. p. 163-203.
- Elleuch M, Bedigian D, Roiseux O, Besbes S, Blecker C, and Attia H. 2011. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry* 124(2):411-421.
- Espinosa-Muñoz L, Renard CMGC, Symoneaux R, Biau N, and Cuvelier G. 2013. Structural parameters that determine the rheological properties of apple puree. *Journal of Food Engineering* 119(3):619-626.
- Falvo MJ and Hoffman JR. 2004. Protein - Which is best? *Journal of Sports Science and Medicine* 3(3):118-130.
- FCC. 2016. Opportunities for Canadian blueberries abound. Available from: <https://www.fcc-fac.ca/en/ag-knowledge/ag-economist/opportunities-for-canadian-blueberries-abound.html>. [Accessed 2016 02-17].
- Femenia A, Lefebvre A, Thebaudin J, Robertson J, and Bourgeois C. 1997. Physical and sensory properties of model foods supplemented with cauliflower fiber. *Journal of Food Science* 62(4):635-639.
- Filisetti-Cozzi TMCC and Carpita NC. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197(1):157-162.
- Foegeding EA. 2015. Food Protein Functionality—A New Model. *Journal of Food Science* 80(12):C2670-C2677.
- Foegeding EA, Plundrich N, Schneider M, Campbell C, and Lila MA. 2017. Protein-polyphenol particles for delivering structural and health functionality. *Food Hydrocolloids* 72:163-173.
- Folkenberg DM, Bredie WLP, and Martens M. 1999. Sensory–rheological relationships in instant hot cocoa drinks. *Journal of Sensory Studies* 14(2):181-195.
- Foschia M, Peressini D, Sensidoni A, and Brennan CS. 2013. The effects of dietary fibre addition on the quality of common cereal products. *Journal of Cereal Science* 58(2):216-227.
- Fraeye I, De Roeck A, Duvelter T, Verlent I, Hendrickx M, and Van Loey A. 2007a. Influence of pectin properties and processing conditions on thermal pectin degradation. *Food Chemistry* 105(2):555-563.
- Fraeye I, Duvelter T, Verlent I, Sila DN, Hendrickx M, and Van Loey A. 2007b. Comparison of enzymatic de-esterification of strawberry and apple pectin at elevated pressure by fungal pectinmethylesterase. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8(1):93-101.
- Fraeye I, Knockaert G, Buggenhout SV, Duvelter T, Hendrickx M, and Loey AV. 2009. Enzyme infusion and thermal processing of strawberries: Pectin conversions related to firmness evolution. *Food Chemistry* 114(4):1371-1379.
- Friedman M. 1996. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(1):6-29.
- Gaffney-Stomberg E, Insogna KL, Rodriguez NR, and Kerstetter JE. 2009. Increasing dietary protein requirements in elderly people for optimal muscle and bone health. *Journal of the American Geriatrics Society* 57(6):1073-1079.

- Gentes MC, St-Gelais D, and Turgeon SL. 2010. Stabilization of whey protein isolate–pectin complexes by heat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(11):7051-7058.
- Giese J. 1996. Fats, oils, and fat replacers. *Food Technology* 50(4):77-84.
- Girard M, Sanchez C, Laneuville SI, Turgeon SL, and Gauthier SF. 2004. Associative phase separation of β -lactoglobulin/pectin solutions: a kinetic study by small angle static light scattering. *Colloids and Surfaces Biointerfaces* 35(1):15-22.
- Girard M, Turgeon SL, and Gauthier SF. 2002. Interbiopolymer complexing between β -lactoglobulin and low- and high-methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration. *Food Hydrocolloids* 16(6):585-591.
- Girard M, Turgeon SL, and Gauthier SF. 2003. Quantification of the interactions between beta-lactoglobulin and pectin through capillary electrophoresis analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(20):6043-6049.
- Gorinstein S, Martín-Belloso O, Park Y-S, Haruenkit R, Lojek A, Číž M, Caspi A, Libman I, and Trakhtenberg S. 2001a. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry* 74(3):309-315.
- Gorinstein S, Zachwieja Z, Folta M, Barton H, Piotrowicz J, Zemser M, Weisz M, Trakhtenberg S, and Martín-Belloso O. 2001b. Comparative contents of dietary fiber, total phenolics, and minerals in persimmons and apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(2):952-957.
- Gottschalk M, Nilsson H, Roos H, and Halle B. 2003. Protein self-association in solution: The bovine β -lactoglobulin dimer and octamer. *Protein Science* 12(11):2404-2411.
- Grand View Research. 2016. Functional foods market analysis by product (carotenoids, dietary fibers, fatty acids, minerals, prebiotics & probiotics, vitamins), by application, by end-use (sports nutrition, weight management, immunity, digestive health) and segment forecasts, 2014 to 2024. Available from: <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/functional-food-market>. [Accessed 2017 08-08].
- Grigelmo-Miguel N and Martín-Belloso O. 1999. Comparison of dietary fibre from by-products of processing fruits and greens and from cereals. *LWT-Food Science and Technology* 32(8):503-508.
- Grigor JM, Brennan CS, Hutchings SC, and Rowlands DS. 2016. The sensory acceptance of fibre-enriched cereal foods: A meta-analysis. *International Journal of Food Science & Technology* 51(1):3-13.
- Grymonpré KR, Staggemeier BA, Dubin PL, and Mattison KW. 2001. Identification by integrated computer modeling and light scattering studies of an electrostatic serum albumin-hyaluronic acid binding site. *Biomacromolecules* 2(2):422-429.
- Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Gebhardt S, and Prior RL. 2004. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *The Journal of Nutrition* 134(3):613-617.
- Gündüz K, Serçe S, and Hancock JF. 2015. Variation among highbush and rabbiteye cultivars of blueberry for fruit quality and phytochemical characteristics. *Journal of Food Composition and Analysis* 38:69-79.
- Guyot S, Marnet N, Sanoner P, and Drilleau J-F. 2003. Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(21):6240-6247.
- Ha E and Zemel MB. 2003. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 14(5):251-258.
- Hagerman AE and Butler LG. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry* 256(9):4494-4497.

