

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

MISE AU POINT ET CARACTÉRISATION D'UNE BOISSON FERMENTÉE ENRICHIE EN PROTÉINES VÉGÉTALES

par

Johanne Manus

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès *sciences* (M.Sc.)
en Microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	Philippe Constant, <i>Ph. D.</i> INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	George Szatmari, <i>Ph. D.</i> Université de Montréal
Directeur de recherche	Monique Lacroix, <i>Ph. D.</i> INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Mathieu Millette, <i>Ph. D.</i> Bio-K Plus
Codirecteur de recherche	Blanca Aguilar, <i>Ph. D.</i> Universidad de Guadalajara

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, Pr. Monique Lacroix, qui m'a accepté tout d'abord en tant que stagiaire puis qui m'a donné l'opportunité de réaliser ma maîtrise dans son laboratoire. Je la remercie pour son encadrement durant ces deux années, pour ses idées, ses conseils et ses critiques qui ont fait avancer ce projet.

Je souhaite également remercier mon codirecteur, Mathieu Millette, qui a su m'encourager et apporter son aide et son expertise dans ce projet.

Merci également à ma codirectrice Blanca Aguilar pour sa présence et son aide. Merci à elle de nous avoir accueilli dans son laboratoire à l'Université de Guadalajara.

Je tiens à remercier Fettah Rezzouk et Meriem Haddi pour leur collaboration et leurs disponibilités tout au long du projet et spécialement pour la mise au point des formulations. J'aimerais aussi remercier toute l'équipe du laboratoire de recherche de Bio-K Plus qui m'a aidé lors de mes dernières manipulations.

Merci à Behnoush Maherani qui m'a encadré, aidé et motivé pendant les 6 premiers mois de ma maîtrise. Un grand merci à Stéphane Salmieri pour son soutien, sa disponibilité et sa bonne humeur.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du laboratoire RESALA avec qui ça a été un grand plaisir de travailler, et particulièrement Alexandra, Chaima, Valérie et Yosra pour leur immense gentillesse et leur soutien.

Pour m'avoir toujours soutenu et encouragé, et sans qui je ne serais pas au Québec aujourd'hui, un grand merci à mes parents, vous êtes les meilleurs. Merci aussi à mes sœurs que j'adore et qui me manque énormément. Merci à mes amis d'ici, ma famille d'adoption, qui ont su m'épauler pendant les meilleurs comme les pires moments. Pour leur soutien malgré la distance, je remercie mes malouins préférés.

Finalement, avec tout mon amour je tiens à remercier mon compagnon qui m'a soutenue tout le long de ma maîtrise, m'a motivé pendant les moments de doutes, m'a supporté, m'a fait rire, et m'a donné beaucoup d'amour, merci, t'es le meilleur.

RÉSUMÉ

Le marché des aliments fonctionnels, comprenant les produits probiotiques et les produits enrichis en protéines, est en pleine croissance ces dernières années. La majorité de ces aliments est à base de produits laitiers, or dû à l'intolérance au lactose, au véganisme ou encore par conscience environnementale, de plus en plus de consommateurs se tournent vers des alternatives végétales. Cependant, les protéines végétales sont dites « incomplètes » de par leurs déficiences en acides aminés essentiels (AAE). La plupart du temps, les légumineuses sont déficientes en méthionine et les céréales en lysine. En combinant ces deux types de protéines, l'apport en AAE peut être complet. En revanche, l'autre inconvénient des protéines végétales est qu'elles ont une digestibilité plus faible que les protéines animales. Des recherches ont montré que la fermentation lactique pouvait améliorer la digestibilité des protéines végétales, notamment par la réduction des facteurs antinutritionnels tels que les inhibiteurs à trypsine ou les phytates. Aussi, certains *Lactobacillus* spp. sont capables d'hydrolyser les protéines en peptides, qui sont plus facilement assimilables. Toutefois, cette activité protéolytique diffère d'une souche à l'autre. Très peu d'études ont évalué l'influence de la fermentation par des probiotiques sur la digestibilité et sur la qualité nutritive d'un mélange de protéines végétales, combinant une légumineuse et une céréale.

L'objectif de ce projet de maîtrise, était de développer une boisson fonctionnelle riche en probiotiques et en protéines végétales. Pour ce faire, une boisson Bio-K+^{MD}, contenant la combinaison de probiotiques *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lacticaseibacillus (Lactobacillus) casei* LBC80R et *Lacticaseibacillus (Lactobacillus) rhamnosus* CLR2, a été utilisée et associée à des mélanges spécifiques de protéines. La première boisson a été enrichie en protéines de pois et de riz et contient 13% de protéines totales. La seconde boisson a été enrichie en protéines de chanvre et de pois pour 11% de protéines totales. Ces mélanges ont été sélectionnés afin d'avoir un apport complet en AAE, selon les spécifications de l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).

Dans un premier temps, les profils peptidiques des deux boissons fermentées développées, ainsi que leurs digestibilités *in vitro* ont été analysés, et comparés aux mêmes boissons non-fermentées ou non-enrichies en protéines, afin d'analyser à la fois l'effet de la fermentation lactique sur les protéines et l'effet de l'enrichissement en protéines. Suites à ces analyses, une des boissons a été choisie et sa qualité protéique a été déterminée *in vivo*. Pour finir, des analyses physicochimiques, microbiologiques et sensorielles ont été effectuées tout au long du stockage sur cette même boisson sélectionnée.

L'analyse des profils peptidiques a démontré que la fermentation permettait, pour les produits enrichis en protéines, une grande réduction des peptides de hauts poids moléculaires et une grande augmentation des peptides de petits poids moléculaires. Les résultats de digestibilité *in vitro* ont montré que les boissons enrichies en protéines avaient une digestibilité significativement plus élevée que la boisson non-enrichie et que la fermentation avait permis d'améliorer la digestibilité de la boisson enrichie en protéines de pois et de riz (PR). Également, l'étude *in vivo* a permis de démontrer que la fermentation pouvait augmenter significativement le coefficient d'efficacité protéique de la boisson PR, et donc sa qualité nutritive. En revanche, la fermentation n'a pas eu d'effet sur la digestibilité *in vivo*. L'étude au cours du stockage à 4 °C a démontré quelques changements physicochimiques, tels qu'une augmentation de la viscosité et de l'acidité titrable mais ces changements n'ont pas impacté l'appréciation sensorielle du produit, qui était principalement apprécié pour sa texture. Pour finir, la boisson PR a maintenu une grande concentration de probiotiques viables pendant le stockage à 4 °C, avec 8,4 log₁₀ UFC/mL après 143 jours.

Les résultats obtenus dans cette étude ont permis de démontrer qu'une boisson fermentée à base de protéines végétales pouvait avoir une très bonne qualité nutritive. La boisson développée, enrichie en protéines de pois et de riz permet de répondre à la demande des consommateurs qui sont à la recherche d'aliments ayant des bienfaits sur la santé ainsi que des bonnes valeurs nutritionnelles. Ce produit pourrait être adapté pour plusieurs types d'individus, tels que les sportifs, les personnes âgées, les personnes véganes, ou encore les personnes intolérantes au lactose.

ABSTRACT

The functional foods market, including probiotic and protein-enriched products, has been growing in recent years. The majority of these foods are dairy-based, but due to lactose intolerance, veganism or environmental awareness, more and more consumers are turning to plant-based alternatives. However, plant-based proteins are said to be "incomplete" because of their deficiencies in essential amino acids (EAA). Most of the time, legumes are deficient in methionine and cereals in lysine. By combining these two types of proteins, the intake of EAA can be complete. On the other hand, the other disadvantage of plant-based proteins is that they have a lower digestibility than animal proteins. Research has shown that lactic acid fermentation can improve the digestibility of plant-based proteins, particularly by reducing anti-nutritional factors such as phytic acid or trypsin inhibitors. Also, some *Lactobacillus* spp. hydrolyze proteins into peptides, which are more easily assimilated. However, this proteolytic activity differs from one strain to another. Very few studies have evaluated the influence of probiotic fermentation on the digestibility and on the nutritional quality of a mixture of plant-based proteins, combining a legume and a cereal.

The objective of this project was to develop a functional beverage rich in probiotics and plant-based proteins. For this purpose, a Bio-K+™ probiotic drink, containing the combination of probiotics *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lacticaseibacillus (Lactobacillus) casei* LBC80R and *Lacticaseibacillus (Lactobacillus) rhamnosus* CLR2, was associated with specific protein combinations. The first beverage was enriched with pea and rice protein and contained 13% total protein. The second beverage was enriched with hemp and pea protein for 11% total protein. These blends have been selected to have a complete EAA intake, according to Food and Agriculture Organization (FAO) specifications.

In a first step, the peptide profiles of the two fermented beverages, as well as their *in vitro* digestibility, were analyzed and compared to the same non-fermented or non-protein-enriched beverages in order to analyze both the effect of lactic acid fermentation on proteins and the effect of protein enrichment. Following these analyses, one of the beverages was selected and its protein quality was determined *in vivo*. Finally, physicochemical, microbiological and sensory analyses were carried out throughout storage at 4°C on the same selected beverage.

The analysis of peptide profiles showed that, for protein-enriched products, the fermentation process resulted in a large reduction of high molecular weight peptides and a large increase in low molecular weight peptides. *In vitro* digestibility results showed that the protein-enriched

beverages had significantly higher digestibility than the non-enriched beverage and that fermentation improved the digestibility of the pea and rice protein-enriched beverage (PR). Also, the *in vivo* study demonstrated that fermentation could significantly increase the protein efficiency ratio of the PR beverage, and thus its nutritional quality. On the other hand, fermentation had no effect on *in vivo* digestibility. The study during storage showed some physicochemical changes, such as an increase in viscosity and titratable acidity, but these changes did not impact the sensory appreciation of the product over time, which was mainly appreciated for its texture. Finally, the beverage PR maintained a high concentration of viable probiotics during storage at 4 °C, with 8.4 log₁₀ CFU/mL after 143 days.

The results obtained in this study demonstrated that a fermented beverage made of plant-based proteins could have a very good nutritional quality. This beverage, enriched with pea and rice proteins, meets the demand of consumers who are looking for foods with health benefits as well as good nutritional values. This product could be adapted for several types of individuals, such as athletes, the elderly, vegans, or people who are lactose intolerant.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE	1
1. Introduction	1
2. Les aliments fonctionnels	2
2.1. Les produits enrichis en protéines	2
2.2. Les probiotiques.....	4
3. La valeur nutritionnelle des protéines	6
3.1. Fonctions et Besoins	6
3.2. Facteurs d'évaluation de la qualité d'une protéine	8
3.3. Les facteurs antinutritionnels.....	12
3.4. Allégations nutritionnelles.....	13
4. Propriétés des protéines végétales	14
4.1. Contexte mondial	14
4.2. La qualité des protéines végétales opposée à celle des protéines animales	15
4.3. Les protéines de riz brun.....	17
4.4. Les protéines de pois	18
4.5. Les protéines de chanvre	21
5. La fermentation	22
5.1. Définition	22
5.2. Impact sur les protéines et sur la digestibilité	23
5.3. Effets sur les propriétés fonctionnelles et sensorielles.....	25
6. Hypothèses, objectifs et moyens	25
6.1. Problématiques	25
6.2. Hypothèses.....	26
6.3. Objectifs.....	26
6.4. Moyens pour attendre les objectifs.....	27
Références.....	29
CHAPITRE 2: SÉLECTION DES BOISSONS FERMENTÉES ENRICHIES EN PROTÉINES VÉGÉTALES.....	49

1. Contenu en protéines et en acides aminés.....	49
2. Indice chimique	50
3. Composition des mélanges de protéines.....	51
4. Estimation des Coefficients d'Efficacité Protéique	53
5. Conclusion	54
Références.....	55
CHAPITRE 3: <i>IN VITRO</i> PROTEIN DIGESTIBILITY AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA FERMENTED BEVERAGES ENRICHED WITH PLANT PROTEINS	57
Résumé.....	58
Abstract.....	60
1. Introduction	61
2. Materials and methods	62
2.1. Materials	62
2.2. Amino acid composition	63
2.3. Preparation of the beverages	63
2.4. Product characterization.....	63
2.5. Microbial analysis.....	64
2.6. Determination of peptides molecular weight distribution by Size Exclusion-High Performance Liquid Chromatography (SEC-HPLC)	64
2.7. <i>In vitro</i> digestion procedure	64
2.8. Determination of soluble nitrogen release	65
2.9. Statistical analysis.....	65
3. Results and discussion.....	65
3.1. Amino acid score.....	65
3.2. Product characterization.....	66
3.3. Molecular weight distribution	68
3.4. <i>In vitro</i> protein digestibility	71
4. Conclusion	74
References.....	76

CHAPITRE 4: PROTEIN QUALITY OF A PROBIOTIC BEVERAGE ENRICHED IN PEA AND RICE PROTEINS	83
Résumé.....	84
Abstract.....	86
1. Introduction	87
2. Materials and methods	88
2.1. Materials	88
2.2. Preparation of beverages	89
2.3. Diet formulation	89
2.4. Animal experiment and biological assay	90
2.5. Quantification of probiotics	91
2.6. Statistical analysis	91
3. Results and discussion.....	92
3.1. Animal growth and protein efficiency ratio	92
3.2. In vivo digestibility and PDCAAS	94
3.3. Probiotic bacteria concentration	95
4. Conclusion	96
Conflicts of interest	96
References.....	97
CHAPITRE 5: PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND SENSORIAL APPRECIATION OF A NEW FERMENTED PROBIOTIC BEVERAGE ENRICHED WITH PEA AND RICE PROTEINS	104
Résumé.....	105
Abstract.....	107
1. Introduction	108
2. Materials and methods	109
2.1. Materials	109
2.2. Preparation of the beverages	109
2.3. Product characterization.....	109
2.4. Determination of peptide molecular weight distribution by Size Exclusion-High Performance Liquid Chromatography (SEC-HPLC)	110

2.5. Microbial analysis	111
2.6. Sensory analysis	111
2.7. Statistical analysis	111
3. Results and discussion	111
3.1. Physico-chemical analysis	111
3.2. Molecular weight distribution	115
3.3. Microbiological analysis	117
3.4. Sensory analysis	119
4. Conclusion	120
References	121
CHAPITRE 6 : DISCUSSION GÉNÉRALE	126
1. Sélection des boissons	126
2. Analyses <i>in vitro</i>	127
2.1. Caractérisation des produits	127
2.2. Digestion <i>in vitro</i>	129
3. Analyses <i>in vivo</i>	131
4. Analyses au cours du stockage	133
4.1. Analyse du pH et de l'acidité titrable	133
4.2. Analyse de la viscosité	133
4.3. Analyse de la couleur	133
4.4. Analyse des profils peptidiques	134
4.5. Analyses microbiologiques	134
4.6. Analyses sensorielles	135
CHAPITRE 7 : CONCLUSION GÉNÉRALE	135
Références	137

LISTE DES FIGURES

Figure 1–Molecular weight distribution of fermented and non-fermented Control (a), PR (b) and PH (c) beverage.	69
Figure 2–Percentage of nitrogen released from non-fermented (NF) and fermented (F) Control, PR and PH beverages during the <i>in vitro</i> digestion.....	72
Figure 3–pH and titratable acidity (%) of fermented control beverage (CF) and fermented pea-rice beverage (PRF) during storage at 4 °C for 143 days.	112
Figure 4–Molecular weight distribution of non-fermented control (CNF) (a), fermented control (CF) (b), non-fermented pea-rice (PRNF) (c) and fermented pea-rice (PRF) (d) beverages during storage at 4 °C for 143 days.	116
Figure 5–Concentration of <i>Lactobacillus spp.</i> of fermented control (CF) and fermented pea-rice (PRF) beverages during storage at 4 °C for 143 days.	118

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Teneur en protéines des différentes sources de protéines.....	49
Tableau 2. Composition en acides aminés essentiels des différentes sources de protéines.....	50
Tableau 3. Indices chimiques des différentes sources de protéines.	51
Tableau 4. Indices chimiques de mélanges de protéines de pois et de riz.....	52
Tableau 5. Indices chimiques de mélanges de protéines de pois et de chanvre.....	52
Table 1–Amino acid score of rice, hemp and pea proteins and control, PR and PH beverages.	66
Table 2–Total protein content (TPC), total solid content (TSC), pH, titratable acidity (TA), viscosity and total viable count (TVC) of plant beverages.	67
Table 3–Molecular weight (MW) distribution of Control, PR and PH beverages during <i>in vitro</i> digestion.....	70
Table 4– <i>In vitro</i> protein digestibility (% N released) after digestion with pepsin (120 min) and pepsin + trypsin (240 min) of Control, PR and PH beverages.....	73
Table 5–Composition of the diets (g/100 g) used during the animal study.	89
Table 6–Effect of different diets on the growth of weanling rats.	92
Table 7–Effect of fermentation on nutritional values of plant-based protein beverage.	93
Table 8– Effect of the fermentation on the digestibility of plant-based protein beverage.....	94
Table 9–Effect of the storage at 4 °C on the viscosity (cP) of CNF, CF, PRNF and PRF beverages.	113
Table 10–Effect of the storage at 4 °C on the color of CNF, CF, PRNF and PRF beverages...	114
Table 11–Sensory analysis during 84 days of storage of CF and PRF beverages.....	119

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAE: acide aminé essentiel

AAS: *amino acid score*

ACIA: Agence canadienne d'inspection des aliments

AD: *apparent digestibility*

AOAC: *association of official analytical chemists*

CEP: coefficient d'efficacité protéique

CEPN: *coefficient d'efficacité protéique net*

CFIA: *Canadian Food Inspection Agency*

CFU: *colony forming unit*

EAA: essential amino acid

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FDA: *Food and Drug Administration*

IVPD: *in vitro protein digestibility*

LAB: *lactic acid bacteria*

NPR: *net protein efficiency ratio*

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PDCAAS: *protein digestibility corrected amino acid score*

PER: *protein efficiency ratio*

SEC-HPLC: *size exclusion-high performance liquid chromatography*

TA: *titratable acidity*

TCA: *trichloroacetic acid*

TD: *true digestibility*

UFC: Unité formant colonie

WHO: *World Health Organization*

CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE

1. Introduction

Le marché des aliments fonctionnels est en plein essor. Parmi eux se trouvent les aliments et boissons enrichis en protéines et les probiotiques. Ces derniers deviennent de plus en plus populaires chez les consommateurs qui se préoccupent de leur santé. On attribue notamment aux probiotiques des propriétés antidiarrhéiques, antihypertensives, la prévention des infections à *Clostridioides (Clostridium) difficile* et la modulation du système immunitaire (McFarland, 2007; Lye *et al.*, 2009; Ashraf et Shah, 2014; Maziade *et al.*, 2015; Kullar *et al.*, 2020). Les boissons enrichies en protéines sont prisées par les sportifs, en particulier ceux pratiquants des sports de force, car elles participent au maintien et au développement de leur masse musculaire (Campbell *et al.*, 1994). Elles peuvent également profiter aux personnes âgées notamment pour l'augmentation de leur masse musculaire (Børsheim *et al.*, 2008) ou aux enfants dont les besoins en protéines sont plus élevés (Richter *et al.*, 2019). Les produits enrichis en protéines le sont aujourd'hui pour la majorité en protéines animales (Grand view research, 2019). En effet, la majorité des produits protéinés contiennent du petit lait, ou « *whey* », un sous-produit de l'industrie laitière, comme source de protéines. Il existe peu de boissons enrichies en protéines végétales sur le marché comparativement aux boissons enrichies en protéines de sources animales. Selon Lumina Intelligence (2018), 22% des poudres de protéines sont d'origine végétale. Malgré tout, cette tendance est en train d'évoluer. Les consommateurs étant de plus en plus à la recherche de produits naturels, sains, biologiques et bons pour la planète, on observe les produits enrichis en protéines végétales prendre un peu plus de places sur le marché chaque jour. Le soya domine le marché des suppléments protéiques d'origine végétale, suivi par le pois. Aussi, les problèmes actuels de surpopulation, de manque de terres arables et de réchauffement climatique nous contraignent à devoir changer notre alimentation et notre vision quant aux sources des protéines. Ainsi, les protéines végétales, nécessitant moins de terres cultivables et libérant moins de gaz à effet de serre que la production animale, peuvent être une bonne alternative aux protéines animales. Cependant, les protéines végétales sont souvent de moindre qualité par rapport aux protéines animales (Boye *et al.*, 2012). Elles sont souvent déficientes en un ou plusieurs acides aminés essentiels, faisant d'elles des protéines dites « incomplètes » (FDA, s.d.). Les protéines végétales sont également moins bien assimilées et digérées par le corps humain que les protéines animales, dû notamment à la présence de facteurs antinutritionnels (Gilani *et al.*, 2012). Néanmoins, il a été démontré que les procédés de transformations tels que le blanchiment, le

rôtissage, la micronisation permettent l'augmentation de la digestibilité et de la valeur nutritive de certaines protéines végétales (Khattab *et al.*, 2009). Notamment, la fermentation permet d'avoir une digestibilité d'une protéine accrue par rapport à la même protéine non fermentée. Ce traitement permet une préhydrolyse des protéines, et donc une meilleure assimilation de celles-ci. La fermentation a également des effets positifs sur les propriétés sensorielles et physico-chimiques du produit (Cagno *et al.*, 2011; Schindler *et al.*, 2012).

2. Les aliments fonctionnels

Les consommateurs manifestent un intérêt grandissant pour les aliments naturels et ayant des bienfaits sur la santé en général. Selon Statista (Statista, 2018), le marché des aliments fonctionnels a un avenir brillant, avec des revenus mondiaux de 300 milliards de dollars US en 2017, et une prévision de 440 milliards en 2022. Concernant le marché nord-américain, les ventes d'aliments fonctionnels représentent 45 milliards de dollars US en 2019, et sont estimées à 68 milliards pour 2024. Parmi les aliments fonctionnels, on retrouve les aliments enrichis (en vitamines, protéines, fibres, calcium, etc.), les aliments faibles en gras ou en sel, et les laits fermentés riches en probiotiques comme Bio-K+^{MD}. Il n'existe pourtant pas de définition officielle des aliments fonctionnels. Selon le gouvernement du Canada (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2017), « les aliments fonctionnels sont les aliments renforcés avec des ingrédients bioactifs et qui offrent des bienfaits démontrés pour la santé ». Ils sont donc différents des nutraceutiques qui sont des extraits provenant de sources naturelles, ayant des bienfaits pour la santé et se présentant sous forme de pilules, poudres ou autres formes médicinales. Parmi les nutraceutiques, on retrouve par exemple les capsules d'oméga 3 extrait de poissons, la curcumine extraite du curcuma et les isoflavones isolées du soya.

2.1. Les produits enrichis en protéines

Les produits enrichis en protéines occupent une place de plus en plus importante sur le marché des produits enrichis. Ils sont souvent appréciés des sportifs et peuvent être une source de protéines intéressantes pour la population âgée qui est sujette aux carences en protéines. En effet, celle-ci requiert une quantité plus importante de protéines (Wolfe *et al.*, 2008) pour maintenir une bonne balance en azote (Morais *et al.*, 2006). Aussi, des études indiquent une réduction de la synthèse des protéines musculaires chez les personnes de plus de 60 ans (Guillet *et al.*, 2004; Short *et al.*, 2004), entraînant un besoin plus important en acides aminés pour permettre une

meilleure synthèse des protéines musculaires (Katsanos *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2014). De nombreux effets bénéfiques de l'augmentation de l'apport en protéines sur la population âgée ont été démontrés il y a plusieurs années (Campbell *et al.*, 1994). Notamment, une augmentation de la masse corporelle et de la force a été mise en évidence (Børsheim *et al.*, 2008), ainsi qu'un rétablissement plus rapide après une fracture de la hanche (Schürch *et al.*, 1998) et une réduction du risque de devenir frêle (Beasley *et al.*, 2010; Tieland *et al.*, 2012). Avec parfois des problèmes physiques gênant l'alimentation, ou un manque d'appétit, les personnes âgées ont en général un bol alimentaire plus faible que la population adulte. L'utilisation d'aliments enrichis en protéines pourrait être une solution pour pallier à ce problème ainsi que pour augmenter l'apport en protéines chez les personnes âgées. En effet, il a été démontré que les petits repas riches en énergie et en protéines améliorent l'apport en protéines et autres nutriments chez les personnes âgées (Beelen *et al.*, 2018; Lorefält *et al.*, 2005).

Les produits enrichis en protéines sont destinés notamment aux sportifs. L'alimentation d'un athlète est importante et a un effet direct sur sa santé, sa masse musculaire, sa récupération après l'effort, la disponibilité des substrats pendant l'effort, et finalement, sa performance (Thomas *et al.*, 2016). Les sportifs auraient besoin d'un apport protéique supérieur comparé aux personnes ne pratiquant pas ou peu d'activités sportives (Phillips *et al.*, 2011). Ils doivent compenser l'oxydation des protéines et des acides aminés durant l'exercice, et doivent fournir un substrat pour l'accumulation de tissu maigre ainsi que pour la réparation de lésions musculaires induites par l'exercice (Tipton *et al.*, 1998, Gibala, 2007, Rodriguez *et al.*, 2007). Il a été démontré qu'un apport en protéines plus élevé chez les sportifs améliorerait les adaptations à l'entraînement et participait à une bonne récupération (Hoffman *et al.*, 2009; Beelen *et al.*, 2010; Moore, 2015) ainsi qu'à un accroissement de la masse corporelle maigre (Moore, 2015) et une hypertrophie musculaire (Cribb *et al.*, 2007); effet recherché surtout chez les sportifs pratiquant l'entraînement contre résistance.

Les personnes suivant certains régimes amincissants sont aussi consommatrices de produits riches en protéines. Un des régimes pour perdre du poids le plus populaire en Amérique du Nord est un régime riche en protéines, riche en gras et pauvre en glucides, popularisé par le Dr Atkins (Johnston *et al.*, 2004). Ce régime est fondé sur le fait que les protéines sont associées à la sensation de satiété (Eisenstein *et al.*, 2002). La plupart des produits enrichis en protéines présents dans le commerce aujourd'hui contiennent comme source de protéines du lactosérum, appelé également petit-lait ou « *whey* ». Celui-ci est obtenu pendant le processus de fabrication du fromage et est un sous-produit de l'industrie. Cependant, de plus en plus de consommateurs

se tournent vers des sources de protéines végétales. Ainsi, les protéines de soya, de pois, de riz, de lin, d'arachide ou de chanvre sont utilisées pour la production d'aliments enrichis en protéines (Vega™, Rise Bar™, Evo Hemp™, Evolve™, Orgain™). L'intérêt du consommateur pour les protéines de soya a fortement baissé ces 15 dernières années, principalement dû à leur allergénicité et l'implication du soya dans la déforestation, tandis que son intérêt pour les protéines de pois a augmenté drastiquement (McKinsey & Company, 2019). En comparaison avec les suppléments de protéines à base de produits laitiers, il existe très peu de recherches concernant les suppléments à base de végétaux. Des recherches sont nécessaires pour comprendre les effets des protéines végétales (riz, pois, chanvre, etc.) sur la synthèse des protéines musculaires (Vliet *et al.*, 2015).

2.2. Les probiotiques

Selon Hill *et al.* (2014), les probiotiques sont des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte ». Les probiotiques les plus utilisés en tant que compléments alimentaires et inclus dans des aliments fonctionnels sont les bactéries lactiques de genre *Bifidobacterium* spp. et *Lactobacillus* spp. Ces bactéries sont naturellement présentes dans le microbiote intestinal de l'Homme. Les probiotiques sont souvent sélectionnés suivant leur tolérance à l'acidité gastrique et à la bile, leur capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale, leur exclusion compétitive des bactéries pathogènes. Selon l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (ACIA), une portion déterminée d'un aliment doit au moins contenir 1 milliard d'Unités Formant Colonie (UFC) de micro-organismes éligibles par l'ACIA pour pouvoir être considéré comme aliment probiotique (ACIA, 2019a).

Les probiotiques agissent en symbiose avec le microbiote intestinal. Celui-ci a plusieurs rôles majeurs dans le maintien de la santé. Il permet de bloquer le passage de substances étrangères, de favoriser la dégradation des aliments ainsi que de renforcer et de favoriser le développement du système immunitaire (Macpherson et Harris, 2004; Gaboriau-Routhiau et Cerf-Bensussan, 2016). Lors de la prise d'antibiotiques par exemple, il peut se créer un déséquilibre du microbiote intestinal, ou dysbiose, c'est à ce moment que les probiotiques entrent en jeu.

De nombreux effets positifs sur la santé sont attribués aux probiotiques et sont fondés sur des études de plus en plus nombreuses sur le sujet. Les probiotiques permettent la réduction des effets de l'intolérance au lactose (Pelletier *et al.*, 2001; Pakdaman *et al.*, 2015). Ils ont également des propriétés antihypertensives (Lye *et al.*, 2009), ils préviennent la diarrhée du voyageur (McFarland, 2007), la diarrhée due à l'infection à *C. difficile* (Pochapin, 2000; Maziade *et al.*, 2013)

et les diarrhées associées aux antibiotiques (Beausoleil *et al.*, 2007; Johnston *et al.*, 2011; Hempel *et al.*, 2012). Il est connu que les probiotiques produisent des métabolites ayant des activités antimicrobiennes (Millette *et al.*, 2007; Karska-Wysocki *et al.*, 2010) et pourraient permettre la prévention du cancer colorectal aux vues des résultats préliminaires (Rafter *et al.*, 2007; Baldwin *et al.*, 2010, Uccello *et al.*, 2012), ainsi que la réduction des symptômes de l'intestin irritable (Moayyedi *et al.*, 2008; Hoveyda *et al.*, 2009; Didari *et al.*, 2015). De façon générale, les probiotiques ont un rôle sur la modulation du système immunitaire (Perdigon *et al.*, 1995, Ashraf & Shah, 2014). Cependant, tous ces effets ne sont pas attribuables à tous les probiotiques. En effet, les effets positifs observés ont tendance à être spécifiques des souches utilisées (Yan et Polk, 2011). Aussi, les probiotiques sont fragiles et peuvent avoir des effets différents selon la durée du traitement, la souche utilisée, la dose, le conditionnement et le mode d'administration.

Les mécanismes d'actions des probiotiques contre les pathogènes sont variés et différent selon la souche utilisée. Certaines souches produisent des facteurs antimicrobiens tels que des bactériocines (*Ligilactobacillus (Lactobacillus) salivarius* UCC118), du peroxyde d'hydrogène (*Lactobacillus johnsonii* NCC533), des acides gras à chaîne courte (*Bifidobacterium breve* Yakult) (Corr *et al.*, 2009). Certaines souches, comme *Escherichia coli* Nissle 1917, modulent la fonction de la barrière épithéliale (Ukena *et al.*, 2007), tandis que certaines, tel que *L. casei* CRL 431, stimulent le système immunitaire de l'hôte (Galdeano *et al.*, 2006). D'autres vont engendrer la sécrétion de mucus par les cellules caliciformes, tel que *L. casei* GG et *L. plantarum* 299v, créant ainsi une barrière contre les bactéries pathogènes (Mattar *et al.*, 2002; Mack *et al.*, 2003). Enfin, certaines souches comme *L. casei* DN-114 001, vont bloquer les pathogènes en créant une barrière physique (Ingrassia *et al.*, 2005). Jäger et al (2017) ont également démontré que la supplémentation en probiotiques *B. coagulans* GBI-30, 6086 combinés avec des protéines tend à améliorer la récupération, à maintenir une performance physique et à réduire davantage les dommages musculaires plutôt qu'avec des protéines seules.

Les probiotiques Bio-K Plus^{MD} (*L. acidophilus* CL1285^{MD}, *L. casei* LBC80R^{MD}, *L. rhamnosus* CLR2^{MD}) ont démontré leur efficacité dans l'amélioration de la qualité de vie des personnes souffrant du syndrome du côlon irritable à tendance diarrhéique (Preston *et al.*, 2018), dans la réduction des cellules cancéreuses associées au cancer colorectal (Baldwin *et al.*, 2010) et dans la prévention et la réduction des diarrhées associées à *C. difficile* et à la prise d'antibiotiques (Beausoleil *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2010; Sampalis *et al.*, 2010).

Sur le marché actuel, la majorité des produits alimentaires enrichis en probiotiques sont des produits laitiers, car ce sont de bonnes matrices alimentaires pour les probiotiques. Les yogourts

probiotiques représentent 78% des ventes de probiotiques (Granato *et al.*, 2010). Cependant, de par les allergies et les intolérances au lactose beaucoup de consommateurs limitent leur consommation de produits laitiers. Il y a aussi une augmentation de personnes végétariennes et végétaliennes qui se tournent vers des alternatives végétales. Les produits alimentaires non laitiers contenant des probiotiques sont donc en émergences et de plus en plus de recherches leur sont accordées (Bansal *et al.*, 2015; Mäkinen *et al.*, 2015; Min *et al.*, 2018; Sridharan & Dal, 2019). *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* et *B. lactis* sont des probiotiques qui peuvent être incorporés dans des produits d'origine végétale (Martins *et al.*, 2013).

3. La valeur nutritionnelle des protéines

Les protéines sont des macronutriments essentiels au corps humain de par leurs fonctionnalités structurales et métaboliques. Les protéines sont composées d'acides aminés essentiels (AAE) et non essentiels. Les AAE ne sont pas synthétisés par le corps et doivent donc être apportés par l'alimentation. Les besoins en protéines varient en fonction de l'âge et de l'activité physique. Ils sont aussi fonction du type de protéines, végétale ou animale. En effet, la qualité et l'absorption d'une protéine seront différentes pour l'un ou l'autre type de protéine (Mariotti, 2017).

3.1. Fonctions et Besoins

Les protéines ont des rôles structuraux essentiels permettant par exemple le renouvellement des tissus, ou la formation de la peau, des tendons, des os, etc. Elles ont également des rôles métaboliques via les enzymes ou encore les hormones, elles peuvent également être des transporteurs ou encore des messagers. Leurs rôles sont très divers et elles interviennent dans presque toutes les fonctions de la vie cellulaire (Nature, 2014).

Les carences en protéines sont rares dans les pays industrialisés, mais peuvent toutefois toucher les personnes âgées ou certaines personnes ayant des pathologies particulières entraînant un manque d'appétit ou une altération de la digestion. Cependant, elles sont fréquentes dans les pays en voie de développement et touchent plusieurs millions d'enfants dans le monde. Une malnutrition protéino-énergétique, due à un déficit grave en protéines, peut provoquer le marasme qui correspond à un apport énergétique et protéique insuffisant, ou le kwashiorkor qui est dû à une carence en protéines (Edozien, 1968). Une carence en protéines entraîne des impacts négatifs sur tous les organes, des œdèmes, une perte musculaire importante, une perte de cheveux, des diarrhées, des insuffisances hépatiques, rénales ou cardiaques et peut entraîner la

mort. En opposition, un excès de protéines pourrait également avoir des répercussions sur la santé, mais il est toutefois plus rare. Un régime riche en protéines animales et faible en glucides augmenterait le risque de formation de calculs rénaux, diminuerait l'équilibre en calcium et pourrait augmenter le risque de perte osseuse (Reddy *et al.*, 2002, Amanzadeh *et al.*, 2003). Certains auteurs n'observent toutefois pas de liens entre un régime riche en protéines et la néphrolithiase (Sorensen *et al.*, 2012) ou d'effet néfaste sur la fonction rénale chez des personnes en bonne santé (Martin *et al.*, 2005) incluant les personnes âgées (Surdykowski *et al.*, 2010).