- Hanlin RL, Hrmova M, Harbertson JF, and Downey MO. 2010. Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16(1):173-188.
- Hasnaoui N, Wathelet B, and Jiménez-Araujo A. 2014. Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: Dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties. *Food Chemistry* 160:196-203.
- Heutink R. 1986. Tomato juices and tomato juice concentrates: A study of factors contributing to their gross viscosity. [Ph.D Thesis]. The Netherlands: Wageningen Agricultural University.
- Hilz H, Bakx EJ, Schols HA, and Voragen AG. 2005. Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries—characterisation in berries, juice, and press cake. *Carbohydrate Polymers* 59(4):477-488.
- Hogan SA, Amp, Apos, Loughlin IB, and Kelly PM. 2016. Soft matter characterisation of whey protein powder systems. *International Dairy Journal* 52:1-9.
- Hogan SA, Chaurin V, O'Kennedy BT, and Kelly PM. 2012. Influence of dairy proteins on textural changes in high-protein bars. *International Dairy Journal* 26(1):58-65.
- Houben K, Jolie RP, Fraeye I, Van Loey A, and Hendrickx M. 2011. Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: Structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. *Carbohydrate Research* 346(9):1105-1111.
- Houben K, Kermani ZJ, Van Buggenhout S, Jolie RP, Van Loey A, and Hendrickx M. 2013. Thermal and high-pressure stability of pectinmethylesterase, polygalacturonase, β -galactosidase and α -arabinofuranosidase in a tomato matrix: towards the creation of specific endogenous enzyme populations through processing. *Food and Bioprocess Technology* 6(12):3368-3380.
- Ibanoglu E. 2005. Effect of hydrocolloids on the thermal denaturation of proteins. *Food Chemistry* 90(4):621-626.
- IFIC Foundation. 2016. Food and Health Survey. Available from: http://www.foodinsight.org/sites/default/files/2016-Food-and-Health-Survey-Report_FINAL1.pdf. [Accessed 2017 06-30].
- IFIC Foundation. 2017a. Food and Health Survey. Available from: http://www.foodinsight.org/sites/default/files/2017_Food_and_Health_Survey_-_Final_Report-rev.pdf. [Accessed 2017 06-30].
- IFIC Foundation. 2017b. Functional foods, sustainability, protein, CRISPR and what's "healthy" among top U.S. food and nutrition trends in 2017. Available from: <http://www.foodinsight.org/new-year-trends-2017-sustainability-functional-foods-coffee-healthy-protein-pasta-whole-grains>. [Accessed 2017 03-06].
- Institut National de Santé Publique du Québec. 2009. La consommation alimentaire et les apports nutritionnels des adultes québécois. Available from: http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/931_rapportnutritionadultes.pdf. [Accessed 2017 06-28].
- IOM. 2005. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington, D.C, USA: National Academies Press.
- Jaramillo DP, Roberts RF, and Coupland JN. 2011. Effect of pH on the properties of soy protein–pectin complexes. *Food Research International* 44(4):911-916.
- Javeri H, Toledo R, and Wicker L. 1991. Vacuum infusion of citrus pectinmethylesterase and calcium effects on firmness of peaches. *Journal of Food Science* 56(3):739-742.

- Jenkins DJ, Kendall CW, Axelsen M, Augustin LS, and Vuksan V. 2000. Viscous and nonviscous fibres, nonabsorbable and low glycaemic index carbohydrates, blood lipids and coronary heart disease. *Current Opinion in Lipidology* 11(1):49.
- Jones OG, Decker EA, and McClements DJ. 2009. Formation of biopolymer particles by thermal treatment of β -lactoglobulin–pectin complexes. *Food Hydrocolloids* 23(5):1312-1321.
- Jones OG, Decker EA, and McClements DJ. 2010a. Thermal analysis of β -lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. *Food Hydrocolloids* 24(2):239-248.
- Jones OG, Lesmes U, Dubin P, and McClements DJ. 2010b. Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of β -lactoglobulin–pectin complexes. *Food Hydrocolloids* 24(4):374-383.
- Jones OG and McClements DJ. 2010. Biopolymer nanoparticles from heat-treated electrostatic protein–polysaccharide complexes: Factors affecting particle characteristics. *Journal of Food Science* 75(2):36-43.
- Ju ZY and Kilara A. 1998. Gelation of pH-aggregated whey protein isolate solution induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(5):1830-1835.
- Kalt W. 2016. Anthocyanins and their role in berry health benefits. *Acta Horticulturae* 1117(1117):191-200.
- Kalt W, Ryan DA, Duy JC, Prior RL, Ehlenfeldt MK, and Vander Kloet S. 2001. Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* section *cyanococcus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10):4761-4767.
- Kamerling JP, Gerwig GJ, Vliegenthart JF, and Clamp JR. 1975. Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochemical Journal* 151(3):491-495.
- Kaombe DD, Lenés M, Toven K, and Glomm W. 2013. Turbiscan as a tool for studying the phase separation tendency of pyrolysis oil. *Energy & Fuels* 27(3):1446-1452.
- Kazmieriski M, Wicker L, and Corredig M. 2003. Interactions of β -lactoglobulin and high-methoxyl pectins in acidified systems. *Journal of Food Science* 68(5):1673-1679.
- Kendall CW, Esfahani A, and Jenkins DJ. 2010. The link between dietary fibre and human health. *Food Hydrocolloids* 24(1):42-48.
- Kinsella JE and Melachouris N. 1976. Functional properties of proteins in foods: A survey. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 7(3):219-280.
- Koopman R, Crombach N, Gijsen AP, Walrand S, Fauquant J, Kies AK, Lemosquet S, Saris WHM, Boirie Y, and van Loon LJC. 2009. Ingestion of a protein hydrolysate is accompanied by an accelerated in vivo digestion and absorption rate when compared with its intact protein. *The American Journal of Clinical Nutrition* 90(1):106-115.
- Kosmala M, Kołodziejczyk K, Markowski J, Mieszczakowska M, Ginies C, and Renard CMGC. 2010. Co-products of black-currant and apple juice production: Hydration properties and polysaccharide composition. *LWT-Food Science and Technology* 43(1):173-180.
- Kosmala M, Milala J, Kołodziejczyk K, Markowski J, Mieszczakowska M, Ginies C, and Renard CMGC. 2009. Characterization of cell wall polysaccharides of cherry (*Prunus cerasus* var. *Schattenmorelle*) fruit and pomace. *Plant Foods for Human Nutrition* 64(4):279-285.
- Kosmala M, Milala J, Kołodziejczyk K, Markowski J, Zbrzeźniak M, and Renard CMGC. 2013. Dietary fiber and cell wall polysaccharides from plum (*Prunus domestica* L.)