Les protéines sont très peu stockées dans le corps, contrairement aux glucides et aux lipides qui sont respectivement stockés sous forme de glycogène et de tissus adipeux. C'est pourquoi il est nécessaire de consommer suffisamment de protéines par jour. Les besoins en protéines sont définis comme l'apport minimal de protéines alimentaires de bonne qualité, permettant de compenser les pertes de l'organisme en azote, de maintenir la masse protéique corporelle chez les personnes en équilibre énergétique et ayant une activité physique modeste (WHO, 2007). Pour estimer les besoins en protéines, c'est la procédure de bilan d'azote qui est utilisée. Elle revient à calculer la différence entre la consommation en azote par l'alimentation et les pertes totales en azote, par les fèces, l'urine, la sueur. Le bilan d'azote représente le bilan de protéines. La quantité de protéines équivaut à la quantité d'azote multipliée par un facteur de conversion. Ce facteur est par convention de 6,25, mais diffère selon la source de protéine. Selon Mariotti *et al.* (2008), le facteur de conversion de 6,25 serait trop élevé et il serait en réalité de 5,4 pour les céréales, de 5,6 pour la viande et de 5,4 pour les légumes. Néanmoins, il existe des divergences considérables dans la littérature quant aux valeurs de ce facteur (Krul, 2019) et il n'existe pas de valeurs officielles et acceptées pour les différentes sources de protéines ou mélanges de protéines. Il est donc recommandé par la FAO d'utiliser le facteur de 6,25 lorsqu'un mélange de différentes protéines est analysé ou lorsque le facteur spécifique d'une protéine n'est pas connu (FAO, 2003).

Pour un adulte en bonne santé, la quantité de protéines ingérées doit être égale à celle excrétée. Elle doit toutefois être plus élevée que celle excrétée pour les enfants en croissance, pour les sportifs, les femmes enceintes et allaitantes et les personnes âgées. Les enfants et adolescents de 4 à 19 ans, ainsi que les femmes enceintes ont des besoins protéiques journaliers de 0,9 g/kg de masse corporelle, les femmes allaitantes de 1,2 g/kg de masse corporelle (Richter *et al.*, 2019). Selon l'Organisation mondiale de la santé (WHO, 2007), les besoins protéiques journaliers pour un adulte de moins de 65 ans sont de 0,8 g/kg de masse corporelle. Selon plusieurs études, les personnes âgées ont un besoin d'environ 1,0 à 1,25 g de protéines par kg de masse corporelle

(Campbell *et al.*, 1994; Morais *et al.*, 2006; Bauer *et al.*, 2013). Les sportifs ont également des besoins en protéines plus élevés que la population normale, et ces besoins vont être plus ou moins grands en fonction de l'intensité, de la fréquence de l'activité sportive pratiquée, aussi, si la prise et le développement de masse musculaire sont recherchés, les besoins vont également varier et être plus élevés. Une étude préconise entre 1,4 et 2,0 g de protéines par kg de masse corporelle pour les personnes sportives, pour leur santé, et pour leur permettre d'améliorer leurs adaptations aux entraînements physiques, ainsi que pour maximiser la synthèse des protéines musculaires (Campbell *et al.*, 2007; Phillips *et al.*, 2011). Ces recommandations sont cependant plus faibles selon les diététiciens du Canada et des États-Unis qui préconisent un apport journalier en protéines de 1,2-1,4 g/kg de masse corporelle (Rodriguez *et al.*, 2009).

3.2. Facteurs d'évaluation de la qualité d'une protéine

La qualité d'une protéine est définie par son aptitude à combler les besoins en acides aminés et en azote, selon un apport donné, pour assurer une bonne croissance, l'entretien des tissus, et permettre aux fonctions générales et indispensables associées aux protéines d'advenir. Plusieurs éléments caractérisent la qualité nutritionnelle d'une protéine : sa composition en acides aminés essentiels, sa digestibilité ainsi que son absorption par le métabolisme. Les études cliniques chez l'homme permettent une mesure précise de la qualité d'une protéine en évaluant la croissance et le bilan azoté des individus. Cependant, pour des raisons évidentes de coûts et d'éthiques, ces méthodes ne sont pas adaptées pour déterminer régulièrement la qualité d'une protéine. Ainsi, d'autres techniques ont été conçues pour mesurer la qualité d'une protéine en utilisant un modèle animal, le plus généralement le rat mâle en croissance, ou des techniques de détermination *in vitro* (WHO et FAO, 1991).

3.2.1. Coefficient d'efficacité protéique

La méthode du coefficient d'efficacité protéique (CEP) ou « *Protein Efficiency Ratio* » (PER) est utilisée depuis 1919 et elle est considérée comme la méthode s'approchant le plus des tests cliniques. C'est la méthode officielle du Canada pour déterminer la qualité d'une protéine (Agence Canadienne d'Inspection des Aliments, 2018). Elle est basée sur la méthode FO-1 de Santé Canada (Health Protection Branch, 1981) et 960.48 de l'AOAC. Elle consiste à calculer, sur 28 jours, le rapport entre la prise de poids de l'animal en croissance et la quantité de protéines ingérées (Éq. 1).

$$\text{CEP} = \frac{\text{gain de poids (g)}}{\text{protéines ingérées (g)}} \quad (1)$$

Le modèle animal utilisé est le rat, et la protéine de référence est la caséine. Afin que l'apport reste inférieur aux besoins, la quantité de protéines administrée est de 10% par diète pour tous les groupes étudiés. Ainsi, malgré une croissance plus faible qu'à la normale, la protéine est utilisée de façon efficace et peu dégradée, améliorant ainsi la sensibilité du test. Les quantités d'huile, de sucrose, de vitamines, de minéraux, de fibres doivent être égales dans les différents régimes donnés aux rats. La quantité d'amidon est ajoutée en quantité suffisante pour atteindre 100 g. Les valeurs de CEP pour la caséine variant d'une étude à l'autre, Pellet et Young (1980) ont proposé une standardisation du CEP de la caséine à 2,5. Les protéines ingérées sont également utilisées par l'organisme pour le maintien du poids. De ce fait, il est préférable de considérer le gain de poids d'un groupe de rats en croissance nourris avec la protéine à tester et de l'additionner à la perte de poids d'un groupe de rats nourris avec un régime sans protéines. Cette valeur, le Coefficient d'Efficacité Protéique Net (CEPN), ou « *Net Protein Ratio* » (NPR) est déterminée sur une durée de deux semaines (Mitchell *et al.*, 1989; Sarwar, 1997; Gilani et Lee, 2003; Jin *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2015).

$$\text{CEPN} = \frac{\text{gain de poids (g)} + \text{perte de poids groupe sans protéines (g)}}{\text{protéines ingérées (g)}} \quad (2)$$

Aussi, afin d'affiner la précision de cette méthode, le CEPN Relatif est calculé par rapport à la protéine de référence (la caséine) qui est utilisée pour la normalisation de la valeur. La méthode de CEP a toutefois ses limites. Elle ne permet pas de connaître les facteurs induisant les différences de qualité, et elle est relativement dépendante des conditions de l'étude. En revanche, cette méthode permet de comparer facilement et rapidement plusieurs protéines entre elles (Gilani et Lee, 2003).

3.2.2. Digestibilité *in vitro*

Il existe deux types de digestion *in vitro*, la digestion statique et la digestion dynamique. Cette dernière a pour but de recréer un modèle sophistiqué proche de la réalité. Elle inclut la régulation du pH au cours du temps, des flux d'aliments, la concentration des enzymes digestives dans les différents compartiments et des mouvements imitant le péristaltisme. Certains de ces modèles comprennent même 4 compartiments, comme par exemple le TIM 1 (Minekus *et al.*, 1995) qui simule l'estomac, le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Cette méthode de digestion dynamique, bien que représentative de la digestion chez l'Homme, est moins utilisée que la digestion statique, qui est plus simple et moins coûteuse. Concernant la digestion statique, elle n'imité pas les processus physiques ayant lieu *in vivo*, et se passe dans un seul compartiment. Elle est estimée par méthode enzymatique, à l'aide de protéases. La digestion peut se faire de manière séquentielle (en

plusieurs étapes) ou bien en une seule étape. Différents modèles d'enzymes sont utilisés comme par exemple la pepsine, pepsine-trypsine, pepsine-pancréatine, pepsine-chymotrypsine-trypsine (Corgneau *et al.*, 2019; Lacroix *et al.*, 1983; Tavano *et al.*, 2016; Swaisgood *et al.*, 1991). Ces enzymes sont utilisées pour simuler la digestion au niveau de l'estomac et de l'intestin. Elles ont différents rôles et actions. La pepsine est une enzyme du suc gastrique et va donc permettre de simuler la digestion au niveau de l'estomac. Cette endoprotéase hydrolyse les liaisons peptidiques principalement avant les acides aminés aromatiques tryptophane, tyrosine et phénylalanine (Powers *et al.*, 1977; Wildman et Medeiros, 2000). La trypsine est une peptidase provenant du suc pancréatique. Elle hydrolyse principalement les liaisons peptidiques où se trouve un acide aminé basique lysine ou arginine (Olsen *et al.*, 2004). La chymotrypsine est sécrétée par le pancréas et hydrolyse essentiellement avant un résidu aromatique (Prasad *et al.*, 2010). La pancréatine, obtenue à partir de suc pancréatique, contient de la trypsine, de la chymotrypsine et des lipases. Il est également possible d'ajouter des sels biliaires, de la mucine, des électrolytes, des tampons. La température de digestion utilisée est 37 °C et les échantillons sont mis sous agitations. La durée de digestion varie grandement d'une étude à l'autre. Elle est également plus ou moins longue en fonction de la nature de l'aliment étudié (Hur *et al.*, 2011). Également, les rapports enzyme-substrat varient, ainsi que la pureté des enzymes utilisées. Hur *et al.* (2011) ont répertorié plus de 80 études portant sur la digestion *in vitro* et ont observé de grandes divergences qui dépendaient de la matrice alimentaire utilisée et des paramètres mesurés. Certaines études de digestibilité protéique ont été réalisées seulement avec de la pepsine pendant 2 h (Nunes *et al.*, 2004), d'autres avec de la pepsine pendant 2 h suivi avec de la pancréatine pendant 24 h (Murekatete *et al.*, 2012) ou encore avec de la pepsine pendant 48 h puis avec de la trypsine pendant 16 h (Chavan *et al.*, 2001). Abdel-Aal (2008) a comparé deux méthodes de digestion afin d'évaluer la digestibilité de différents produits de boulangerie. La première a été réalisée en une seule étape avec 3 enzymes (trypsine, chymotrypsine, peptidase) pendant 10 min et la deuxième en deux étapes avec deux enzymes (pepsine 30 min, pancréatine 6 h). Il a été observé une grande différence entre ces deux méthodes, avec une digestibilité 40-60% supérieure pour la digestion en une seule étape. La sensibilité d'un essai est fonction du temps de réaction et du rapport enzyme substrat. Face à ces nombreuses disparités on retrouve tout de même une procédure semblable dans beaucoup d'études portant sur l'analyse de la digestibilité protéique consistant en une méthode séquentielle de digestion en utilisant la pepsine à un pH proche de 2 pendant 1-3 h puis la trypsine pendant 2-4 h à un pH proche de 7-8 (Tang, 2007; Wang *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Minekus *et al.*, 2014; Wen *et al.*, 2015).

La valeur de la digestibilité est obtenue principalement de deux manières, la méthode du pH ou l'analyse de l'azote libéré. La première méthode consiste en une digestibilité souvent très courte et en une seule étape, où la quantité de NaOH nécessaire au maintien du pH à une valeur de 8 est mesurée (Pedersen et Eggum, 1983) ou bien la valeur de pH après la digestion est mesurée et la digestibilité est calculée selon une équation spécifique (Khattab *et al.*, 2009; Nosworthy *et al.*, 2018). La seconde méthode consiste en la mesure de l'azote libéré au cours de la digestion. Après précipitation au TCA du produit digéré, il est question de mesurer l'azote soluble ou l'azote insoluble puis de faire le rapport avec l'azote total dans le produit initial. Le pourcentage d'azote libéré à la fin de la digestion correspondant au pourcentage de la digestibilité protéique *in vitro* (Abdel-Aal, 2008).

Malgré le grand nombre de recherches portant sur la digestion *in vitro*, et le nombre de méthodes différentes utilisées, il n'existe pas de méthode officielle ou largement acceptée pour la simulation de la digestion chez l'Homme. Aussi, les différents modèles de digestion *in vitro* sont très différents de la digestion réelle chez l'Homme, il est très difficile de reproduire tous les événements physiologiques et physico-chimiques extrêmement complexes qui opèrent dans le tube digestif. En pratique, les résultats obtenus *in vitro* ne pourront donc inévitablement pas correspondre parfaitement aux résultats obtenus en étudiant le processus *in vivo* du fait de sa grande complexité (Coles *et al.*, 2005). Une méthode *in vitro* peut être précise et fiable en laboratoire, mais les données obtenues doivent être corrélées avec des données *in vivo* afin de fournir une mesure physiologiquement pertinente de la protéine digestible.

3.2.3. Digestibilité *in vivo*

La digestibilité protéique *in vivo* correspond la plupart du temps à la digestibilité fécale (la digestibilité iléale peut également être déterminée). Elle est principalement évaluée en utilisant des rats mâles en croissance comme modèle. Comme pour le CEP, la quantité de protéines dans le régime de l'animal est de 10%, et la quantité de lipides, vitamines, minéraux, fibres sont les mêmes dans chaque régime, complétés avec de l'amidon pour l'apport de glucides (WHO et FAO, 1991). Le groupe ne recevant pas de protéines verra sa quantité de protéines remplacée par de l'amidon afin d'estimer l'azote métabolique. Chaque jour, les fèces sont récoltées et la quantité de nourriture ingérée est mesurée, et ce pendant au moins 5 jours après au moins 4 jours de période préliminaire où les rats sont nourris avec les régimes tests. Le contenu en azote de la nourriture et des fèces est analysé afin de pouvoir déterminer la digestibilité protéique. La digestibilité apparente (ou AD « *Apparent digestibility* ») *in vivo* correspond à la quantité d'azote

excréte présente dans les fèces qui est soustraite à la quantité d'azote ingéré dans la nourriture et cette valeur est exprimée en pourcentage de l'azote ingéré (WHO et FAO, 1991).

$$AD = \frac{\text{azote consommé} - \text{azote excréte}}{\text{azote consommé}} \quad (3)$$

Pour connaître la digestibilité réelle (ou TD « *True Digestibility* ») il est nécessaire de considérer les pertes endogènes en prenant en compte un groupe consommant un régime dépourvu de protéines. Le calcul utilisé est le suivant (WHO et FAO, 1991):

$$TD = \frac{\text{azote consommé} - (\text{azote excréte} - \text{azote excréte groupe sans protéines})}{\text{azote consommé}} \quad (4)$$

Ces mesures sont basées sur le principe que la différence entre l'apport et les pertes correspond à la digestion et à l'absorption des protéines alimentaires.

3.2.4. Autres facteurs

Il existe d'autres facteurs permettant d'évaluer la qualité d'une protéine, tels que l'indice chimique, le PDCAAS (*Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score*) ou encore le DIAAS (*Digestible Indispensable Amino Acid Score*). L'indice chimique détermine l'efficacité de l'azote absorbé à répondre aux besoins en AAE au niveau de l'apport en protéines. Il consiste à comparer la concentration en l'AAE limitant de l'aliment étudié par rapport à sa concentration dans la protéine de référence (WHO, 2007). Le PDCAAS correspond à l'indice chimique multiplié par la valeur de la digestibilité. Le DIAAS a été proposé en 2013 par la FAO pour remplacer le PDCAAS (FAO, 2013). Il prend en compte la digestibilité iléale de chaque acide aminé essentiel plutôt qu'une seule valeur de digestibilité fécale des protéines comme pour le PDCAAS. Cependant, il reste encore peu utilisé du fait de sa nouveauté et de sa complexité (Éq. 5).

$$\text{Ratio d'AAE digestibles} = \frac{\text{teneur en AAE digestibles dans 1g de protéine étudiée (mg)}}{\text{teneur du même AAE dans 1g de la protéine de référence (mg)}} \quad (5)$$

La teneur digestible de chaque AAE dans la protéine étudiée est calculée comme la teneur en mg de chaque acide aminé de la protéine multipliée par leurs coefficients de digestibilité iléale respectifs. Ce coefficient correspond à la valeur de la digestibilité iléale divisée par 100. Le DIAAS correspond à la valeur la plus faible du ratio d'AAE digestibles (5), multiplié par 100.

3.3. Les facteurs antinutritionnels

Les composés antinutritionnels peuvent être présents naturellement ou formés pendant le procédé auquel la matrice alimentaire est soumise. Les aliments végétaux crus contiennent pour

beaucoup des éléments antinutritionnels. Ceux-ci restreignent l'absorption des nutriments et peuvent de ce fait affecter la biodisponibilité ainsi que la digestibilité notamment des protéines et des acides aminés. Parmi ces facteurs antinutritionnels, certains sont des inhibiteurs d'enzymes digestives, comme les inhibiteurs à trypsine, et empêchent la digestion complète et l'absorption de certains nutriments. D'autres sont des agents chélateurs, comme les phytates et les polyphénols, se liant aux nutriments ou minéraux, gênant leur absorption (Oberleas *et al.*, 1966; Singh *et al.*, 1981; Ekholm *et al.*, 2003; Adamczyk *et al.*, 2017). Malgré ces inconvénients, des applications thérapeutiques sont attribuées aux facteurs antinutritionnels (Singh *et al.*, 2003), qui sont également nommés pour certains « composés bioactifs ». Notamment, l'acide phytique aurait des propriétés anticancer (Midorikawa *et al.*, 2001; Shamsuddin, 2002). Aussi, les polyphénols ont des propriétés antioxydantes, anticancer, anti-inflammatoires, et sont associés à la prévention de maladies telles que les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives ou l'obésité (Scalbert *et al.*, 2005; Khurana *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014). Il est démontré que l'utilisation de traitements (cuisson, fermentation, séchage, irradiation, germination, etc.) permet la réduction des facteurs antinutritionnels et, subséquemment, une augmentation de la digestibilité (Rehman *et al.*, 2005; Kalpanadevi *et al.*, 2013; Patterson *et al.*, 2017; Popova *et al.*, 2019). Il a par exemple été démontré qu'un traitement à la chaleur à 121 °C pendant 10 min permettait une baisse des tannins de plus de 30% pour des lentilles et des haricots rouges ainsi qu'une diminution de l'acide phytique de respectivement 28 et 37%. Cela a permis d'augmenter la digestibilité protéique des lentilles crues de 38 à 76% et de 34 à 68% pour des haricots rouges (Rehman *et al.*, 2005).

3.4. Allégations nutritionnelles

Les allégations nutritionnelles sont propres à chaque pays. Au Canada, c'est l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (2019b) qui fixe les allégations possibles ou non et qui en détermine les règles. Il est donc ici question du système en place au Canada. Deux sortes d'allégations nutritionnelles existent, les allégations qui sont relatives à la valeur nutritive et les allégations en rapport avec la santé. Elles sont toutes les deux facultatives. Les allégations nutritives donnent une information sur la quantité d'un nutriment dans l'aliment. Parmi ces allégations, on retrouve par exemple « source de calcium » ou « réduit en sel ». Les allégations de santé donnent, quant à elles, des informations sur des effets bénéfiques sur la santé de certains aliments consommés dans le cadre d'une alimentation équilibrée. On peut citer comme exemple, « antioxydant alimentaire » pour le sélénium, la vitamine E et C, « contribue à la formation des globules rouges du sang » pour l'acide folique, la vitamine B12 et le fer. Les allégations santé comportent plusieurs sous-catégories, dont les allégations relatives aux

probiotiques, ou encore les allégations nutritionnelles fonctionnelles. Ces dernières expliquent l'action des éléments nutritifs nécessaires au maintien d'une bonne santé et à un développement normal. Les éléments nutritifs englobent les lipides, les glucides, les protéines, les acides gras, les sucres, les vitamines et les minéraux. Selon l'ACIA, les allégations nutritionnelles fonctionnelles acceptables concernant les protéines sont les trois suivantes : « aide à la formation et à la réparation des tissus de l'organisme », « aide à la formation d'anticorps », « aide à la formation des muscles forts ».

Parmi les allégations nutritives, il existe les allégations relatives spécifiquement aux protéines. L'allégation « protéine complète » peut être utilisée si tous les acides aminés essentiels sont retrouvés dans la protéine. On trouve également comme allégation, « source de protéines » ou encore « excellente source de protéines » pour lesquelles il faut respectivement une cote protéique d'au moins 20 et d'au moins 40. Pour avoir l'autorisation d'exposer ces allégations sur l'emballage d'un aliment, il est de ce fait nécessaire d'en calculer la cote protéique. Celle-ci est égale à la teneur en protéines par ration quotidienne normale multipliée par le coefficient d'efficacité protéique (CEP). Selon l'ACIA, « pour la plupart des aliments, la ration quotidienne normale est considérée comme étant constituée d'une portion moyenne de l'aliment. Toutefois, dans le cas des aliments comme le lait, le pain et le beurre, qui peuvent être consommés plusieurs fois par jour, la portion quotidienne normale a été estimée en tenant compte des habitudes alimentaires des Canadiens et des Canadiennes » (ACIA, 2018b). Certains CEP sont présentés par l'agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA, 2018a), mais lorsqu'un CEP n'est pas indiqué, il en revient au fabricant de le déterminer pour pouvoir avoir le droit d'apposer une allégation sur l'aliment.

4. Propriétés des protéines végétales

4.1. Contexte mondial

La population mondiale, de 7,7 milliards d'habitants en 2019, connaît une croissance incroyable depuis les années 1930 et devrait atteindre 9,7 milliards d'habitants d'ici 2050 et 11 milliards en 2100 (United Nations, 2019). La consommation de viande a également augmenté ces 50 dernières années, passant de 71 millions de tonnes par an à plus de 300 millions de tonnes aujourd'hui. Cette augmentation n'est pas seulement liée à celle de la population mondiale, la quantité de viande consommée par habitant ayant elle aussi augmenté. Les pays ayant connu une transition économique forte présentent la plus forte hausse de consommation de viande par

habitant (consommation multipliée par 15 depuis 1960 en Chine). Plusieurs problèmes se présentent concernant cette forte consommation de viande. En effet, il existe un manque de terres arables, les productions de bœuf et de mouton étant les plus gros consommateurs avec 1 m² utilisé par gramme de protéines produites. En comparaison, la production d'œufs est de 0,05 m²/g, celle de riz de 0,02 m²/g et celle de légumineuses de 0,01 m²/g (Clark et Tilman, 2017). Les productions de bœuf et de mouton sont également les sources qui produisent le plus de gaz à effet de serre avec 220 g d'équivalent de dioxyde de carbone par gramme de protéine, contre 20 gCO₂e/g pour le riz (Clark et Tilman, 2017). À l'échelle mondiale, l'agriculture animale représente environ 15% des émissions de gaz à effet de serre induites par l'homme. À une époque où la population mondiale explose, où le réchauffement climatique menace notamment la biodiversité, la fonte des glaces et l'élévation du niveau des océans, le consommateur cherche à modifier sa manière de consommer, en passant par un réseau local, par des aliments naturels et biologiques, et par une consommation plus faible en viande et en protéines animales. Malgré tout, les produits enrichis en protéines n'ont jamais été aussi présents dans les rayons des supermarchés. Il existe donc un besoin urgent de trouver des alternatives aux protéines animales ordinaires. Différentes alternatives existent, comme la viande *in vitro*, les mycoprotéines, les protéines d'algues, les insectes, ou plus simplement les protéines végétales.

4.2. La qualité des protéines végétales opposée à celle des protéines animales

Les protéines végétales diffèrent sur plusieurs points des protéines animales. La plupart des protéines végétales sont dites de moins bonne qualité que les protéines animales. Les protéines dites complètes contiennent tous les acides aminés essentiels (AAE) en quantité suffisante (WHO & FAO, 1991). Les protéines animales sont qualifiées de protéines complètes, car elles fournissent les AAE pour combler les besoins de l'organisme. Les protéines végétales sont considérées pour la plupart comme incomplètes, n'apportant pas les quantités nécessaires en AAE. Afin d'obtenir l'apport en AAE nécessaire, il est recommandé, pour les végétariens ou végétaliens, de combiner une céréale avec une légumineuse. En effet, les céréales sont pour la plupart déficientes en lysine et riches en méthionine. Inversement, les légumineuses sont souvent pauvres en méthionine, mais riches en lysine. Ainsi, en associant les deux, la qualité globale des protéines est améliorée et l'apport en AAE devient complet (Kannan *et al.*, 2001; Mensa-Wilmot *et al.*, 2001). Aussi, les végétaux ont une teneur en protéines qui varie énormément selon les aliments, mais ils renferment en général moins de protéines que les sources animales. Leurs CEP, digestibilités et PDCAAS sont également plus faibles que pour les protéines animales. Les CEP de bœuf, de filet de porc, de volaille sont de 2,7 tandis que celui du riz est de 1,5, celui des

flocons d'avoine de 1,8 ou celui du boulgour de 1,4 (Agence Canadienne d'inspection des aliments, 2018). Le PDCAAS de la plupart des protéines animales est de 100%, tandis que les protéines végétales ont des valeurs plus faibles. Il est proche de 50% pour le riz, varie entre 30 et 70% pour le pois (Boye *et al.*, 2012). Cela est principalement dû aux déficits en certains AAE, car leurs digestibilités peuvent être assez élevées (90% pour le pois et le riz) voir égales à celles des protéines animales (Bodwell *et al.*, 1980; Hossain *et al.*, 1997). Toutefois, les procédés de transformation ont un effet considérable sur les protéines végétales en modifiant leurs structures, les rendant plus accessibles aux enzymes, faisant augmenter leurs qualités nutritionnelles et leurs digestibilités. Les effets de nombreux procédés de transformation sur la digestibilité protéique ont été étudiés, parmi lesquels l'irradiation, le trempage, le séchage, le fumage, la germination et la fermentation. On peut notamment citer Ghavidel & Prakash (2007), qui ont observé que la germination de légumineuses permettait d'augmenter la digestibilité protéique de 60% pour les légumineuses crues à 70% pour les germées. Albarracín *et al.* (2013) ont observé que la digestibilité protéique de riz brun cru passait de 75% à 86% après trempage pendant 48 h à 45 °C. Kataria *et al.* (1989) et Kalpanadevi *et al.* (2013) ont observé que le trempage, la cuisson et la germination permettaient d'augmenter significativement la digestibilité protéique de légumineuses (haricot mungo et niébé). Aussi, Osman *et al.* (2012) ont observé que l'irradiation gamma à 0.5 kGy augmentait significativement la digestibilité protéique des fèves (*Vicia faba* L.).

Outre leur digestibilité, les protéines végétales sont connues pour être riches en fibres, en vitamines et en antioxydants. Elles ne contiennent en revanche pas de vitamine B12, que l'on retrouve exclusivement dans les produits d'origines animales, très peu de vitamine D et de zinc. Elles contiennent aussi du fer non héminique, moins bien absorbé que le fer héminique retrouvé dans les produits d'origines animales. Les protéines végétales pourraient réduire le risque de maladies cardiovasculaires lorsque les protéines animales, spécialement les viandes rouges, pourraient l'augmenter (Pan *et al.*, 2012; Richter *et al.*, 2015). Les facteurs de risques cardiovasculaires peuvent être affectés par les nombreux composés bioactifs et les nutriments présents dans les sources alimentaires dont proviennent les protéines étudiées. Par exemple, la cuisson des viandes rouges à de hautes températures peut former des amines hétérocycliques et des hydrocarbures aromatiques polycycliques qui sont cancérigènes (Sinha *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2009). Les protéines ne sont pas consommées seules, elles font partie d'une matrice alimentaire. Il existe donc d'autres nutriments dont il est difficile de contrôler les effets potentiels. Ainsi il est difficile d'attribuer les avantages observés seulement au contenu en protéines. Actuellement, il est soutenu l'idée que le risque de maladies cardiovasculaires peut être réduit par une alimentation dont les protéines sont principalement d'origine végétale ainsi que d'origine

animale, mais non transformée et faibles en graisses saturées (Richter *et al.*, 2015). On attribue les effets protecteurs aux nombreux nutriments et composés bénéfiques présents dans les aliments d'origines végétales tels que les vitamines antioxydantes, les minéraux, les protéines végétales, les acides gras mono et polyinsaturés (Hu, 2003).

4.3. Les protéines de riz brun

Le riz (*Oryza sativa* L.) est l'aliment de base pour plus de trois milliards de personnes dans le monde (Reeves *et al.*, 2016). Sa production nécessite généralement peu d'eau et d'énergie (Chapagain et Hoekstra, 2011). Lorsque le riz brut est décortiqué et que sa balle et ses enveloppes extérieures sont enlevées, on obtient le riz complet autrement appelé riz brun. Celui-ci présente toujours le germe et le son, contrairement au riz blanc. Le riz contient entre 5 et 8% de protéines (Shih, 2003; USDA, 2011). Les protéines de riz brun sont majoritairement des glutélines, sous forme agrégée et difficilement soluble. On y retrouve aussi les albumines, solubles dans l'eau et facilement digestibles, et les globulines, riches en cystéine et méthionine et solubles en solutions salines (Hoogenkamp *et al.*, 2017). Comme beaucoup de céréales, il a une forte teneur en cystéine et en méthionine, mais une teneur faible en lysine (Nadathur *et al.*, 2016). Ses protéines ont plusieurs bénéfices sur la santé. Notamment, elles peuvent réduire l'hypertension (Li *et al.*, 2007), supprimer l'hyperglycémie et avoir un impact sur la néphropathie diabétique (Kubota *et al.*, 2013), elles pourraient avoir des effets hypocholestérolémiantes (Yang *et al.*, 2009) et des propriétés antioxydantes (Wei *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2014).

Les concentrés (environ 50% de protéines) et isolats (> 80% de protéines) de protéines de riz peuvent être obtenus par méthode enzymatique. L'amylase, la cellulase, l'hémicellulase, la xylanase, permettent la séparation des protéines et des carbohydrates (Shih & Daigle, 2000). Des méthodes physiques sont aussi utilisées telles que le fraisage colloïdal, le mélange à haute vitesse, la haute pression, etc. (Hoogenkamp *et al.*, 2017). Des méthodes d'extraction alcalines sont également pratiquées, suivies d'une précipitation isoélectrique (Fabian & Ju, 2011).

Même si les résultats divergent, les concentrés de protéines de riz brun ont en général une bonne digestibilité. Selon Rutherford *et al.* (2015), leur digestibilité est de 88%. Elle est d'environ 90% selon Wang *et al.* (1999) et allant jusqu'à 95% pour les protéines de son de riz (Han *et al.*, 2015). Le CEP d'un concentré de protéine de riz est situé entre 1,99 et 2,19 selon Prakash *et al.* (1996) et Chang *et al.* (1986), contre 1,5 pour une farine de riz (ACIA, 2018a) ou encore 2,75 selon Zhai *et al.* (2001). Encore une fois, les données sont très hétérogènes, car elles diffèrent selon la méthode d'extraction des protéines ou encore selon le type et l'espèce de riz utilisé.

Le riz contient peu de facteurs antinutritionnels (Hoogenkamp *et al.*, 2017), mais contient tout de même des phytates qui peuvent être réduits par trempage (Albarracín *et al.*, 2013), germination (Liang *et al.*, 2008) ou fermentation (Nnam & Obiakor, 2003). Les protéines de riz ont souvent une faible solubilité, cependant, certains procédés peuvent améliorer cet inconvénient sans modifier les constituants moléculaires. Wang *et al.* (2016) ont effectué un broyage sur des suspensions congelées d'isolats de protéines de riz et d'eau et ont observé une forte augmentation de la solubilité passant d'une valeur <5% à une valeur >10% pour un pH ≤5 et à une valeur >90% pour un pH ≥6. Également, Pietrysiak *et al.* (2018) ont effectué des injections directes de vapeur, exposant le produit à de hautes températures pendant de courts laps de temps, sur un mélange de protéine de pois et de riz, faisant augmenter fortement la solubilité passant de 4 à 40% à pH 7. Selon Chandi et Sogi (2007), les propriétés fonctionnelles des concentrés de protéines de riz, telles que les propriétés émulsifiantes, les capacités de liaison à l'huile et à l'eau, seraient comparables à celles de la caséine. Également, les protéines de riz brun ont des propriétés semblables au lactosérum concernant la construction et la réparation des muscles. Joy *et al.* (2013) ont démontré que l'isolat de protéine de riz administré après un exercice de force améliorerait les performances des exercices et les indices de composition corporelle (masse maigre, masse adipeuse et masse totale) autant qu'un isolat de protéine de lactosérum. Le riz brun est hypo allergène et peut donc être utilisé comme isolat protéique végétale en alternative aux isolats de protéines de lait et de soya qui sont des allergènes.

Les protéines de riz complet ont une couleur beige clair, ont peu d'odeur et n'ont pas un goût marqué. De plus, leur hypoallergénicité, leurs bénéfices sur la santé, leurs qualités nutritionnelles et leur forte digestibilité en font un ingrédient d'intérêt pour les produits enrichis en protéines et plus généralement pour l'industrie alimentaire (Cao *et al.*, 2009).

4.4. Les protéines de pois

Le pois (*Pisum sativum* L.) est une légumineuse principalement cultivée au Canada, en Russie, aux États-Unis et en France (FAO, 2015). Le pois est devenu une culture durable majeure du fait de sa capacité bénéfique à fixer l'azote grâce à sa relation symbiotique avec *Rhizobia* et il est une source majeure de protéines pour l'approvisionnement mondial en protéines depuis une trentaine d'années en Amérique du Nord (Pavek, 2012). La production Nord-Américaine est principalement exportée en Inde et en Chine comme aliment de base ou afin d'être broyé (Tulbek *et al.*, 2017). Les cultures de pois sont peu énergivores. Selon Zentner *et al.* (2004), pour une même énergie, elles produisent une quantité deux fois plus importante que le blé du Canada. Également, elles

ont une empreinte hydrique 1,5 fois plus faible que pour le lait, les œufs et la viande de poulet et 6 fois plus faible que pour le bœuf (Hoekstra, 2015).

Comme la plupart des légumineuses, la méthionine est l'acide aminé limitant du pois. Ses protéines sont principalement des globulines (la viciline et la légumine) solubles en solution saline, mais également des albumines, solubles dans l'eau, des prolamines, solubles dans l'alcool, des glutélines, solubles en solution alcaline, et des protéines résiduelles (Osborne, 1924). Le pois contient des facteurs antinutritionnels qui affectent sa digestibilité et sa biodisponibilité, notamment de l'acide phytique, des tannins et des inhibiteurs de trypsine. Les phytates se lient aux minéraux, réduisent la digestibilité protéique et agissent comme des antioxydants chélateurs de métaux (Hall, 2008). Les inhibiteurs de trypsine sont des petites protéines responsables d'une réduction de la digestibilité et de la biodisponibilité protéique. Les tannins se lient et précipitent les protéines. Ils se lient également aux métaux, inhibent la trypsine et les lipases (Hall, 2008). Ces facteurs antinutritionnels peuvent être réduits avec des traitements tels que la germination, la cuisson, la fermentation, le trempage, etc. (Roy *et al.*, 2010). Aussi, les isolats protéiques contiennent moins de facteurs antinutritionnels que les concentrés protéiques ou que la farine (Arntfield *et al.*, 1985; Fredrikson *et al.*, 2001). Les protéines de pois pourraient être un potentiel allergène alimentaire (Sanchez *et al.*, 2004), mais ne sont toutefois pas incluses dans le Codex Alimentarius comme allergènes.