- fruit, juice and pomace: Comparison of composition and functional properties for three plum varieties. *Food Research International* 54(2):1787-1794.
- Krall SM and McFeeters RF. 1998. Pectin hydrolysis: Effect of temperature, degree of methylation, pH, and calcium on hydrolysis rates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(4):1311-1315.
- Krzeminski A, Prell KA, Busch-Stockfisch M, Weiss J, and Hinrichs J. 2014a. Whey protein–pectin complexes as new texturising elements in fat-reduced yoghurt systems. *International Dairy Journal* 36(2):118-127.
- Krzeminski A, Prell KA, Weiss J, and Hinrichs J. 2014b. Environmental response of pectin–stabilized whey protein aggregates. *Food Hydrocolloids* 35:332-340.
- Kuhn ME. 2015. Health + Convenience = Market Opportunity. *Food Technology* 11:32-41.
- Kurpad A and Vaz M. 2000. Protein and amino acid requirements in the elderly. *European Journal of Clinical Nutrition* 54(3):S131-S142.
- Labuza TP and Hyman CR. 1998. Moisture migration and control in multi-domain foods. *Trends in Food Science & Technology* 9(2):47-55.
- Lam M, Shen R, Paulsen P, and Corredig M. 2007. Pectin stabilization of soy protein isolates at low pH. *Food Research International* 40(1):101-110.
- Laneuville SI, Paquin P, and Turgeon SL. 2000. Effect of preparation conditions on the characteristics of whey protein—xanthan gum complexes. *Food Hydrocolloids* 14(4):305-314.
- Laneuville SI, Paquin P, and Turgeon SL. 2005. Formula Optimization of a Low-fat Food System Containing Whey Protein Isolate-Xanthan Gum Complexes as Fat Replacer. *Journal of food science* 70(8):s513-s519.
- Le Bourvellec C, Bouchet B, and Renard CMGC. 2005. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochimica et biophysica acta* 1725(1):10-18.
- Le Bourvellec C, Bouzerzour K, Ginies C, Regis S, Plé Y, and Renard CMGC. 2011. Phenolic and polysaccharidic composition of applesauce is close to that of apple flesh. *Journal of Food Composition and Analysis* 24(4-5):537-547.
- Le Bourvellec C, Guyot S, and Renard CMGC. 2004. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material: Part I. Effect of some environmental parameters. *Biochimica et biophysica acta* 1672(3):192.
- Le Bourvellec C, Guyot S, and Renard CMGC. 2009. Interactions between apple (*Malus x domestica* Borkh.) polyphenols and cell walls modulate the extractability of polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 75(2):251-261.
- Le Bourvellec C and Renard CMGC. 2005. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part II: Quantification and impact of cell wall drying. *Biochimica et biophysica acta* 1725(1):1.
- Le Bourvellec C and Renard CMGC. 2012. Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52(3):213-248.
- Le XT, Rioux L-E, and Turgeon SL. 2017. Formation and functional properties of protein–polysaccharide electrostatic hydrogels in comparison to protein or polysaccharide hydrogels. *Advances in Colloid and Interface Science* 239:127-135.
- Lee S, Prosky L, and De Vries J. 1992. Determination of total, soluble, and insoluble dietary fiber in foods: Enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: Collaborative study. *Journal of AOAC International* 75:395-416.
- Lefebvre A and Thebaudin J. 1992. Etude de l'apport de texture par l'association de proteines et de polyosides pour une application en charcuterie. *Viandes et Produits Carnés* 13(2):41-48.

- Lin Z, Fischer J, and Wicker L. 2016. Intermolecular binding of blueberry pectin–rich fractions and anthocyanin. *Food Chemistry* 194:986-993.
- Liu D, Zhou P, Liu X, and Labuza TP. 2011. Moisture-induced aggregation of alpha-lactalbumin: Effects of temperature, cations, and pH. *Journal of Food Science* 76(6):C817-C823.
- Liu H, Xu XM, and Guo SD. 2007. Rheological, texture and sensory properties of low-fat mayonnaise with different fat mimetics. *LWT-Food Science and Technology* 40(6):946-954.
- Loveday SM, Hindmarsh JP, Creamer LK, and Singh H. 2009. Physicochemical changes in a model protein bar during storage. *Food Research International* 42(7):798-806.
- Loveday SM, Hindmarsh JP, Creamer LK, and Singh H. 2010. Physicochemical changes in intermediate-moisture protein bars made with whey protein or calcium caseinate. *Food Research International* 43(5):1321-1328.
- Lozano JE. 2006. Chemical composition of fruits and its technological importance. In: Barbosa-Canovas GV, editor. *Fruit manufacturing: Scientific basis, engineering properties, and deteriorative reactions of technological importance*. Springer, Boston, MA, USA. p. 133-161.
- Lu N, Zhang L, Zhang X, Li J, Labuza TP, and Zhou P. 2016. Molecular migration in high-protein intermediate-moisture foods during the early stage of storage: Variations between dairy and soy proteins and effects on texture. *Food Research International* 82:34-43.
- Lutz R, Aserin A, Wicker L, and Garti N. 2009a. Double emulsions stabilized by a charged complex of modified pectin and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 72(1):121-127.
- Lutz R, Aserin A, Wicker L, and Garti N. 2009b. Structure and physical properties of pectins with block-wise distribution of carboxylic acid groups. *Food Hydrocolloids* 23(3):786-794.
- Mamaliga I, Schabel W, and Kind M. 2004. Measurements of sorption isotherms and diffusion coefficients by means of a magnetic suspension balance. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 43(6):753-763.
- Mann J and Cummings J. 2009. Possible implications for health of the different definitions of dietary fibre. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 19(3):226-229.
- MAPAQ. 2011. Monographie de l'industrie du bleuét au Québec. Available from: <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/md/Publications/Pages/Details-Publication.aspx?guid=%7B1065ff67-2fc3-49fa-83bf-a9dd3a6148bd%7D>. [Accessed 2017 07-07].
- MAPAQ. 2016. Monographie de l'industrie du bleuét sauvage au Québec. Available from: <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Monographiebleuet.pdf>. [Accessed 2017 07-08].
- MAPAQ. 2017. À l'écoute des consommateurs d'aujourd'hui et de demain. Available from: https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Cahier1_Sommet_Alimentation.pdf. [Accessed 2017 07-01].
- Maroziane A and De Kruif C. 2000. Interaction of pectin and casein micelles. *Food Hydrocolloids* 14(4):391-394.
- Marques TR, Corrêa AD, de Carvalho Alves AP, Simão AA, Pinheiro ACM, and de Oliveira Ramos V. 2014. Cereal bars enriched with antioxidant substances and rich in fiber, prepared with flours of acerola residues. *Journal of Food Science and Technology* 52(8):5084-5092.
- Massiot P, Baron A, and Drilleau JF. 1996. Effect of storage of apple on the enzymatic hydrolysis of cell wall polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 29(4):301-307.

- Mattison KW, Brittain IJ, and Dubin PL. 1995. Protein-polyelectrolyte phase boundaries. *Biotechnology Progress* 11(6):632-637.
- McGill CR, Fulgoni VL, and Devareddy L. 2015. Ten-year trends in fiber and whole grain intakes and food sources for the united states population: national health and nutrition examination survey 2001–2010. *Nutrients* 7(2):1119-1130.
- McMahon DJ, Adams S, and McManus W. 2009. Hardening of high-protein nutrition bars and sugar/polyol–protein phase separation. *Journal of Food Science* 74(6):E312-E321.
- Melton LD and Smith BG. 2001a. Determination of the uronic acid content of plant cell walls using a colorimetric assay. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* E:E3:E3.3.
- Melton LD and Smith BG. 2001b. Determining the degree of methylation and acetylation of pectin. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.
- Méric É. 2012. Compréhension des effets matrices de boissons à base de jus de fruits enrichies en ingrédients protéiques sur la stabilité de ces jus et évaluation in vivo et in vitro de l'impact de cet enrichissement protéique sur le système glycémique. [Ph.D Thesis]. Québec, Canada: Université Laval.
- Mir MA and Nath N. 1995. Sorption isotherms of fortified mango bars. *Journal of Food Engineering* 25(1):141-150.
- Mleko S. 1999. Effect of protein concentration on whey protein gels obtained by a two-stage heating process. *European Food Research and Technology* 209(6):389-392.
- Moelants KRN, Jolie RP, Palmers SKJ, Cardinaels R, Christiaens S, Van Buggenhout S, Van Loey AM, Moldenaers P, and Hendrickx ME. 2013. The effects of process–induced pectin changes on the viscosity of carrot and tomato sera. *Food and Bioprocess Technology* 6(10):2870-2883.
- Mohnen D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11(3):266-277.
- Molyneaux M. 2015. Consumer Protein Trends. Available from: <https://www.naturalproductsinsider.com/articles/2015/10/consumer-protein-trends.aspx>. [Accessed 2017 06-29].
- Montreuil J, Bouquelet S, Debray H, Foumet B, and Strecker SG. 1986. Glycoproteins. In: White CA, Kennedy, J. F., Chaplin, M. F., & Kennedy, J. F, editor. *Carbohydrate analysis : a practical approach*. Oxford, UK: IRL Press. p. 143-204.
- Mouécoucou J, Frémont S, Sanchez C, Villaume C, Moneret-Vautrin D, and Méjean L. 2004a. Allergenicity of peanut protein isolate after in vitro gastric and pancreatic hydrolysis assessed in the presence of plant polysaccharides. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113(2):S151.
- Mouécoucou J, Sanchez C, Villaume C, Marrion O, Frémont S, Laurent F, and Méjean L. 2003. Effects of different levels of gum arabic, low methylated pectin and xylan on in vitro digestibility of β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science* 86(12):3857-3865.
- Mouécoucou J, Villaume C, Sanchez C, and Méjean L. 2004b. β -Lactoglobulin/polysaccharide interactions during in vitro gastric and pancreatic hydrolysis assessed in dialysis bags of different molecular weight cut-offs. *Biochimica et Biophysica Acta* 1670(2):105-112.
- Moyer RA, Hummer KE, Finn CE, Frei B, and Wrolstad RE. 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(3):519-525.
- Mrabet A, Rodríguez-Arcos R, Guillén-Bejarano R, Chaira N, Ferchichi A, and Jiménez-Araujo A. 2012. Dietary fiber from Tunisian common date cultivars (*Phoenix dactylifera* L.): chemical composition, functional properties, and antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(14):3658-3664.

- Nachay K. 2015a. Dairy's Functional Potential. *Food Technology* 1:49-56.
- Nachay K. 2015b. Taking a fresh look at fruits and vegetables. *Food Technology* 10:53-63.
- Naczek M, Grant S, Zadernowski R, and Barre E. 2006. Protein precipitating capacity of phenolics of wild blueberry leaves and fruits. *Food Chemistry* 96(4):640-647.
- Naczek M, Oickle D, Pink D, and Shahidi F. 1996. Protein precipitating capacity of crude canola tannins: Effect of pH, tannin, and protein concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(8):2144-2148.
- Ng A and Waldron KW. 1997. Effect of cooking and pre-cooking on cell-wall chemistry in relation to firmness of carrot tissues. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73(4):503-512.
- Ni L, Lin D, and Barrett DM. 2005. Pectin methylesterase catalyzed firming effects on low temperature blanched vegetables. *Journal of Food Engineering* 70(4):546-556.
- Niba L. 2012. Progress in Fiber-Enriched Foods. *Food Technology* 11:36-43.
- Nicolai T and Durand D. 2013. Controlled food protein aggregation for new functionality. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 18(4):249-256.
- Nielsen KE. 2016. Health beneficial consumer products—status and trends. In: Osborn Sand Morley W, editors. *Developing food products for consumers with specific dietary needs*. Duxford, UK: Woodhead Publishing. p. 15-42.
- Nilsson M, Stenberg M, Frid AH, Holst JJ, and Björck IM. 2004. Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: The role of plasma amino acids and incretins. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80(5):1246-1253.
- Nunan KJ, Sims IM, Bacic A, Robinson SP, and Fincher GB. 1998. Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiology* 118(3):783-792.
- O'Shea N, Arendt EK, and Gallagher E. 2012. Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 16:1-10.
- O'Neill MA and York WS. 2003. The composition and structure of plant primary cell walls. In: Rose JKC, editor. *The plant cell wall*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. p. 1-54.
- Ohr LM. 2014. Savvier Snacking. *Food Technology* 12:71-76.
- Ohr LM. 2015a. Protecting the Aging Brain. *Food Technology* 4:109-114.
- Ohr LM. 2015b. The Rising Status of Superfruits and Super Seeds. *Food Technology* 3:61-66.
- Orrego CE, Salgado N, and Botero CA. 2014. Developments and trends in fruit bar production and characterization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54(1):84-97.
- Osorio O, Martínez-Navarrete N, Moraga G, and Carbonell JV. 2008. Effect of thermal treatment on enzymatic activity and rheological and sensory properties of strawberry purees. *Food Science and Technology International* 14(5_suppl):103-108.
- Ouden FWCD and Vliet TV. 2002. Effect of concentration on the rheology and serum separation of tomato suspensions. *Journal of Texture Studies* 33(2):91-104.
- Ozdal T, Capanoglu E, and Altay F. 2013. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International* 51(2):954-970.
- Padayachee A, Day L, Howell K, and Gidley MJ. 2015. Complexity and health functionality of plant cell wall fibres from fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(1):59-81.

- Paredes-López O, Cervantes-Ceja M, Vigna-Pérez M, and Hernández-Pérez T. 2010. Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality life—A review. *Plant Foods for Human Nutrition* 65(3):299-308.
- Park J, Muhoberac B, Dubin P, and Xia J. 1992. Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation. *Macromolecules* 25(1):290-295.
- Payne TJ. 2010. Bars with blueberries are bars with benefits. *Cereal Foods World* 55(6):280-284.
- Pereyra R, Schmidt KA, and Wicker L. 1997. Interaction and stabilization of acidified casein dispersions with low and high methoxyl pectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(9):3448-3451.
- Pérez S and Mazeau K. 2005. Conformations, structures, and morphologies of celluloses. In: Dumitriu S, editor. *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility*. 2nd ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. p. 41-68.
- Peyron S, Mouécoucou J, Frémont S, Sanchez C, and Gontard N. 2006. Effects of heat treatment and pectin addition on beta-lactoglobulin allergenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(15):5643-5650.
- Phillips GO. 2013. Dietary fibre: A chemical category or a health ingredient? *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 1(1):3-9.
- Prior R, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, Lischner N, Ehlenfeldt M, Kalt W, Krewer G, and Mainland CM. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(7):2686-2693.
- Pritchard SR and Kailasapathy K. 2011. Chemical, physical, and functional characteristics of dairy ingredients. In: Chandan RC and Kilara A, editors. *Dairy Ingredients for Food Processing*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. p. 35-57.
- Proctor A and Peng L. 1989. Pectin transitions during blueberry fruit development and ripening. *Journal of Food Science* 54(2):385-387.
- Purwanti N, van der Goot AJ, Boom R, and Vereijken J. 2010. New directions towards structure formation and stability of protein-rich foods from globular proteins. *Trends in Food Science & Technology* 21(2):85-94.
- Ralet M-C, Bonnin E, and Thibault J-F. 2001. Chromatographic study of highly methoxylated lime pectins deesterified by different pectin methyl-esterases. *Journal of Chromatography Biomedical Sciences and Applications* 753(1):157-166.
- Renard CMGC. 2005. Variability in cell wall preparations: quantification and comparison of common methods. *Carbohydrate Polymers* 60(4):515-522.
- Renard CMGC, Baron A, Guyot S, and Drilleau J-F. 2001. Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *International Journal of Biological Macromolecules* 29(2):115-125.
- Renard CMGC and Ginies C. 2009. Comparison of the cell wall composition for flesh and skin from five different plums. *Food Chemistry* 114(3):1042-1049.
- Renard CMGC, Watrelot AA, and Le Bourvellec C. 2017. Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion. *Trends in Food Science & Technology* 60:43-51.
- Retamales JB and Hancock JF. 2012. Blueberries. Wallingford, Oxfordshire, UK: C.A.B. International.
- Roberfroid M. 1993. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: A review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33(2):103-148.
- Robertson JA, de Monredon FD, Dysseler P, Guillon F, Amado R, and Thibault J-F. 2000. Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: A European collaborative study. *LWT-Food Science and Technology* 33(2):72-79.