Le pois a une teneur élevée en protéines (20 - 30%). Afin d'obtenir des concentrés et isolats de protéines de pois, les protéines sont, la plupart du temps, extraites en conditions alcalines puis concentrées par précipitation isoélectrique (Sumner *et al.*, 1981 ; Boye *et al.*, 2010; Barac *et al.*, 2015; Tulbek *et al.*, 2017). Les isolats de protéines de pois ont généralement une solubilité équivalente au soya d'environ 50% à pH 3 et 60% à pH 7 (Sumner *et al.*, 1981; Boye *et al.*, 2010; Barac *et al.*, 2014) et ont un minimum de solubilité au pH 4-5. Les concentrés et isolats de protéines de pois présentent plusieurs bénéfices nutritionnels et plusieurs fonctionnalités intéressantes telles que des capacités à lier l'huile et l'eau, à stabiliser des mousses, à gélifier, à stabiliser des émulsions, etc. (Sumner *et al.*, 1981; Aluko *et al.*, 2009; Stone *et al.*, 2015). L'efficacité des propriétés fonctionnelles va dépendre notamment des variétés de pois, des conditions de préparations et d'extraction et du pH utilisé (Boye *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010; Barac *et al.*, 2014).

L'isolat de protéines de pois aurait des effets bénéfiques sur la santé. Notamment, il permet la réduction du cholestérol (Rigamonti *et al.*, 2010). Aussi, il contient des peptides bioactifs

permettant l'inhibition de l'enzyme de conversion (Barbana & Boye, 2010; Li & Aluko, 2010), et ayant des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Ndiaye *et al.*, 2012).

Le pois a une digestibilité d'environ 70% - 80% (Habiba 2002; El-Hady *et al.*, 2003; El-Niely, 2007; Park *et al.*, 2010) tandis que les concentrés et isolats de protéines de pois ont en général une meilleure digestibilité de 90 à 99% (Rutherford *et al.*, 2015; Tulbek *et al.*, 2017; Corgneau *et al.*, 2019). Cependant, Çabuk *et al.* (2018) ont mesuré une digestibilité *in vitro* de seulement 80% pour un concentré de protéines de pois contre 87% pour de la farine de pois (Nosworthy *et al.*, 2017). Selon l'ACIA (2018), le CEP de la farine de pois est de 1,2. Un concentré de protéines de pois aurait un CEP de 1,2 selon Gilani et Lee (2003) et Mitchell *et al.* (1989). Le faible CEP du pois peut être augmenté avec une supplémentation en méthionine (Owusu-Ansah *et al.*, 1991).

Le goût du pois en fait un frein à son utilisation. En effet, il possède un goût prononcé végétal, un goût amer et une saveur persistante qui ne sont pas particulièrement appréciés des consommateurs (Murray *et al.*, 1968; Murat *et al.*, 2013). Le pois a aussi une perception dite « *beany* », identifiée dans les légumineuses, notamment le soya, qui se rapporte à des notes de « moisi/terreux », « poussiéreux », « poudré », « aigre » (Vara-Ubol *et al.*, 2004). Ces défauts sensoriels vont dépendre de la méthode d'extraction, de la variété de pois ou encore du stockage (Azarnia *et al.*, 2011; Murat *et al.*, 2013; Roland *et al.*, 2017). La fermentation constitue un bon moyen de diminuer les défauts sensoriels du pois. Meinschmidt *et al.* (2016) ont diminué la saveur amère et persistante d'un produit à base de soya en le fermentant avec *L. helveticus*. Schindler *et al.* (2012) ont démontré que la fermentation lactique pouvait masquer les arômes indésirables du pois. Aussi, les micro-organismes utilisés pour la fermentation vont mener à un profil aromatique différent (Ben-Hard *et al.*, 2019). La formulation des aliments peut permettre de masquer certaines caractéristiques sensorielles qui font défaut par ajout de sucre ou d'arômes par exemple.

Babault *et al.* (2015) ont étudié l'effet des protéines de pois pendant un entraînement de résistance, et ont observé une augmentation plus importante de l'épaisseur musculaire comparativement à un placebo et à des protéines de lactosérum. Également, Banaszek *et al.* (2019) ont démontré que l'ingestion de protéines de lactosérum ou de pois avait les mêmes impacts sur l'épaisseur musculaire, la force produite et la performance pendant un entraînement de force de haute intensité. Les protéines de pois seraient de ce fait une très bonne option pour remplacer le lactosérum et une des meilleures alternatives aux protéines de soya (Babault *et al.*, 2015; Barac *et al.*, 2015) et ont un grand potentiel en tant qu'ingrédient alimentaire (Choi et Han, 2001; Stone *et al.*, 2015).

4.5. Les protéines de chanvre

Le chanvre (*Cannabis sativa* L.) est une plante herbacée cultivée annuellement et a traditionnellement été utilisé pour ses fibres contenues dans sa tige. Ses fibres sont notamment utilisées pour la fabrication de vêtements et de papiers. Il est également utilisé depuis longtemps comme huile comestible ou dans la médecine populaire dans les pays asiatiques (Callaway, 2004). Du fait de sa haute teneur en tétrahydrocannabinol (THC), les graines de chanvre ont été peu commercialisées comme aliment dans le reste du monde jusqu'à il y a une vingtaine d'années, où du chanvre industriel faible en THC est devenu disponible, notamment au Canada (Aluko, 2017). Le chanvre a l'avantage de bien pousser dans des climats variés et n'a pas ou peu besoin d'herbicides, pesticides ou fongicides (MAFRD, 2015).

Les graines de chanvre contiennent 20-25% de protéines (Callaway, 2004). Les protéines du chanvre sont principalement l'édestine (une globuline) et l'albumine (Odani & Odani, 1998). Le sous-produit des graines de chanvre dont l'huile a été extraite et qui ont été broyées est la farine de protéines de chanvre qui contient entre 30 et 50% de protéines. En décortiquant, en dégraissant et en enlevant la majorité des composés non protéiques de la farine, on obtient un concentré de protéines de chanvres qui contient environ 65% de protéines (Wang & Xiong, 2019). L'isolat protéique est le plus souvent obtenu par extraction au NaOH suivi d'une précipitation isoélectrique et peut contenir jusqu'à 95% de protéines (Wang *et al.*, 2008; Malomo *et al.*, 2014). Les protéines de chanvre ont une bonne composition en acides aminés essentiels et la lysine est le premier acide aminé limitant (Tang *et al.*, 2006; House *et al.*, 2010). Elles contiennent environ 12% d'arginine lorsque les autres sources de protéines (maïs, riz, soya, caséine, blanc d'œuf) en contiennent moins de 7% (Callaway, 2004). L'arginine est un précurseur de l'oxyde nitrique qui améliore la circulation sanguine et contribue à une bonne pression sanguine (Wu & Meininger, 2002). Les protéines de chanvre libèrent des peptides bioactifs qui ont de nombreuses propriétés notamment antioxydantes (Girgih *et al.*, 2014a), hypocholestérolémiantes (Zanoni *et al.*, 2017), antihypertensives (Malomo *et al.*, 2015b), d'inhibition de l'acétylcholinestérase, de la rénine et de l'enzyme de conversion (Girgih *et al.*, 2014b; Malomo & Aluko, 2016).

Un isolat de protéines de chanvre a une capacité de rétention d'eau et de stabilisation d'une émulsion plus faible que pour un isolat de protéines de soya, mais a la même capacité d'absorption des graisses (Tang *et al.*, 2006). Ses mauvaises propriétés fonctionnelles sont dues à la grande quantité en acides aminés soufrés qui vont mener à une formation de liaisons disulfures et donc à l'agrégation des protéines à pH neutre ou acide. La méthode d'extraction va avoir un impact sur les capacités des propriétés fonctionnelles de l'isolat de chanvre. Une

extraction alcaline va produire un isolat avec une plus forte capacité de rétention d'eau par rapport à une extraction acide ou à un simple procédé de dégraissage (Teh *et al.*, 2013). Les protéines de chanvre ont une solubilité très faible entre les pH 4 et 6. Elle est proche de 40% à pH 2 et > 80% à pH 8 (Tang *et al.*, 2006).

Les graines de chanvre contiennent peu de facteurs antinutritionnels tels que l'acide phytique ou les tannins (Russo & Reggiani, 2015). Les protéines de chanvre ont généralement une bonne digestibilité allant de 85 à 95% (House *et al.*, 2010; Malomo & Aluko, 2015a). Selon House *et al.* (2010), le CEP d'une farine de chanvre à 40% de protéines est de 1,65.

Contrairement aux protéines de lactosérum, il existe très peu de recherches sur l'effet des protéines végétales sur la performance d'un exercice de force ou sur la récupération après l'exercice. Upshaw (2014) a observé que l'ingestion de protéines de chanvre après un exercice de force améliorerait la force et l'hypertrophie musculaire ainsi que la performance à un degré similaire aux protéines de lactosérum. Du fait de leurs bonnes valeurs nutritionnelles, leur hypoallergénicité, leurs bénéfices sur la santé et leurs propriétés fonctionnelles, les protéines de chanvre attirent de plus en plus l'attention et voient le nombre de publications liées à ce sujet considérablement augmenter depuis 10 ans (Wang & Xiong, 2019). L'utilisation des protéines de chanvre dans les aliments enrichis en protéines comme alternative aux traditionnelles protéines de lactosérum ou de soya est en augmentation (Wang & Xiong, 2019).

5. La fermentation

5.1. Définition

La fermentation est un procédé, le plus souvent anaérobie, qui va induire des changements chimiques dans des substrats organiques par l'action d'enzymes produites par des micro-organismes. C'est une voie métabolique qui permet, tout comme la photosynthèse ou la respiration aérobie, de produire de l'énergie, sous forme d'ATP. Cette voie métabolique, considérée comme la plus ancienne, est commune aux procaryotes et aux eucaryotes. Il existe la fermentation anaérobie et la fermentation aérobie. Cette dernière est peu fréquente. C'est une voie métabolique qui permet la transformation des sucres par les cellules agissant en présence d'oxygène. Elle est notamment présente chez les levures *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* spp., les bactéries *Acetobacter* spp. et *Escherichia coli*, les cellules cancéreuses ou encore chez certaines plantes, qui, lorsque les concentrations extracellulaires de sucres sont en excès,

peuvent produire de l'alcool ou des acides organiques, et ce, même en conditions aérobies. Cela s'oppose à l'effet pasteur, observé chez la plupart des micro-organismes, qui est une inhibition de la fermentation due à la présence d'oxygène. Les fermentations acétiques et citriques sont principalement des fermentations aérobies (Menzel *et al.*, 1985; Thauer, 1988; Agreda *et al.*, 1993, Hutkins, 2008). La fermentation anaérobie, elle, est plus courante, et ne nécessite pas d'oxygène pour opérer. Les principales fermentations anaérobies sont la fermentation alcoolique et la fermentation lactique. Cette dernière, consiste en la formation d'acide lactique à partir de glucides par des bactéries spécifiques. Elle est notamment utilisée dans la fabrication de laits fermentés, de fromages, de saucissons ou encore de choucroutes. Les principaux ferments lactiques utilisés sont les lactobacilles, les bifidobactéries et certains streptocoques. Ils sont pour beaucoup considérés comme des probiotiques (Parvez *et al.*, 2006).

La fermentation est utilisée depuis des millénaires dans beaucoup de cultures différentes pour la préparation des aliments. Elle permet de conserver la nourriture, d'améliorer sa saveur, sa texture et sa digestibilité. La fermentation peut être naturelle ou induite. En effet, certains aliments contiennent déjà les bactéries, les levures, ou les moisissures responsables de la fermentation tandis que d'autres sont supplémentés en micro-organismes pour en induire une.

5.2. Impact sur les protéines et sur la digestibilité

La fermentation permet d'améliorer les valeurs nutritionnelles de nombreux légumes et céréales. En effet, les micro-organismes utilisés pour la fermentation vont produire des enzymes capables d'hydrolyser les constituants de la nourriture et vont aussi permettre de réduire les facteurs antinutritionnels, améliorant ainsi la digestibilité et la qualité nutritionnelle de l'aliment. Il existe de nombreux micro-organismes utilisés pour la fermentation des produits végétaux. Le temps de fermentation, le type de micro-organismes, les différentes souches utilisées, la matrice alimentaire vont avoir des effets différents. Le genre *Lactobacillus* est capable d'hydrolyser les protéines présentes dans son environnement et donc de générer des peptides et des acides aminés libres (Matar *et al.*, 1996; Raveschot *et al.*, 2018). L'hydrolyse d'une protéine forme des plus petits peptides qui sont absorbés plus efficacement comparativement à une protéine native (Grimble, 1994). Ainsi, l'hydrolyse des protéines alimentaires permet d'améliorer leur digestibilité ainsi que leur absorption (Clemente, 2000; Koopman *et al.*, 2009). Cependant, il a été démontré que l'activité protéolytique différait d'une souche de *Lactobacillus* à une autre (Donkor *et al.*, 2007). Aussi, les profils peptidiques des produits traités avec les différentes souches de *Lactobacillus* étudiées sont très distincts les uns des autres (Aguirre *et al.*, 2014). Rizzello *et al.* (2006) ont

démontré que certaines bactéries lactiques ont une activité protéolytique et permettent de produire une pâte de blé et de seigle prédigérée. Kiers *et al.* (2000), ont effectué une fermentation de graines de soya avec plusieurs souches de *Bacillus* spp. et ont observé une cassure des protéines en peptides de petit poids moléculaire solubles dans l'eau menant à un produit avec des nutriments hautement accessibles et dont le besoin de dégradation par les enzymes digestives est minimal. Shekib (1994) et Chandra-Hioe *et al.* (2016) ont observé une hausse de la digestibilité protéique *in vitro* de légumineuses après une fermentation naturelle et attribuent ce résultat à la dégradation de protéines complexes en produits plus simples et plus solubles.

Plusieurs études ont démontré que la fermentation notamment des végétaux induisait une augmentation de la digestibilité, et une baisse des facteurs antinutritionnels (Elyas *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 2017; Ogodo *et al.*, 2018). Binita et Khetarpaul (1997) ont effectué une fermentation lactique avec *L. acidophilus* d'un mélange alimentaire constitué de farine d'orge, de farine de soya vert, de lait écrémé en poudre et de pulpe de tomate. Une baisse significative ($p \leq 0,05$) des facteurs antinutritionnels (polyphénols et acide phytique) a été observée, ainsi qu'une amélioration significative ($p \leq 0,05$) de la digestibilité *in vitro* des protéines. Le mélange fermenté atteint ainsi une digestibilité de 77% contre 56% pour le mélange non fermenté.

Khattab *et al.* (2009) ont effectué une fermentation avec *Saccharomyces cerevisiae* sur des pois (*P. sativum* L.), des niébés (*V. sinensis* L.) et des haricots rouges (*P. vulgaris* L.). Ils ont observé une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la digestibilité pour toutes les espèces étudiées. Également, Murekatete *et al.* (2012), ont utilisé *S. cerevisiae* pour la fermentation d'une farine composée de sorgo, de maïs et de soya et ont observé une augmentation de 12% de la digestibilité.

La fermentation sur les légumes et les céréales a donc prouvé son efficacité quant à l'augmentation de la digestibilité des aliments étudiés pouvant être attribuée à l'activité protéolytique des ferments ou à la réduction des facteurs antinutritionnels. Blandino *et al.* (2003) considèrent la fermentation comme la façon la plus simple et la plus économique d'améliorer les valeurs nutritionnelles, les propriétés fonctionnelles et les propriétés sensorielles des céréales. Seulement, les effets varient grandement d'un micro-organisme à un autre, et d'un aliment à un autre, il existe donc une infinité de possibilités. Également, il existe très peu d'études sur l'effet de la fermentation sur les isolats ou concentrés de protéines végétales.

5.3. Effets sur les propriétés fonctionnelles et sensorielles

La fermentation modifie certaines caractéristiques physico-chimiques et entraîne des changements des caractéristiques fonctionnelles et sensorielles. Tout d'abord, la fermentation entraîne une baisse de pH, dû aux composés acides formés, baisse plus ou moins grande selon la durée du traitement et selon les micro-organismes responsables de la fermentation. De ce fait, l'acidité titrable augmente avec la fermentation, variant également selon les mêmes paramètres que le pH. L'acidification du milieu permet d'éliminer des bactéries pathogènes et permet ainsi une meilleure conservation d'un produit comparé au même produit non fermenté. C'est pourquoi la fermentation est beaucoup utilisée dans les régions où la préservation des aliments et la sécurité alimentaire sont un défi de tous les jours. Elle est donc très présente dans de nombreux pays en développement, en Afrique et en Asie notamment, que l'industrialisation mondiale n'a pas atteint et où l'accès à des équipements sophistiqués est limité. L'acidité du milieu va entraîner une modification de la solubilité des protéines ainsi qu'une modification de la viscosité. Effectivement, à un pH inférieur ou supérieur au point isoélectrique, la solubilité des protéines augmente, et elle est la plus faible au point isoélectrique. La fermentation permet ainsi une meilleure solubilité des protéines (Elkhalifa et Bernhardt, 2018). La fermentation a également un impact sur la viscosité, la faisant diminuer (Hayta *et al.*, 2001; Gernah *et al.*, 2011; Murekatete *et al.*, 2012). Aussi, la fermentation, faisant augmenter l'acidité du produit, a, en conséquence, un impact sur la saveur et les arômes du produit. Sans surprise, le produit est plus acide en bouche lorsqu'il est fermenté. La fermentation est notamment utilisée pour améliorer la saveur de certains produits (Schindler *et al.*, 2012).

6. Hypothèses, objectifs et moyens

6.1. Problématiques

Les besoins en protéines varient notamment en fonction de l'âge et de l'activité physique pratiquée. Les enfants, les personnes âgées et les sportifs ont des besoins plus élevés en protéines que la normale (Bauer *et al.*, 2013; Campbell *et al.*, 2007; Richter *et al.*, 2019). Les boissons enrichies en protéines peuvent contribuer à l'apport en protéines de ces personnes. Les protéines végétales sont considérées comme des protéines « incomplètes » du fait de leur manque en un ou plusieurs acides aminés (FDA, s.d.). Elles sont également moins digestibles que les protéines animales. Les boissons enrichies en protéines végétales contiennent donc souvent moins de protéines assimilables que celles enrichies en protéines animales. De plus, les

boissons enrichies en protéines peuvent présenter des défauts au niveau textural et sensoriel. La fermentation pourrait augmenter la digestibilité des protéines végétales; les protéines hydrolysées étant plus digestes (Tavano, 2013) ; et elle permet de modifier les propriétés sensorielles d'un aliment (Mehta *et al.*, 2012).