- Rodriguez-Mateos A, Cifuentes-Gomez T, Tabatabaee S, Lecras C, and Spencer JPE. 2012. Procyanidin, anthocyanin, and chlorogenic acid contents of highbush and lowbush blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(23):5772-5778.
- Routray W and Orsat V. 2011. Blueberries and their anthocyanins: Factors affecting biosynthesis and properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10(6):303-320.
- Ruxton CHS. 2008. Smoothies: one portion or two? *Nutrition Bulletin* 33(2):129-132.
- Ruxton CHS, Gardner EJ, and Walker D. 2006. Can pure fruit and vegetable juices protect against cancer and cardiovascular disease too? A review of the evidence. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 57(3-4):249-272.
- Salminen H and Weiss J. 2014. Effect of pectin type on association and pH stability of whey protein—pectin complexes. *Food Biophysics* 9(1):29-38.
- Sankaran AK, Nijse J, Bialek L, Shpigelman A, Hendrickx ME, and Van Loey AM. 2015. Enhanced electrostatic interactions in tomato cell suspensions. *Food Hydrocolloids* 43:442-450.
- Santé Canada. 1998. Produits nutraceutiques/aliments fonctionnels et les allégations relatives aux effets sur la santé liées aux aliments. Available from: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/label-etiquet/claims-reclam/nutra-funct_foods-nutra-fonct_aliment-fra.php. [Accessed 2017 07-08].
- Santé Canada. 2012a. Les adultes Canadiens comblent-ils leur besoins en nutriments uniquement grâce à l'alimentation? ; Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/aliments-nutrition/surveillance-aliments-nutrition/sondages-sante-nutrition/enquete-sante-collectivites-canadiennes-escc/adultes-canadiens-comblent-leur-besoins-nutriments-uniquement-grace-alimentation-sante-canada-2012.html>. [Accessed 2017 06-29].
- Santé Canada. 2012b. Politique sur l'étiquetage et la publicité des produits alimentaires contenant des fibres alimentaires. Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/aliments-nutrition/legislation-lignes-directrices/politiques/politique-etiquetage-publicite-produits-alimentaires-contenant-fibres-alimentaires-2012.html#a2>. [Accessed 2017 06-29].
- Santé Canada and Statistique Canada. 2004. Enquête sur la santé dans les collectivités canadiennes, cycle 2.2, Nutrition (2004) : Apports nutritionnels provenant des aliments. Available from: <http://publications.gc.ca/site/fra/309543/publication.html>. [Accessed 2017 06-29].
- Saura-Calixto F. 2012. Concept and health-related properties of nonextractable polyphenols: the missing dietary polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(45):11195.
- Savary BJ and Nuñez A. 2003. Gas chromatography-mass spectrometry method for determining the methanol and acetic acid contents of pectin using headspace solid-phase microextraction and stable isotope dilution. *Journal of Chromatography A* 1017(1-2):151-159.
- Schieber A, Stintzing F, and Carle R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends in Food Science & Technology* 12(11):401-413.
- Schmitt C, Sanchez C, Desobry-Banon S, and Hardy J. 1998. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38(8):689-753.
- Schmitt C and Turgeon SL. 2011. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science* 167(1):63-70.

- Schneeman BO and Gallaher D. 1985. Effects of dietary fiber on digestive enzyme activity and bile acids in the small intestine *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 180(3):409-414.
- Sellappan S, Akoh CC, and Krewer G. 2002. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(8):2432-2438.
- Selvedran RR and Ryden P. 1990. Isolation and analysis of plant cell walls. In: McLaughlin J and Hostettmann K, editors. *Methods in Plant Biochemistry*. London, UK: Academic Press. p. 549-579.
- Siebert KJ. 1999. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(2):353-362.
- Sila D, Van Buggenhout S, Duvetter T, Fraeye I, De Roeck A, Van Loey A, and Hendrickx M. 2009a. Pectins in processed fruits and vegetables: Part II—Structure–function relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8(2):86-104.
- Sila DN, Doungla E, Smout C, Van Loey A, and Hendrickx M. 2006a. Pectin fraction interconversions: Insight into understanding texture evolution of thermally processed carrots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(22):8471-8479.
- Sila DN, Smout C, Elliot F, Van Loey A, and Hendrickx M. 2006b. Non-enzymatic depolymerization of carrot pectin: Toward a better understanding of carrot texture during thermal processing. *Journal of Food Science* 71(1):E1-E9.
- Sila DN, Smout C, Vu ST, Van Loey A, and Hendrickx M. 2005. Influence of pretreatment conditions on the texture and cell wall components of carrots during thermal processing. *Journal of Food Science* 70(2):E85-E91.
- Sila DN, Van Buggenhout S, Duvetter T, Fraeye I, De Roeck A, Van Loey A, and Hendrickx M. 2009b. Pectins in processed fruits and vegetables: Part II—Structure–function relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8(2):86-104.
- Silva JL, Marroquin E, Matta FB, Garner JO, and Stojanovic J. 2005. Physicochemical, carbohydrate and sensory characteristics of highbush and rabbiteye blueberry cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85(11):1815-1821.
- Singleton V and Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3):144-158.
- Siro I, Kopolna E, Kopolna B, and Lugasi A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite* 51(3):456-467.
- Sloan AE. 2015. The top ten food trends. *Food Technology* 4:24-42.
- Smithers GW. 2008. Whey and whey proteins—from 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal* 18(7):695-704.
- Smout C, Sila DN, Vu TS, Van Loey A, and Hendrickx M. 2005. Effect of preheating and calcium pre-treatment on pectin structure and thermal texture degradation: a case study on carrots. *Journal of Food Engineering* 67(4):419-425.
- Soukoulis C, Lebesi D, and Tzia C. 2009. Enrichment of ice cream with dietary fibre: Effects on rheological properties, ice crystallisation and glass transition phenomena. *Food Chemistry* 115(2):665-671.
- Sperber BLHM, Schols HA, Cohen Stuart MA, Norde W, and Voragen AGJ. 2009. Influence of the overall charge and local charge density of pectin on the complex formation between pectin and β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids* 23(3):765-772.

- Stanley DW, Bourne MC, Stone AP, and Wismer WV. 1995. Low Temperature Blanching Effects on Chemistry, Firmness and Structure of Canned Green Beans and Carrots. *Journal of Food Science* 60(2):327-333.
- Stones M. 2016. Top 10 functional food and drink trends from the US. Available from: <http://www.foodmanufacture.co.uk/NPD/Top-10-functional-food-trends>. [Accessed 2017 03-06].
- Sun-Waterhouse D, Nair S, Wibisono R, Wadhwa SS, Massarotto C, Hedderley DI, Zhou J, Jaeger SR, and Corrigan V. 2010a. Insights into smoothies with high levels of fibre and polyphenols: factors influencing chemical, rheological and sensory properties. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 65:276-285.
- Sun-Waterhouse D, Teoh A, Massarotto C, Wibisono R, and Wadhwa S. 2010b. Comparative analysis of fruit-based functional snack bars. *Food Chemistry* 119(4):1369-1379.
- Sun-Waterhouse D. 2011. The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. *International Journal of Food Science & Technology* 46(5):899-920.
- Sundberg A, Sundberg K, Lillandt C, and Holmbom B. 1996. Determination of hemicelluloses and pectins in wood and pulp fibres by acid methanolysis and gas chromatography. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* 11(04):216-219.
- Syrbe A, Bauer W, and Klostermeyer H. 1998. Polymer science concepts in dairy systems—An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal* 8(3):179-193.
- Szajdek A and Borowska E. 2008. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: A review. *Plant Foods for Human Nutrition* 63(4):147-156.
- Takada N and Nelson PE. 1983. Pectin–protein interaction in tomato products. *Journal of Food Science* 48(5):1408-1411.
- Teleszko M and Wojdyło A. 2014. Bioactive compounds vs. organoleptic assessment of 'smoothies'-type products prepared from selected fruit species. *International Journal of Food Science & Technology* 49(1):98-106.
- Thakur BR, Singh RK, and Handa AK. 1996. Effect of added soy protein on the quality of tomato sauce. *Journal of Food Processing and Preservation* 20(2):169-176.
- Thongkaew C, Gibis M, Hinrichs J, and Weiss J. 2014. Polyphenol interactions with whey protein isolate and whey protein isolate–pectin coacervates. *Food Hydrocolloids* 41:103-112.
- Thongkaew C, Hinrichs J, Gibis M, and Weiss J. 2015. Sequential modulation of pH and ionic strength in phase separated whey protein isolate – Pectin dispersions: Effect on structural organization. *Food Hydrocolloids* 47:21-31.
- Tiziani S and Vodovotz Y. 2005. Rheological effects of soy protein addition to tomato juice. *Food Hydrocolloids* 19(1):45-52.
- Tolstoguzov VB. 1991. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids* 4(6):429-468.
- Tolstoguzov VB. 1996. Structure—property relationships in foods. *Macromolecular Interactions in Food Technology* 650:2-14.
- Tolstoguzov VB. 1997. Protein–polysaccharide interactions. In: Damodaran Sand Paraf A, editors. *Food proteins and their applications*. New York, USA: Marcel Dekker. p. 171-198.
- Tolstoguzov VB. 2003. Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids* 17(1):1-23.
- Tolstoguzov VB and McClements DJ. 2007. Ingredient interactions in complex foods: aggregation and phase separation. *Understanding and Controlling the Microstructure of Complex Foods*:185-206.

- Tromp RH, de Kruif CG, van Eijk M, and Rolin C. 2004. On the mechanism of stabilisation of acidified milk drinks by pectin. *Food Hydrocolloids* 18(4):565-572.
- Turgeon SL, Beaulieu M, Schmitt C, and Sanchez C. 2003. Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 8(4):401-414.
- Turgeon SL and Laneuville SI. 2009. Protein + polysaccharide coacervates and complexes: from scientific background to their application as functional ingredients in food products. In: Kasapis S, Norton IT, and Ubbink JB, editors. *Modern biopolymer science: Bridging the divide between fundamental treatise and industrial application*. London, UK, Burlington, MA, San Diego, CA, USA: Academic Press. p. 327-363.
- USDA. 2017. USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Available from: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>. [Accessed 2017 07-09].
- Van Buggenhout S, Sila DN, Duvetter T, Van Loey A, and Hendrickx M. 2009. Pectins in processed fruits and vegetables: Part III—Texture engineering. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8(2):105-117.
- Veldhorst M, Smeets A, Soenen S, Hochstenbach-Waelen A, Hursel R, Diepvens K, Lejeune M, Luscombe-Marsh N, and Westerterp-Plantenga M. 2008. Protein-induced satiety: effects and mechanisms of different proteins. *Physiology & Behavior* 94(2):300-307.
- Vicente AR, Ortugno C, Rosli H, Powell AL, Greve LC, and Labavitch JM. 2007. Temporal sequence of cell wall disassembly events in developing fruits. 2. Analysis of blueberry (*Vaccinium* species). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(10):4125-4130.
- Vidal S, Williams P, O'Neill MA, and Pellerin P. 2001. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 45(4):315-323.
- Vidhya R and Narain A. 2011. Development of preserved products using under exploited fruit wood apple (*Limonia Acidissima*). *American Journal of Food Technology* 6(4):279-288.
- Wagoner TB and Foegeding EA. 2017. Whey protein-pectin soluble complexes for beverage applications. *Food Hydrocolloids* 63:130-138.
- Wang Q and Qvist K. 2000. Investigation of the composite system of β -lactoglobulin and pectin in aqueous solutions. *Food Research International* 33(8):683-690.
- Wang X, Lee J, Wang Y-W, and Huang Q. 2007. Composition and rheological properties of β -lactoglobulin/pectin coacervates: Effects of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. *Biomacromolecules* 8(3):992-997.
- Weinbreck F, De Vries R, Schrooyen P, and De Kruif CG. 2003. Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. *Biomacromolecules* 4(2):293-303.
- Weng-Sherng C, Henry G, Gaud S, Miller M, Kaiser E, Balmadeca E, Morgan R, Baer C, Borwankar R, and Helgeth L, inventors; Google Patents, assignee. 1989. Microfragmented ionic polysaccharide/protein complexes dispersions. EP 0340035 A2.
- Westerterp-Plantenga MS, Lemmens SG, and Westerterp KR. 2012. Dietary protein - its role in satiety, energetics, weight loss and health. *The British Journal of Nutrition* 108(S2):S105-S112.
- Westerterp-Plantenga MS, Nieuwenhuizen A, Tomé D, Soenen S, and Westerterp KR. 2009. Dietary Protein, Weight Loss, and Weight Maintenance. *Annual Review of Nutrition* 29:21-41.
- Wilkinson C, Dijksterhuis G, and Minekus M. 2000. From food structure to texture. *Trends in Food Science & Technology* 11(12):442-450.