Dans le cadre de ce projet, il est proposé de combiner plusieurs sources de protéines afin d'obtenir une protéine « complète » et d'enrichir une boisson fermentée en ces différents mélanges protéiques. L'enrichissement de la boisson avec des protéines végétales ne devra pas avoir d'effet défavorable sur la saveur et la texture et la fermentation devra avoir des effets bénéfiques sur la qualité et la digestibilité des boissons enrichies. L'élaboration d'une boisson fermentée enrichie en protéines végétales est donc un défi sur plusieurs aspects. Un tel aliment fonctionnel répond à la demande du marché et aux problèmes environnementaux, en combinant une boisson probiotique et un enrichissement en protéines végétales ayant une valeur de qualité protéique améliorée.

6.2. Hypothèses

- 1) La fermentation lactique prédigère les protéines, les rendant plus absorbables et améliore ainsi la digestibilité de la boisson fermentée.
- 2) La fermentation d'une boisson enrichie en protéines végétales a un effet bénéfique sur la qualité et l'efficacité protéique la rendant proche de celle de la caséine, la protéine animale de référence et peut bénéficier d'une allégation nutritive.
- 3) Un bon ajustement des concentrations et ratios de différents mélanges protéiques permettra de mettre au point une boisson enrichie en protéines, acceptable au niveau sensoriel et gustatif par les consommateurs.
- 4) Un bon ajustement des concentrations et ratios de différents mélanges protéiques permettra de mettre au point une boisson enrichie en protéines dont les propriétés physico-chimiques, microbiologiques et sensorielles au long de l'entreposage seront similaires ou supérieures à la boisson non enrichie.

6.3. Objectifs

L'objectif principal du projet était l'élaboration d'une boisson probiotique enrichie en protéines végétales et ayant de bonnes valeurs nutritives. Les différentes étapes visaient à :

- 1) Mettre au point des boissons fermentées enrichies en différentes sources de protéines végétales (riz, pois, chanvre).
- 2) Évaluer l'effet de la fermentation sur le profil peptidique des boissons enrichies en protéines.
- 3) Évaluer l'effet de la fermentation sur la digestibilité protéique *in vitro* des boissons.
- 4) Sélectionner la boisson fermentée enrichie en protéines végétales ayant la meilleure qualité.
- 5) Évaluer le Coefficient d'Efficacité Protéique (CEP) et la digestibilité protéique *in vivo* de la boisson sélectionnée au point 4).
- 6) Analyser les probiotiques viables dans les fèces des rats nourris avec la boisson enrichie en protéines.
- 7) Analyser l'effet de l'entreposage à 4 °C sur le profil peptidique, les propriétés physico-chimiques, microbiologiques et sensorielles de la boisson fermentée enrichie en protéines végétales.

6.4. Moyens pour attendre les objectifs

- 1) Les boissons ont été mises au point en utilisant plusieurs mélanges de différentes sources de protéines (pois, riz, chanvre) à ajouter aux boissons. Les mélanges ont été choisis dans le but de satisfaire les besoins en AAE, ils ont également été choisis en fonction de leurs quantités de protéines, de leurs faisabilités et de leurs CEP théoriques calculés par rapport aux CEP de chaque source de protéine seule indiqués dans la littérature.
- 2) Les profils peptidiques des boissons enrichies en protéines, fermentées et non fermentées, ont été évalués selon la distribution des poids moléculaires (Dong *et al.*, 2007) par HPLC *size exclusion* (SEC) en utilisant une colonne Biosep-SEC 2000 (Phenomenex, Torrance, Canada) selon la méthode de González-Olivares *et al.* (2014).
- 3) Afin de mesurer la digestibilité *in vitro*, une digestion enzymatique séquentielle a été réalisée selon la méthode de Wang *et al.* (2014). La digestibilité a été calculée en fonction de l'azote libéré selon Ali *et al.* (2003) :

$$\% \text{ Digestibilité} = \frac{\text{Azote dans le surnageant}}{\text{Azote dans l'échantillon}} \times 100$$

- 4) La boisson ayant les meilleures caractéristiques étudiées (profil peptidique, digestibilité *in vitro*) a été sélectionnée.
- 5) La digestibilité *in vivo* a été déterminée selon Schneider *et al.* (1975) par expérimentation animale sur la boisson sélectionnée. De jeunes rats mâles ont été nourris pendant 14 jours avec une diète contenant comme source de protéines la boisson sélectionnée fermentée ou non fermentée. La quantité d'azote ingérée par rapport à la quantité d'azote excrétée a permis de calculer la digestibilité. Le CEP a également été déterminé par expérimentation animale en rapportant la prise de poids de l'animal sur la quantité de nourritures ingérées selon Henry (1965) et la méthode 960.48 de l'AOAC.
- 6) Les probiotiques viables dans les fèces ont été analysés selon une méthode de quantification moléculaire mise au point par Bio-K Plus^{MD} (non publiée). Les souches probiotiques ont été quantifiées par qPCR après extraction de l'ADN des matières fécales récoltées à la suite de l'expérimentation animale.
- 7) Au cours de l'entreposage à 4 °C, la viscosité a été évaluée à l'aide d'un viscosimètre Brookfield DVII+ (Ametek Brookfield, MA, USA), la couleur à l'aide d'un colorimètre (Konica Minolta, Osaka, Japon) et le pH à l'aide d'un pH-mètre. L'acidité titrable a été mesurée selon la méthode de titration au NaOH de l'AOAC 942.15 et exprimée en pourcentage d'acide lactique. Les analyses microbiologiques ont été effectuées sur milieu MRS, spécifique aux lactobacilles afin d'observer l'évolution de la concentration en probiotiques dans la boisson au cours de l'entreposage. Les analyses sensorielles ont été effectuées afin d'évaluer la texture, l'odeur, le goût et l'apparence générale à l'aide d'une échelle hédonique à 9 points.

Références

- Abdel-Aal, E.-S. (2008). Effects of baking on protein digestibility of organic spelt products determined by two in vitro digestion methods. *LWT - Food Science and Technology*, 41(7), 1282–1288.
- Adamczyk, B., Simon, J., Kitunen, V., Adamczyk, S., & Smolander, A. (2017). Tannins and Their Complex Interaction with Different Organic Nitrogen Compounds and Enzymes: Old Paradigms versus Recent Advances. *ChemistryOpen*, 6(5), 610–614.
- Agence Canadienne d'inspection des aliments. (2019). Allégations relatives aux probiotiques. ACIA, gouvernement du Canada. <http://www.inspection.gc.ca/aliments/exigences-et-directives/etiquetage/industrie/allegations-sante/fra/1392834838383/1392834887794?chap=10> (Consulté le 30 septembre 2019).
- Agence Canadienne d'inspection des aliments. (2019). L'étiquetage des aliments pour l'industrie. ACIA, gouvernement du Canada. <https://www.inspection.gc.ca/exigences-en-matiere-d-etiquetage-des-aliments/etiquetage/industrie/fra/1383607266489/1383607344939> (Consulté le 07 janvier 2020)
- Agence Canadienne d'inspection des aliments. (2018). Éléments du tableau de la valeur nutritive. ACIA, gouvernement du Canada. <https://www.inspection.gc.ca/aliments/exigences-et-directives/etiquetage/industrie/etiquetage-nutritionnel/elements-du-tableau-de-la-valeur-nutritive/fra/1389206763218/1389206811747?chap=7> (Consulté le 07 octobre 2019).
- Agence Canadienne d'inspection des aliments. (2018). Information contenue dans le tableau de la valeur nutritive - Ration quotidienne. ACIA, gouvernement du Canada. <https://www.inspection.gc.ca/exigences-en-matiere-d-etiquetage-des-aliments/etiquetage/industrie/etiquetage-nutritionnel/tableau-de-la-valeur-nutritive/fra/1389198568400/1389198597278?chap=6> (Consulté le 18 janvier 2020)
- Agreda, V. H., & Zoeller, J. R. (1993). *Acetic acid and its derivatives*. New York: M. Dekker.
- Agriculture et Agroalimentaire Canada. (2017). Aliments fonctionnels et produits de santé naturels. Agriculture et Agroalimentaire Canada, Gouvernement du Canada. <https://www5.agr.gc.ca/fra/industrie-marches-et-commerce/renseignements-sur-les-secteurs-canadiens-de-l-agroalimentaire/aliments-fonctionnels-et-produits-de-sante-naturels/?id=1170856376710> (Consulté le 07 janvier 2020).
- Aguirre, L., Hebert, E. M., Garro, M. S., & Giori, G. S. D. (2014). Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains on soybean proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 780–785.
- Albarracín, M., González, R. J., & Drago, S. R. (2013). Effect of soaking process on nutrient bio-accessibility and phytic acid content of brown rice cultivar. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 76–80.
- Ali, M. A., Tinay, A. H. E., & Abdalla, A. H. (2003). Effect of fermentation on the *in vitro* protein digestibility of pearl millet. *Food Chemistry*, 80(1), 51–54.

- Aluko, R. (2017). Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Proteins. *Sustainable Protein Sources*, 121–132.
- Aluko, R. E., Mofolasayo, O. A., & Watts, B. M. (2009). Emulsifying and Foaming Properties of Commercial Yellow Pea (*Pisum sativum* L.) Seed Flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), 9793–9800.
- Amanzadeh, J., Gitomer, W. L., Zerwekh, J. E., Preisig, P. A., Moe, O. W., Pak, C. Y., & Levi, M. (2003). Effect of high protein diet on stone-forming propensity and bone loss in rats. *Kidney International*, 64(6), 2142–2149.
- AOAC. (2003). Methods 942.15, 991.20, 960.48. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International, 17th ed. AOAC International: Gaithersburg, ML.
- Arntfield, S., Ismond, M., & Murray, E. (1985). The Fate of Antinutritional Factors During the Preparation of a Fababean Protein Isolate using a Micellization Technique. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 18(2), 137–143.
- Ashraf, R., & Shah, N. P. (2014). Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 938–956.
- Azarnia, S., Boye, J.I., Warkentin, T., Malcolmson, L., Sabik, H., Bellido, A.S. (2011). Volatile flavour profile changes in selected field pea cultivars as affected by crop year and processing. *Food Chemistry*, 124(1), 326–335.
- Babault, N., Paizis, C., Deley, G., Guérin-Deremaux, L., Saniez, M.-H., Lefranc-Millot, C., & Allaert, F. A. (2015). Pea proteins oral supplementation promotes muscle thickness gains during resistance training: a double-blind, randomized, Placebo-controlled clinical trial vs. Whey protein. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 12(1), 3.
- Baldwin, C., Millette, M., Oth, D., Ruiz, M. T., Luquet, F.-M., & Lacroix, M. (2010). Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. Casei* mix sensitize colorectal tumoral cells to 5-fluorouracil-induced apoptosis. *Nutrition and Cancer*, 62(3), 371–378.
- Banaszek, A., Townsend, J. R., Bender, D., Vantrease, W. C., Marshall, A. C., & Johnson, K. D. (2019). The effects of whey vs. pea protein on physical adaptations following 8-weeks of high-intensity functional training (HIFT): A pilot study. *Sports*, 7(1), 12.
- Bansal, S., Mangal, M., Sharma, S. K., & Gupta, R. K. (2015). Non-dairy Based Probiotics: A Healthy Treat for Intestine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(11), 1856–1867.
- Barac, M., Pesic, M., Stanojevic, S., Kostic, A., & Cabrilo, S. (2015). Techno-functional properties of pea (*Pisum sativum*) protein isolates: A review. *Acta Periodica Technologica*, (46), 1–18.
- Barac, M. B., Pesic, M. B., Stanojevic, S. P., Kostic, A. Z., & Bivolarevic, V. (2014). Comparative study of the functional properties of three legume seed isolates: adzuki, pea and soy bean. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2779–2787.
- Barbana, C., & Boye, J. I. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. *Food Research International*, 43(6), 1642–1649.

- Bauer, J., Biolo, G., Cederholm, T., Cesari, M., Cruz-Jentoft, A. J., Morley, J. E., Phillips, S., Sieber, C., Stehle, P., Teta, D., Visvanathan, R., Volpi, E., Boirie, Y. (2013) Evidence-based recommendations for optimal dietary protein intake in older people: a position paper from the PROT-AGE Study Group. *Journal of the American Medical Directors Association*, 14(8),542-559.
- Beausoleil, M., Fortier, N., Guénette, S., L'Ecuyer, A., Savoie, M., Franco, M., Lachaîne, J., Weiss, K. (2007). Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* CL1285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 21(11), 732–736.
- Beasley, J. M., Lacroix, A. Z., Neuhausser, M. L., Huang, Y., Tinker, L., Woods, N., ... Prentice, R. L. (2010). Protein intake and incident frailty in the women's health initiative observational study. *Journal of the American Geriatrics Society*, 58(6), 1063–1071.
- Beelen, J., Vasse, E., Janssen, N., Janse, A., Roos, N. M. D., & Groot, L. C. D. (2018). Protein-enriched familiar foods and drinks improve protein intake of hospitalized older patients: A randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*, 37(4), 1186–1192.
- Beelen, M., Burke, L. M., Gibala, M. J., & Loon, L. J. V. (2010). Nutritional strategies to promote postexercise recovery. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 20(6), 515–532.
- Ben-Harb, S., Saint-Eve, A., Panouillé, M., Souchon, I., Bonnarme, P., Dugat-Bony, E., & Irlinger, F. (2019). Design of microbial consortia for the fermentation of pea-protein-enriched emulsions. *International Journal of Food Microbiology*, 293, 124–136.
- Binita, R., & Khetarpaul, N. (1997). Probiotic fermentation: effect on antinutrients and digestibility of starch and protein of indigenously developed food mixture. *Nutrition and Health*, 11(3), 139–147.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M., Pandiella, S., Cantero, D., & Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36(6), 527–543.
- Børsheim, E., Bui, Q.-U. T., Tissier, S., Kobayashi, H., Ferrando, A. A., & Wolfe, R. R. (2008). Effect of amino acid supplementation on muscle mass, strength and physical function in elderly. *Clinical Nutrition*, 27(2), 189–195.
- Bodwell, C. E., Satterlee, L. D., & Hackler, L. R. (1980). Protein digestibility of the same protein preparations by human and rat assays and by *in vitro* enzymic digestion methods. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 33(3), 677–686.
- Boye, J., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537–546.
- Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R., & Burlingame, B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S183–S211.

- Caballero-Franco, C., Keller, K., Simone, C. D., & Chadee, K. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(1), G315–G322.
- Çabuk, B., Nosworthy, M. G., Stone, A. K., Korber, D. R., Tanaka, T., House, J. D., & Nickerson, M. T. (2018). Effect of Fermentation on the Protein Digestibility and Levels of Non-Nutritive Compounds of Pea Protein Concentrate. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2), 257–264.
- Cagno, R. D., Minervini, G., Rizzello, C. G., Angelis, M. D., & Gobbetti, M. (2011). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology*, 28(5), 1062–1071.
- Cai, J., Yang, L., He, H.-J., Xu, T., Liu, H.-B., Wu, Q., Ma, Y., Lui, Q.H., Nie, M.-H. (2014). Antioxidant capacity responsible for a hypocholesterolemia is independent of dietary cholesterol in adult rats fed rice protein. *Gene*, 533(1), 57-66.
- Callaway, J. C. (2004). Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, 140(1-2), 65–72.
- Campbell, B., Kreider, R. B., Ziegenfuss, T., Bounty, P. L., Roberts, M., Burke, D., Landis, J., Lopez, H., Antonio, J. (2007). International Society of Sports Nutrition position stand: protein and exercise. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 4(1), 8–10.
- Campbell, W. W., Crim, M. C., Dallal, G. E., Young, V. R., & Evans, W. J. (1994). Increased protein requirements in elderly people: new data and retrospective reassessments. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 60(4), 501–509.
- Cao, X., Wen, H., Li, C., & Gu, Z. (2009). Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. *Journal of Cereal Science*, 50(2), 184–189.
- Chandi, G. K., & Sogi, D. (2007). Functional properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Engineering*, 79(2), 592–597.
- Chandra-Hioe, M. V., Wong, C. H. M., & Arcot, J. (2016). The Potential Use of Fermented Chickpea and Faba Bean Flour as Food Ingredients. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(1), 90–95.
- Chang, K., Lee, C., & Brown, G. (1986). Production and Nutritional Evaluation of High-Protein Rice Flour. *Journal of Food Science*, 51(2), 464–467.
- Chapagain, A., & Hoekstra, A. (2011). The blue, green and grey water footprint of rice from production and consumption perspectives. *Ecological Economics*, 70(4), 749–758.
- Chavan, U., Mckenzie, D., & Shahidi, F. (2001). Functional properties of protein isolates from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Food Chemistry*, 74(2), 177–187.
- Choi, W-S. & Han, J.H (2001) Physical and Mechanical Properties of Pea-Protein-based Edible Films. *Journal of Food Science*, 66, 319–322.
- Clark, M., & Tilman, D. (2017). Comparative analysis of environmental impacts of agricultural production systems, agricultural input efficiency, and food choice. *Environmental Research Letters*, 12(6), 064016.

Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 11(7), 254–262.

Coles, L., Moughan, P., & Darragh, A. (2005). *In vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 421–444.

Corgneau, M., Gaiani, C., Petit, J., Nikolova, Y., Banon, S., Ritié-Pertusa, L., Le, D. T. L., Scher, J. (2019). Nutritional quality evaluation of commercial protein supplements. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(8), 2586–2594.

Corr, S. C., Hill, C., & Gahan, C. G. (2009). Chapter 1 Understanding the Mechanisms by Which Probiotics Inhibit Gastrointestinal Pathogens. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1–15.

Cribb, P. J., Williams, A. D., Stathis, C. G., Carey, M. F., & Hayes, A. (2007). Effects of whey isolate, creatine, and resistance training on muscle hypertrophy. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 39(2), 298–307

Didari, T., Mozaffari, S., Nikfar, S., & Abdollahi, M. (2015). Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: Updated systematic review with meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 21(10), 3072-3084.

Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007). Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and *in vitro* angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Le Lait*, 87(1), 21–38.

Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., & Yang, H. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107(4), 1485–1493.

Edozien, J. C. (1968). Experimental Kwashiorkor and Marasmus. *Nature*, 220(5170), 917–919.

Eisenstein, J., Roberts, S. B., Dallal, G., & Saltzman, E. (2002). High-protein Weight-loss Diets: Are They Safe and Do They Work? a Review of the Experimental and Epidemiologic Data. *Nutrition Reviews*, 60(7), 189–200.

Ekholm, P., Virkki, L., Ylinen, M., & Johansson, L. (2003). The effect of phytic acid and some natural chelating agents on the solubility of mineral elements in oat bran. *Food Chemistry*, 80(2), 165–170.

Ei-Hady, E. A., & Habiba, R. (2003). Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 36(3), 285–293.

Ei-Niely, H. F. (2007). Effect of radiation processing on antinutrients, *in-vitro* protein digestibility and protein efficiency ratio bioassay of legume seeds. *Radiation Physics and Chemistry*, 76(6), 1050-1057.

Elkhalifa, A. E. O., & Bernhardt, R. (2018). Combination Effect of Germination and Fermentation on Functional Properties of Sorghum Flour. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 30(1), 1–12.

Elyas, S. H., Tinay, A. H. E., Yousif, N. E., & Elsheikh, E. A. (2002). Effect of natural fermentation on nutritive value and *in vitro* protein digestibility of pearl millet. *Food Chemistry*, 78(1), 75–79.

Fabian, C., & Ju, Y.-H. (2011). A Review on Rice Bran Protein: Its Properties and Extraction Methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(9), 816–827.

FAO. (2003). Food energy – methods of analysis and conversion factors. FAO Food and Nutrition Paper 77. Rome, Italy.

FAO. (2013). Dietary protein quality evaluation in human nutrition. FAO Food and Nutrition Paper 92.

FAO. (2015). Food and agriculture organization statistics.

FDA. Nutrition Facts Label: Protein.

<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/InteractiveNutritionFactsLabel/factsheets/Protein.pdf>
(Consulté le 10 janvier 2020).

Fredrikson, M., Biot, P., Alminger, M. L., Carlsson, N.-G., & Sandberg, A.-S. (2001). Production Process for High-Quality Pea-Protein Isolate with Low Content of Oligosaccharides and Phytate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1208–1212.

Gaboriau-Routhiau, V., & Cerf-Bensussan, N. (2016). Microbiote intestinal et développement du système immunitaire. *Médecine/Sciences*, 32(11), 961–967.

Gao, X. W., Mubasher, M., Fang, C. Y., Reifer, C., & Miller, L. E. (2010). Dose–Response Efficacy of a Proprietary Probiotic Formula of *Lactobacillus acidophilus* CL1285 and *Lactobacillus casei* LBC80R for Antibiotic-Associated Diarrhea and *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea Prophylaxis in Adult Patients. *American Journal of Gastroenterology*, 105(7), 1636–1641.

Galdeano, C. M., & Perdigon, G. (2006). The Probiotic Bacterium *Lactobacillus casei* Induces Activation of the Gut Mucosal Immune System through Innate Immunity. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(2), 219–226.

Gernah, D., Ariahu, C., & Ingbian, E. (2011). Effects of Malting and Lactic Fermentation on Some Chemical and Functional Properties of Maize (*Zea mays*). *American Journal of Food Technology*, 6(5), 404–412.

Ghavidel, R. A., & Prakash, J. (2007). The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, *in vitro* iron and calcium bioavailability and *in vitro* starch and protein digestibility of some legume seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 40(7), 1292–1299.

Gibala, M. J. (2007). Protein metabolism and endurance exercise. *Sports Medicine*, 37(4), 337–340.

Gilani, G. S., Xiao, C. W., & Cockell, K. A. (2012). Impact of Antinutritional Factors in Food Proteins on the Digestibility of Protein and the Bioavailability of Amino Acids and on Protein Quality. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S315–S332.

Gilani, G., & Lee, N. (2003). PROTEIN | Quality. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, (Ed. 2), 4847–4854.

Girgih, A., Alashi, A., He, R., Malomo, S., Raj, P., Netticadan, T., & Aluko, R. (2014a). A Novel Hemp Seed Meal Protein Hydrolysate Reduces Oxidative Stress Factors in Spontaneously Hypertensive Rats. *Nutrients*, 6(12), 5652–5666.

Girgih, A. T., Alashi, A., He, R., Malomo, S., & Aluko, R. E. (2014b). Preventive and treatment effects of a hemp seed (*Cannabis sativa L.*) meal protein hydrolysate against high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Nutrition*, 53, 1237–1246.

González-Olivares, L. G., Añorve-Morga, J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., & Jaimez-Ordaz, J. (2014). Peptide separation of commercial fermented milk during refrigerated storage. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34(4), 674–679.

Grand view research. (2019). Protein Supplements Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Powder, Ready to Drink), By Application, By Raw Material, By Source, By Distribution Channel, By Region, And Segment Forecasts, 2019 – 2025.

Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., & Faria, J. A. (2010). Functional Foods and Non-dairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 292–302.

Grimble, G. (1994). The significance of peptides in clinical nutrition. *Annual Review Nutrition*, 14, 419-447.

Guillet, C., Prod'Homme, M., Balage, M., Gachon, P., Giraudet, C., Morin, L., Grizard, J., Boirie, Y. (2004). Impaired anabolic response of muscle protein synthesis is associated with S6K1 dysregulation in elderly humans. *The FASEB Journal*, 18(13), 1586–1587.

Habiba, R. (2002). Changes in anti-nutrients, protein solubility, digestibility, and HCl-extractability of ash and phosphorus in vegetable peas as affected by cooking methods. *Food Chemistry*, 77(2), 187–192.

Hall, C. (2008). Antinutrients, digestibility and antigenicity of pulses. In: Pulse quality and utilization short course, October, 2008, Fargo, ND.

Han, S.-W., Chee, K.-M., & Cho, S.-J. (2015). Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. *Food Chemistry*, 172, 766–769.

Hayta, M., Alpaslan, M., & Köse, E. (2001). The effect of fermentation on viscosity and protein solubility of Boza, a traditional cereal-based fermented Turkish beverage. *European Food Research and Technology*, 213(4-5), 335–337.

Health protection branch. (1981). Determination of protein rating, Official method. Ottawa, Health Canada, Health protection branch, FO-1.

Hempel, S., Newberry, S. J., Maher, A. R., Wang, Z., Miles, J. N., Shanman, R., Johnsen, B., Shekelle, P. G. (2012). Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *Jama*, 307(18), 1959–1969.

Henry, K. M. (1965). A comparison of biological methods with rats for determining the nutritive value of proteins. *The British Journal of Nutrition*, 19, 125–135.

- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 506.
- Hoekstra, A. J. (2015). The water footprint: The relation between human consumption and water use. In M. Antonelli, & F. Greco (Eds.), *The water we eat*. Switzerland: Springer International Publishing.
- Hoffman, J. R., Ratamess, N. A., Tranchina, C. P., Rashti, S. L., Kang, J., & Faigenbaum, A. D. (2009). Effect of a proprietary protein supplement on recovery indices following resistance exercise in strength/power athletes. *Amino Acids*, 38(3), 771–778.
- Hoogenkamp, H., Kumagai, H., & Wanasundara, J. (2017). Rice Protein and Rice Protein Products. *Sustainable Protein Sources*, 47–65.
- Hossain, M., Nahar, N., & Kamal, M. (1997). Nutrient digestibility coefficients of some plant and animal proteins for rohu (*Labeo rohita*). *Aquaculture*, 151(1-4), 37–45.
- House, J. D., Neufeld, J., & Leson, G. (2010). Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa L.*) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11801–11807.
- Hoveyda, N., Heneghan, C., Mahtani, K. R., Perera, R., Roberts, N., & Glasziou, P. (2009). A systematic review and meta-analysis: probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterology*, 9(1).
- Hu, F. B. (2003). Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 544S–551S.
- Hutkins, R.W. (2008) *Microbiology and technology of fermented foods*. Wiley-Blackwell.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1–12.
- Ingrassia, I., Leplingard, A., & Darfeuille-Michaud, A. (2005). *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from crohns disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 2880–2887.
- Jäger, R., Purpura, M., Farmer, S., Cash, H. A., & Keller, D. (2017). Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 Improves Protein Absorption and Utilization. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(4), 611–615.
- Jin, J., Ma, H., Zhou, C., Luo, M., Liu, W., Qu, W., He, R., Luo, L., Yagoub, A. E.-G. A. (2014). Effect of degree of hydrolysis on the bioavailability of corn gluten meal hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(12), 2501–2509.
- Johnston, B. C., Goldenberg, J. Z., Vandvik, P. O., Sun, X., & Guyatt, G. H. (2011). Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (11).

Johnston, C. S., Tjonn, S. L., & Swan, P. D. (2004). High-Protein, Low-Fat Diets Are Effective for Weight Loss and Favorably Alter Biomarkers in Healthy Adults. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 586–591.

Joy, J. M., Lowery, R. P., Wilson, J. M., Purpura, M., Souza, E. O. D., Wilson, S. M., Kalman, D. S., Dudeck, J. E., Jäger, R. (2013). The effects of 8 weeks of whey or rice protein supplementation on body composition and exercise performance. *Nutrition Journal*, 12(1), 12–86.

Kalpanadevi, V., & Mohan, V. (2013). Effect of processing on antinutrients and *in vitro* protein digestibility of the underutilized legume, *Vigna unguiculata* (L.) Walp subsp. *unguiculata*. *LWT - Food Science and Technology*, 51(2), 455–461.

Kannan, S., Nielsen, S. S., & Mason, A. C. (2001). Protein digestibility-corrected amino acid scores for bean and bean-rice infant weaning food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 5070–5074.

Karska-Wysocki, B., Bazo, M., & Smoragiewicz, W. (2010). Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiological Research*, 165(8), 674–686.

Kataria, A., Chauhan, B., & Punia, D. (1989). Antinutrients and protein digestibility (*in vitro*) of mungbean as affected by domestic processing and cooking. *Food Chemistry*, 32(1), 9–17.

Katsanos, C. S., Kobayashi, H., Sheffield-Moore, M., Aarsland, A., & Wolfe, R. R. (2005). Aging is associated with diminished accretion of muscle proteins after the ingestion of a small bolus of essential amino acids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(5), 1065–1073.

Khattab, R., Arntfield, S., & Nyachoti, C. (2009). Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments, Part 1: Protein quality evaluation. *LWT - Food Science and Technology*, 42(6), 1107–1112.

Khurana, S., Venkataraman, K., Hollingsworth, A., Piche, M., & Tai, T. (2013). Polyphenols: Benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients*, 5(10), 3779–3827.

Kiers, J., Laeken, A. V., Rombouts, F., & Nout, M. (2000). *In vitro* digestibility of *Bacillus* fermented soya bean. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2-3), 163–169.

Koopman, R., Crombach, N., Gijzen, A. P., Walrand, S., Fauquant, J., Kies, A. K., ... Loon, L. J. V. (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.

Krul, E. S. (2019). Calculation of Nitrogen-to-Protein Conversion Factors: A Review with a Focus on Soy Protein. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 96(4), 339–364.

Kubota, M., Watanabe, R., Kabasawa, H., Iino, N., Saito, A., Kumagai, T., & Kadowaki, M. (2013). Rice protein ameliorates the progression of diabetic nephropathy in Goto-Kakizaki rats with high-sucrose feeding. *British Journal of Nutrition*, 110(7), 1211–1219.

Kullar, R., Johnson, S., McFarland, L. V., Goff, D. A., & Goldstein, E. J. (2020). Bundling Probiotics With Antimicrobial Stewardship Programs for the Prevention of *Clostridioides difficile* Infections in Acute Care Hospitals. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 28(3), 123–129.

Lacroix, M., Amiot, J., Bigué, N., & Brisson, G. (1983). Hydrolyse Enzymatique des Protéines de Colza. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 16(4), 242–245.

Li, H., Zhu, K., Zhou, H., Peng, W., & Guo, X. (2013). Comparative Study About Some Physical Properties, *In vitro* Digestibility and Immunoreactivity of Soybean Protein Isolate for Infant Formula. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(2), 124–130.

Li, H., & Aluko, R. E. (2010). Identification and Inhibitory Properties of Multifunctional Peptides from Pea Protein Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21), 11471–11476.

Li, G.-H., Qu, M.-R., Wan, J.-Z., & You, J.-M. (2007). Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with *in vitro* angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(1), 275-280.

Liang, J., Han, B.-Z., Nout, M. R., & Hamer, R. J. (2008). Effects of soaking, germination and fermentation on phytic acid, total and *in vitro* soluble zinc in brown rice. *Food Chemistry*, 110(4), 821–828.

Lorefält, B., Wissing, U., Unosson, M. (2005). Smaller but energy and protein-enriched meals improve energy and nutrient intakes in elderly patients. *The journal of nutrition, health & aging*, 9(4), 243-247.

Lumina Intelligence. (2018). Whey, Soy, and Pea Protein Market Trends in Sports Nutrition. <https://www.lumina-intelligence.com/2018/11/27/whey-soy-and-pea-protein-market-trends-in-sports-nutrition/#pea> (Consulté le 02 février 2020)

Lye, H.-S., Kuan, C.-Y., Ewe, J.-A., Fung, W.-Y., & Liang, M.-T. (2009). The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3755–3775.

Mack, D. R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., and Hollingsworth, M. A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut* 52, 827–833.

Macpherson, A. J., & Harris, N. L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 4(6), 478–485.

MAFRD. (2015). Industrial hemp production and management. Manitoba Agriculture, Food and Rural Development. <https://www.gov.mb.ca/agriculture/crops/production/hemp-production.html> (Consulté le 24 janvier 2020)

Mäkinen, O. E., Wanhalinna, V., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2015). Foods for Special Dietary Needs: Non-dairy Plant-based Milk Substitutes and Fermented Dairy-type Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(3), 339–349.

Malomo, S. A., & Aluko, R. E. (2016). *In vitro* acetylcholinesterase-inhibitory properties of enzymatic hemp seed protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93, 411–420.

Malomo, S. A., & Aluko, R. E. (2015a). Conversion of a low protein hemp seed meal into a functional protein concentrate through enzymatic digestion of fibre coupled with membrane ultrafiltration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31, 151–159.

- Malomo, S. A., Onuh, J. O., Girgih, A. T., & Aluko, R. E. (2015b). Structural and antihypertensive properties of enzymatic hemp seed protein hydrolysates. *Nutrients*, 7, 7616–7632.
- Malomo, S. A., He, R., & Aluko, R. E. (2014). Structural and functional properties of hemp seed protein products. *Journal of Food Science*, 79, C1512–C1521.
- Mariotti, F., Tomé, D., & Mirand, P. P. (2008). Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones Factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(2), 177–184.
- Mariotti, F. (2017). Plant Protein, Animal Protein, and Protein Quality. In *Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention* (pp. 621–642). Academic Press.
- Martin, W. F., Armstrong, L. E., & Rodriguez, N., R. (2005). Dietary Protein Intake and Renal Function. *Nutrition & Metabolism*, 2(25).
- Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Vanzela, E. S. L., Stringheta, P. C., Pinto, C. L. D. O., & Martins, J. M. (2013). Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51(2), 764–770.
- Matar, C., Amiot, J., Savoie, L., & Goulet, J. (1996). The Effect of Milk Fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the Release of Peptides During *In Vitro* Digestion. *Journal of Dairy Science*, 79(6), 971–979.
- Mattar, A. F., Teitelbaum, D. H., Drongowski, R. A., Yongyi, F., Harmon, C. M., & Coran, A. G. (2002). Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatric Surgery International*, 18(7), 586–590.
- Maziade, P. J., Pereira, P., & Goldstein, E. J. (2015). A decade of experience in primary prevention of *Clostridium difficile* infection at a community hospital using the probiotic combination *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R, and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 (Bio-K+). *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl_2), S144-S147.
- McFarland, L. V. (2007). Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 5(2), 97–105.
- McKinsey & Company. (2019). Alternative proteins: The race for market share is on. <https://www.mckinsey.com/industries/agriculture/our-insights/alternative-proteins-the-race-for-market-share-is-on> (Consulté le 02 février 2020)
- Mehta, B. M., Kamal-Eldin, A., & Iwanski, R. Z. (Eds.). (2012). *Fermentation: effects on food properties*. CRC Press.
- Meinlschmidt, Pia, Ueberham, E., Lehmann, J., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., (2016). Immunoreactivity, sensory and physicochemical properties of fermented soy protein isolate. *Food Chemistry*. 205, 229–238.
- Mensa-Wilmot, Y., Phillips, R., & Hargrove, J. (2001). Protein quality evaluation of cowpea-based extrusion cooked cereal/legume weaning mixtures. *Nutrition Research*, 21(6), 849–857.
- Menzel, U., & Gottschalk, G. (1985). The internal pH of *Acetobacterium wieringae* and *Acetobacter acetii* during growth and production of acetic acid. *Archives of Microbiology*, 143(1), 47–51.