- Willats WG, McCartney L, Mackie W, and Knox JP. 2001. Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* 47(1-2):9-27.
- Wolfe RR, Miller SL, and Miller KB. 2008. Optimal protein intake in the elderly. *Clinical Nutrition* 27(5):675-684.
- Wood FW and Goff TC. 1973. The determination of the effective shear rate in the brabender viscograph and in other systems of complex geometry. *Starch/Stärke* 25(3):89-91.
- Wyers R. 2016. Healthy snacks & bars: Fresh opportunities for growth. Available from: http://www.nutraceuticalsworld.com/issues/2016-01-01/view_features/healthy-snacks-bars-fresh-opportunities-for-growth. [Accessed 2017 03-06].
- Ye A. 2008. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications—A review. *International Journal of Food Science & Technology* 43(3):406-415.
- You Q, Wang B, Chen F, Huang Z, Wang X, and Luo PG. 2011. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. *Food Chemistry* 125(1):201-208.
- Zhou P, Guo M, Liu D, Liu X, and Labuza TP. 2013. Maillard-reaction-induced modification and aggregation of proteins and hardening of texture in protein bar model systems. *Journal of Food Science* 78(3):C437-C444.
- Zhou P and Labuza T. 2007. Effect of water content on glass transition and protein aggregation of whey protein powders during short-term storage. *Food Biophysics* 2(2):108-116.
- Zhou P, Liu X, and Labuza TP. 2008a. Effects of moisture-induced whey protein aggregation on protein conformation, the state of water molecules, and the microstructure and texture of high-protein-containing matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(12):4534-4540.
- Zhou P, Liu X, and Labuza TP. 2008b. Moisture-induced aggregation of whey proteins in a protein/buffer model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(6):2048-2054.

Annexes

Annexe 1. Matériel supplémentaire pour le chapitre 2

Annex 1-1. Physicochemical characteristics and composition (g/100 g dry weight) of highbush blueberry cultivars in 2015

	Patriot	Polaris
Physicochemical characteristics		
pH	3.1 ± 0.1 ^b	3.6 ± 0.0 ^a
ST/TA	14.6 ± 0.1	24.1 ± 0.1
Composition		
Moisture	87.4 ± 0.0 ^b	88.8 ± 0.0 ^a
Protein	2.4 ± 0.0 ^b	4.2 ± 0.0 ^a
Lipid	0.53 ± 0.02 ^b	1.40 ± 0.01 ^a
Ash	0.9 ± 0.0 ^b	1.1 ± 0.0 ^a
TDF	11.8 ± 0.1 ^b	20.6 ± 0.0 ^a
IDF	9.0 ± 0.1 ^b	16.5 ± 0.3 ^a
SDF	2.8 ± 0.2 ^b	4.0 ± 0.3 ^a
AIR	14.0 ± ND	23.9 ± ND
GalA ¹	3.7 ± 0.2 ^b	5.9 ± 0.0 ^a
DM (%)	44 ± 2 ^a	41 ± 4 ^a

Mean value ± standard deviation. Means within a line followed by the same letter (a–b) were not significantly different according to the Tukey's test ($\alpha = 0.05$). SS/TA represents the sugar/acid ratio. TA: Titratable acidity (% citric acid). SS: Soluble solids (°Brix). TDF: Total dietary fiber. IDF: Insoluble dietary fiber. SDF: Soluble dietary fiber. AIR: Alcohol-insoluble residue. DM: Degree of methylation from AIR. ND: not determined.

¹ Galacturonic acid from AIR, as an estimate of pectin content.

Annex 1-2. Rheological properties and mean particle size (D[4,3]) of the heat-treated purees

Purees	Yield stress (Pa)	Viscosity (Pa.s)	Rate index	D[4,3] (μm)
PaP	2.8 \pm 0.3	1.2 \pm 0.0	0.52 \pm 0.00	535 \pm 37
PaLTB+P	2.5 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1	0.54 \pm 0.01	541 \pm 49
PoP	5.1 \pm 0.4	3.3 \pm 0.2	0.48 \pm 0.01	703 \pm 58
PoLTB+P	4.9 \pm 0.4	3.1 \pm 0.5	0.48 \pm 0.02	697 \pm 44
Cult	*	*	*	*
HT	n.s	n.s	n.s	n.s
Cult * HT	n.s	n.s	n.s	n.s

Mean value \pm standard deviation. Results of the two-way ANOVAs (cultivar (Cult) and heat treatment effects (HT), with interaction); n.s: not significant ($P > 0.05$). Yield stress, viscosity, and rate index were obtained from the Herschel-Bulkley modelling of the up flow sweep. The D[4,3] corresponded to the volume mean diameter. Pa: Patriot. Po: Polaris. P: pasteurization. LTB+P: low-temperature blanching + pasteurization.

Annex 1-3. Abundant pectin-associated monosaccharide composition (%) of the pectin-rich fractions (WSP, CSP, and NSP), measured as trimethylsilyl derivatives after acidic methanolysis and subsequent GC analysis

Purees	Rha	Ara	Gal	GalA	GalA Rha+Ara+Gal
WSP					
PaP	1.3 ± 0.1	15.6 ± 0.3	22.7 ± 1.9	54.9 ± 2.0	1.4 ± 0.1
PaLTB+P	1.3 ± 0.1	15.8 ± 1.4	21.0 ± 1.4	56.7 ± 0.4	1.5 ± 0.0
PoP	1.3 ± 0.2	11.1 ± 1.8	9.3 ± 0.7	74.1 ± 1.5	3.4 ± 0.3
PoLTB+P	1.3 ± 0.1	11.2 ± 0.6	10.6 ± 1.2	72.3 ± 2.2	3.2 ± 0.4
Cult	n.s	*	*	*	*
HT	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
Cult * HT	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
CSP					
PaP	0.9 ± 0.1	5.3 ± 1.1	9.9 ± 1.1	81.4 ± 2.3	5.1 ± 0.8
PaLTB+P	0.9 ± 0.1	5.6 ± 0.5	10.3 ± 0.6	80.3 ± 1.0	4.8 ± 0.3
PoP	0.8 ± 0.1	3.7 ± 0.8	4.9 ± 1.1	87.9 ± 1.1	9.5 ± 1.5
PoLTB+P	0.8 ± 0.2	3.4 ± 1.0	3.7 ± 0.1	89.9 ± 1.3	11.7 ± 2.0
Cult	n.s	*	*	*	*
HT	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
Cult * HT	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
NSP					
PaP	1.3 ± 0.1	9.6 ± 1.1	18.0 ± 1.5 ^b	64.4 ± 2.9 ^b	2.3 ± 0.3
PaLTB+P	1.4 ± 0.2	10.9 ± 2.0	22.5 ± 0.7 ^a	56.6 ± 1.2 ^c	1.6 ± 0.1
PoP	1.5 ± 0.2	8.4 ± 2.0	17.5 ± 0.8 ^b	68.5 ± 2.5 ^a	2.5 ± 0.3
PoLTB+P	1.5 ± 0.3	8.1 ± 1.5	18.0 ± 1.1 ^b	68.8 ± 0.7 ^a	2.5 ± 0.1
Cult	n.s	n.s			*
HT	n.s	n.s			*
Cult * HT	n.s	n.s	*	*	n.s

Mean value ± standard deviation. Results of the two-way ANOVAs (cultivar (Cult) and heat treatment effects (HT), with interaction); n.s: not significant ($P > 0.05$). When interaction is significant (*), means within a column, for the same fraction, followed by the same letter (a–c) were not significantly different according to Tukey's test ($\alpha = 0.05$). WSP: water-soluble fraction. CSP: chelator-soluble pectin. NSP: sodium carbonate-soluble pectin. Pa: Patriot. Po: Polaris. P: pasteurization. LTB+P: low-temperature blanching + pasteurization. Rha: Rhamnose. Ara: Arabinose. Gal: Galactose. GalA: Galacturonic acid.

Annexe 2. Matériel supplémentaire pour le chapitre 3

Annex 2-1. Smoothie formulations

Ingredients (g/100 g)	Smoothies		
	S0	S0.5	S5
Blueberry puree	90	89.5	85
WPI	0	0.5	5
Apple juice	10	9.9	7.9
Acid citric	0	0.1	2.1

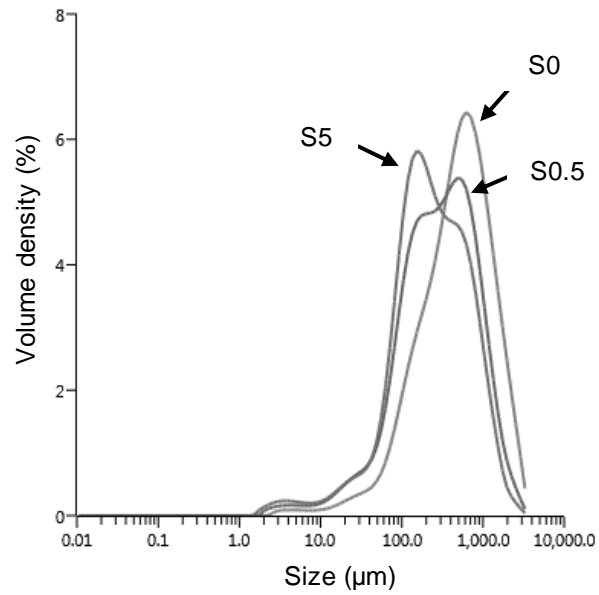
S0: smoothie without WPI. S0.5: smoothie with 0.5% of WPI. S5: smoothie with 5% of WPI.

Annex 2-2. Smoothie composition (g/serving of 250 g) and energy value

	S0	S0.5	S5
Protein	0.8 ± 0.0 ^c	1.8 ± 0.1 ^b	10.6 ± 0.2 ^a
Total fiber	5.5 ± 0.4 ^a	5.7 ± 0.3 ^a	5.4 ± 0.5 ^a
Ash	0.3 ± 0.0 ^c	0.4 ± 0.0 ^b	0.6 ± 0.0 ^a
Lipid	0.1 ± 0.0 ^b	0.2 ± 0.0 ^{ab}	0.2 ± 0.0 ^a
Carbohydrate	19.6 ± 0.5	19.2 ± 0.4	19.2 ± 0.7
Energy value	94 kcal	97 kcal	132 kcal

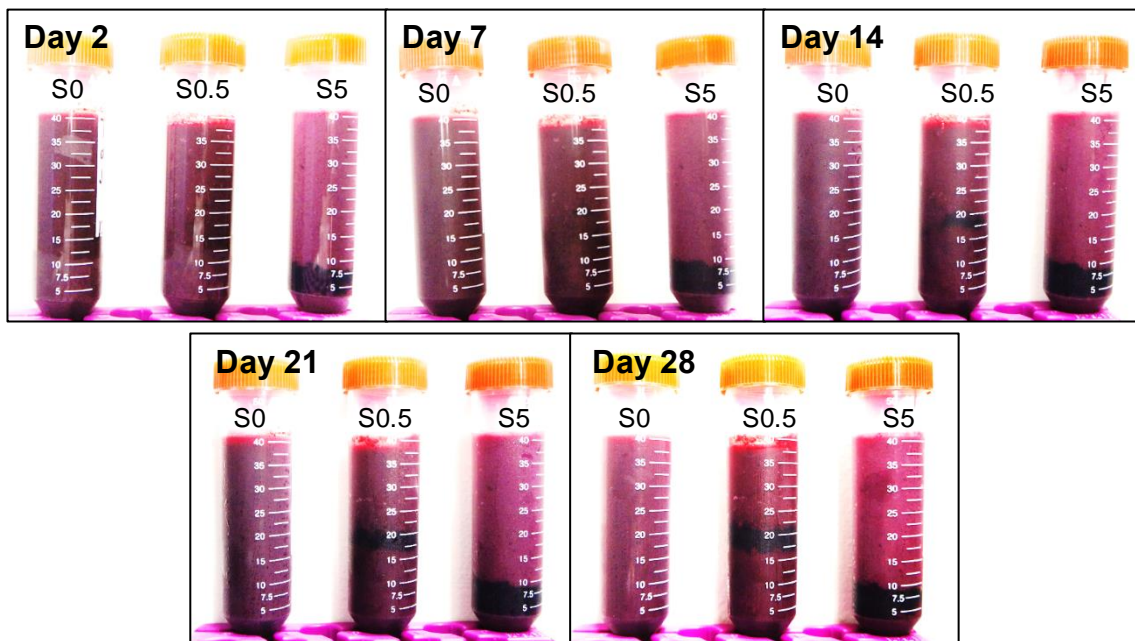
Means ± standard deviation. Means within a line followed by the same letter (a–c) were not significantly different according to the Tukey's test ($\alpha = 0.05$). Carbohydrate = total solids - (protein + lipid + ash + fiber). Energy value: carbohydrate = 4.0 kcal/g, lipid = 9.0 kcal/g, protein = 4.0 kcal/g, and fiber = 2.0 kcal/g. S0: smoothie without WPI. S0.5: smoothie with 0.5% of WPI. S5: smoothie with 5% of WPI.

Annex 2-3. Particle size distribution of the smoothies measured using a laser diffraction analyzer



S0: smoothie without WPI. S0.5: smoothie with 0.5% of WPI. S5: smoothie with 5% of WPI.

Annex 2-4. Visual observation of the smoothies over storage time (days at 4°C)



S0: smoothie without WPI. S0.5: smoothie with 0.5% of WPI. S5: smoothie with 5% of WPI. Day 2: two days after the smoothie manufacturing.

Annexe 3. Matériel supplémentaire pour le chapitre 4

Annex 3-1. Bar formulations

Ingredients (g/100 g)	Bars	
	NC	C
WPI	19	50
Blueberry powder	30	50
Crushed dates	45	45
Almonds	5	5
Water	1	0

NC: non-complexed. C: complexed.