- Midorikawa, K., Murata, M., Oikawa, S., Hiraku, Y., & Kawanishi, S. (2001). Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288(3), 552–557.
- Millette, M., Luquet, F., & Lacroix, M. (2007). In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus*- and *Lactobacillus casei*-fermented milk. *Letters in Applied Microbiology*, 44(3), 314–319.
- Min, M., Bunt, C. R., Mason, S. L., & Hussain, M. A. (2018). Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(16), 2626–2641.
- Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R., Huisintveld, J. H. J. (1995). A multicompartamental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small-intestine. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals*, 23(2), 197-209.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, M., et al. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–1124.
- Mitchell, G. V., Jenkins, M. Y., & Grundel, E. (1989). Protein efficiency ratios and net protein ratios of selected protein foods. *Plant Foods for Human Nutrition*, 39(1), 53–58.
- Moayyedi, P., Ford, A. C., Talley, N. J., Cremonini, F., Foxx-Orenstein, A. E., Brandt, L. J., & Quigley, E. M. M. (2008). The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut*, 59(3), 325–332.
- Moore, D. R. (2015). Nutrition to support recovery from endurance exercise. *Current Sports Medicine Reports*, 14(4), 294–300.
- Moore, D. R., Churchward-Venne, T. A., Witard, O., Breen, L., Burd, N. A., Tipton, K. D., & Phillips, S. M. (2014). Protein ingestion to stimulate myofibrillar protein synthesis requires greater relative protein intakes in healthy older versus younger men. *The journals of gerontology series a: biological sciences and medical sciences*, 70(1), 57–62.
- Morais, J. A., Chevalier, S., Gougeon, R. (2006). Protein turnover and requirements in the healthy and frail elderly. *The journal of nutrition, health & aging*, 10(4), 272-283.
- Murat, C., Bard, M.-H., Dhalleine, C., & Cayot, N. (2013). Characterisation of odour active compounds along extraction process from pea flour to pea protein extract. *Food Research International*, 53(1), 31–41.
- Murekatete, N., Hua, Y., Kong, X., & Zhang, C. (2012). Effects of Fermentation on Nutritional and Functional Properties of Soybean, Maize, and Germinated Sorghum Composite Flour. *International Journal of Food Engineering*, 8(1), 1–15.
- Murray, K. E., Shipton, J., Whitfield, F. B., Kennett, B. H., & Stanley, G. (1968). Volatile flavor components from green peas (*Pisum sativum*). *Journal of Food Science*, 33(3), 290–294.
- Nadathur, S. R., Wanasundara, J. P. D., & Scanlin, L. (Eds.). (2016). Sustainable protein sources. Academic Press.

Nature. (2014). Protein function. Scitable by Nature Education. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/protein-function-14123348/> (Consulté le 20 décembre 2019).

Ndiaye, F., Vuong, T., Duarte, J., Aluko, R. E., & Matar, C. (2011). Anti-oxidant, anti-inflammatory and immunomodulating properties of an enzymatic protein hydrolysate from yellow field pea seeds. *European Journal of Nutrition*, 51(1), 29–37.

Nnam, N. M., & Obiakor, P. N. (2003). Effect Of Fermentation On The Nutrient And Antinutrient Composition Of Baobab (*Adansonia Digitata*) Seeds And Rice (*Oryza Sativa*) Grains. *Ecology of Food and Nutrition*, 42(4-5), 265–277.

Nosworthy, M. G., Medina, G., Franczyk, A. J., Neufeld, J., Appah, P., Utioh, A., Frohlich, P., House, J. D. (2018). Effect of processing on the *in vitro* and *in vivo* protein quality of red and green lentils (*Lens culinaris*). *Food Chemistry*, 240, 588–593.

Nosworthy, M. G., Franczyk, A. J., Medina, G., Neufeld, J., Appah, P., Utioh, A., Frohlich, P., House, J. D. (2017). Effect of Processing on the *in Vitro* and *in Vivo* Protein Quality of Yellow and Green Split Peas (*Pisum sativum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(35), 7790–7796.

Nunes, A., Correia, I., Barros, A., & Delgadillo, I. (2004). Sequential *in vitro* Pepsin Digestion of Uncooked and Cooked Sorghum and Maize Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 2052–2058.

Oberleas, D., Muhrer, M. E., & Odell, B. L. (1966). Dietary metal-complexing agents and zinc availability in the rat. *The Journal of Nutrition*, 90(1), 56–62.

Odani, S., & Odani, S. (1998). Isolation and primary structure of a methionine-and cystine-rich seed protein of *Cannabis sativa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62, 650–654.

Ogodo, A. C., Ugbogu, O. C., Onyeagba, R. A., & Okereke, H. C. (2018). *In-vitro* starch and protein digestibility and proximate composition of soybean flour fermented with lactic acid bacteria (LAB) consortia. *Agriculture and Natural Resources*, 52(5), 503–509.

Olsen, J. V., Ong, S.-E., & Mann, M. (2004). Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(6), 608–614.

Osborne, T. B. (1924) *The vegetable proteins*. London: Longmans, Green and Co.

Osman, A. M. A., Hassan, A. B., Osman, G. A. M., Mohammed, N., Rushdi, M. A. H., Diab, E. E., & Babiker, E. E. (2012). Effects of gamma irradiation and/or cooking on nutritional quality of faba bean (*Vicia faba L.*) cultivars seeds. *Journal of Food Science and Technology*, 51(8), 1554–1560.

Owusu-Ansah, Y. J., & Mccurdy, S. M. (1991). Pea proteins: A review of chemistry, technology of production, and utilization. *Food Reviews International*, 7(1), 103–134.

Pakdaman, M. N., Udani, J. K., Molina, J. P., & Shahani, M. (2015). The effects of the DDS-1 strain of *Lactobacillus* on symptomatic relief for lactose intolerance - a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover clinical trial. *Nutrition Journal*, 15(1).

- Pan, A., Sun, Q., Bernstein A.M., Schulze M.B., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Willett, W.C., Hu, FB. (2012). Red meat consumption and mortality: results from 2 prospective cohort studies. *Archives of Internal Medicine*, 172(7), 555–563.
- Park, S. J., Kim, T. W., & Baik, B.-K. (2010). Relationship between proportion and composition of albumins, and *in vitro* protein digestibility of raw and cooked pea seeds (*Pisum sativum L.*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1719–1725.
- Parvez, S., Malik, K., Kang, S. A., & Kim, H.-Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171–1185.
- Patterson, C. A., Curran, J., & Der, T. (2017). Effect of processing on antinutrient compounds in pulses. *Cereal Chemistry Journal*, 94(1), 2–10.
- Pavek, P.L.S. (2012). Plant guide for pea (*Pisum sativum L.*). USDA-Natural Resources Conservation Service, Pullman, WA.
- Pedersen, B., & Eggum, B. O. (1983). Prediction of protein digestibility by an *in vitro* enzymatic pH-stat procedure. *Zeitschrift Für Tierphysiologie Tierernährung Und Futtermittelkunde*, 49(1-5), 265–277.
- Pellett, P. L. and Young, V. R. Eds. (1980) Nutritional evaluation of protein foods. Tokyo, Japan, United Nations University Press.
- Pelletier, X., Laure-Boussuge, S., & Donazzolo, Y. (2001). Hydrogen excretion upon ingestion of dairy products in lactose-intolerant male subjects: importance of the live flora. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55(6), 509–512.
- Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G., & Gobbato, N. (1995). Immune System Stimulation by Probiotics. *Journal of Dairy Science*, 78(7), 1597–1606.
- Phillips, S. M., & Loon, L. J. V. (2011). Dietary protein for athletes: From requirements to optimum adaptation. *Journal of Sports Sciences*, 29(sup1), S29–S38.
- Pietrysiak, E., Smith, D. M., Smith, B. M., & Ganjyal, G. M. (2018). Enhanced functionality of pea-rice protein isolate blends through direct steam injection processing. *Food Chemistry*, 243, 338–344.
- Pochapin, M. (2000). The effect of probiotics on *Clostridium difficile* diarrhea. *The American Journal of Gastroenterology*, 95(1), S11–S13.
- Popova, A., & Mihaylova, D. (2019). Antinutrients in plant-based foods: a review. *The Open Biotechnology Journal*, 13(1), 68–76.
- Powers, J. C., Harley, A. D., & Myers, D. V. (1977). Subsite Specificity of Porcine Pepsin. *Advances in Experimental Medicine and Biology Acid Proteases: Structure, Function, and Biology*, 141–157.
- Prakash, J., & Ramaswamy, H. S. (1996). Rice bran proteins: Properties and food uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(6), 537–552.

Prasad, B. M., Hollins, B., & Lambert, N. A. (2010). Methods to Detect Cell Surface Expression and Constitutive Activity of GPR6. *Methods in Enzymology Constitutive Activity in Receptors and Other Proteins*, Part A, 179–195.

Preston, K., Krumian, R., Hattner, J., Montigny, D. D., Stewart, M., & Gaddam, S. (2018). *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 improve quality-of-life and IBS symptoms: a double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Beneficial Microbes*, 9(5), 697–706.

Rafter, J., Bennett, M., Caderni, G., Clune, Y., Hughes, R., Karlsson, P. C., Klinder, A., O’Riordan, M., O’Sullivan, G. C., Pool-Zobel, B., Rechkemmer, G., Roller, M., Rowland, I., Salvadori, M., Thijs, H., Van Loo, J., Watzl, B. and Collins, J. K. (2007). Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(2), 488–496.

Raveschot, C., Cudennec, B., Coutte, F., Flahaut, C., Fremont, M., Drider, D., & Dhulster, P. (2018). Production of Bioactive Peptides by *Lactobacillus* Species: From Gene to Application. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2354.

Reddy, S. T., Wang, C.-Y., Sakhaee, K., Brinkley, L., & Pak, C. Y. (2002). Effect of low-carbohydrate high-protein diets on acid-base balance, stone-forming propensity, and calcium metabolism. *American Journal of Kidney Diseases*, 40(2), 265–274.

Reeves, T. G., Thomas, G., & Ramsay, G. (2016). Produire plus avec moins en pratique: le maïs, le riz, le blé. *Guide pour une production céréalière durable*.

Rehman, Z.-U., & Shah, W. (2005). Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chemistry*, 91(2), 327–331.

Richter, C. K., Skulas-Ray, A. C., Champagne, C. M., & Kris-Etherton, P. M. (2015). Plant protein and animal proteins: do they differentially affect cardiovascular disease risk? *Advances in Nutrition*, 6(6), 712–728.

Richter, M., Baerlocher, K., Bauer, J. M., Elmadfa, I., Heseker, H., Leschik-Bonnet, E., Stangl, G., Volkert, D., Stehle, P. (2019). Revised reference values for the intake of protein. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 74(3), 242–250.

Rigamonti, E., Parolini, C., Marchesi, M., Diani, E., Brambilla, S., Sirtori, C. R., & Chiesa, G. (2010). Hypolipidemic effect of dietary pea proteins: Impact on genes regulating hepatic lipid metabolism. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(S1), S24–30.

Rizzello, C. G., Angelis, M. D., Coda, R., & Gobbetti, M. (2006). Use of selected sourdough lactic acid bacteria to hydrolyze wheat and rye proteins responsible for cereal allergy. *European Food Research and Technology*, 223(3), 405–411.

Rodriguez, N. R., DiMarco, N. M., Langley, S. (2009). Position of the American Dietetic Association, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and athletic performance. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(3), 509-527.

Rodriguez, N. R., Vislocky, L. M., & Gaine, P. C. (2007). Dietary protein, endurance exercise, and human skeletal-muscle protein turnover. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 10(1), 40–45.

- Roland, W. S. U., Pouvreau, L., Curran, J., Velde, F. V. D., & Kok, P. M. T. D. (2017). Flavor Aspects of Pulse Ingredients. *Cereal Chemistry Journal*, 94(1), 58–65.
- Roy, F., Boye, J., & Simpson, B. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, 43(2), 432–442.
- Rutherford, S. M., Fanning, A. C., Miller, B. J., & Moughan, P. J. (2015). Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats. *The Journal of Nutrition*, 145(2), 372–379.
- Russo, R., & Reggiani, R. (2015). Evaluation of protein concentration, amino acid profile and antinutritional compounds in hempseed meal from dioecious and monoecious varieties. *American Journal of Plant Sciences*, 6, 14–22.
- Sampalis, J, Psaradellis, E., & Rampakakis, E. (2010). Efficacy of BIO K CL1285® in the reduction of antibiotic-associated diarrhea – a placebo controlled double-blind randomized, multi-center study. *Archives of Medical Science*, 1, 56–64.
- Sanchez-Monge, R., Lopez-Torrejon, G., Pascual, C. Y., Varela, J., Martin-Esteban, M., & Salcedo, G. (2004). Vicilin and convicilin are potential major allergens from pea. *Clinical Experimental Allergy*, 34, 1747-1753.
- Sarwar, G. (1997). The Protein Digestibility–Corrected Amino Acid Score Method Overestimates Quality of Proteins Containing Antinutritional Factors and of Poorly Digestible Proteins Supplemented with Limiting Amino Acids in Rats. *The Journal of Nutrition*, 127(5), 758–764.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287–306.
- Schindler, S., Zelena, K., Krings, U., Bez, J., Eisner, P., Berger, R.G. (2012). Improvement of the Aroma of Pea (*Pisum sativum*) Protein Extracts by Lactic Acid Fermentation. *Food Biotechnology*. 26(1), 58–74.
- Schneider, B. H., & Flatt, W. P. (1975). *The evaluation of feeds through digestibility experiments*. University of Georgia Press.
- Schürch, M.-A., Rizzoli, R., Slosman, D., Vadas, L., & Bonjour, J. P. (1998). Protein supplements increase serum insulin-like growth factor-I levels and attenuate proximal femur bone loss in patients with recent hip fracture. *Annals of Internal Medicine*, 128(10), 801–809.
- Shamsuddin, A. M. (2002). Anti-cancer function of phytic acid. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(7), 769–782.
- Shekib, L. A. (1994). Nutritional improvement of lentils, chick pea, rice and wheat by natural fermentation. *Plant Foods for Human Nutrition*, 46(3), 201–205.
- Shih, F. F. (2003). An update on the processing of high-protein rice products. *Nahrung/Food*, 47(6), 420–424.
- Shih, F. F., & Daigle, K. W. (2000). Preparation and characterization of rice protein isolates. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 77(8), 885–889.

- Short, K. R., Vittone, J. L., Bigelow, M. L., Proctor, D. N., & Nair, K. S. (2004). Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 286(1), E92–101.
- Sinha, R., Cross, A. J., Graubard, B. I., Leitzmann, M. F., & Schatzkin, A. (2009). Meat Intake and Mortality. *Archives of Internal Medicine*, 169(6), 562–571.
- Sinha, R., Peters, U., Cross, A. J., Kulldorff, M., Weissfeld, J. L., Pinsky, P. F., Rothman, N., Hayes, R. B. (2005). Meat, Meat Cooking Methods and Preservation, and Risk for Colorectal Adenoma. *Cancer Research*, 65(17), 8034–8041.
- Sindhu, S. C., & Khetarpaul, N. (2001). Probiotic Fermentation of Indigenous Food Mixture: Effect on Antinutrients and Digestibility of Starch and Protein. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(6), 601–609.
- Singh, B., Bhat, T. K., & Singh, B. (2003). Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19), 5579–5597.
- Singh, U., & Jambunathan, R. (1981). Studies on desi and kabull chickpea (*Cicer arietinum* L.) Cultivars: levels of protease inhibitors, levels of polyphenolic compounds and *in vitro* protein digestibility. *Journal of Food Science*, 46(5), 1364–1367.
- Sorensen, M. D., Kahn, A. J., Reiner, A. P., Tseng, T. Y., Shikany, J. M., Wallace, R. B., Chi, T., Wactawski-Wende, J., Jackson, R. D., O’Sullivan, M. J., Sadetsky, N., Stoller, M. L. (2012). Impact of nutritional factors on incident kidney stone formation: a report from the WHI OS. *Journal of Urology*, 187(5), 1645–1650.
- Sridharan, S., & Das, K. M. S. (2019). A Study on Suitable Non-Dairy Food Matrix for Probiotic Bacteria—A Systematic Review. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 7(1), 05–16.
- Statista. (2018). U.S. functional foods market – Statistics & facts. Statista, Hambourg, Allemagne. <https://www.statista.com/topics/1321/functional-foods-market/> (Consulté le 30 septembre 2019).
- Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., & Nickerson, M. T. (2015). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International*, 76, 31–38.
- Sumner, A. K., Nielsen, M. A., & Youngs, C. G. (1981). Production and Evaluation of Pea Protein Isolate. *Journal of Food Science*, 46(2), 364–366.
- Surdykowski, A. K., Kenny, A. M., Insogna, K. L., & Kerstetter, J. E. (2010). Optimizing bone health in older adults: the importance of dietary protein. *Aging Health*, 6(3), 345–357.
- Swaigood, H. E., & Catignani, G. L. (1991). Protein Digestibility: *In Vitro* Methods of Assessment. *Advances in Food and Nutrition Research*, 185–236.
- Tang, C.-H. (2007). Functional properties and *in vitro* digestibility of buckwheat protein products: Influence of processing. *Journal of Food Engineering*, 82(4), 568–576.

Tang, C.-H., Ten, Z., Wang, X.-S., & Yang, X.-Q. (2006). Physicochemical and Functional Properties of Hemp (*Cannabis sativa* L.) Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8945–8950.

Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1–11.

Tavano, O. L., Neves, V. A., & Júnior, S. I. D. S. (2016). *In vitro* versus *in vivo* protein digestibility techniques for calculating PDCAAS (protein digestibility-corrected amino acid score) applied to chickpea fractions. *Food Research International*, 89, 756–763.

Teh, S.-S., Bekhit, A. E.-D., Carne, A., & Birch, J. (2013). Effect of the defatting process, acid and alkali extraction on the physicochemical and functional properties of hemp, flax and canola seed cake protein isolates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 8(2), 92–104.

Thauer, R. K. (1988). Citric-acid cycle, 50 years on. Modifications and an alternative pathway in anaerobic bacteria. *European Journal of Biochemistry*, 176(3), 497–508.

Thomas, D. T., Erdman, K. A., & Burke, L. M. (2016). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and Athletic Performance. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 116(3), 501–528.

Tieland, M., Dirks, M. L., Zwaluw, N. V. D., Verdijk, L. B., Rest, O. V. D., Groot, L. C. D., & Loon, L. J. V. (2012). Protein supplementation increases muscle mass gain during prolonged resistance-type exercise training in frail elderly people: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of the American Medical Directors Association*, 13(8), 713–719.

Tipton, K., & Wolfe, R. (1998). Exercise-induced changes in protein metabolism. *Acta Physiologica Scandinavica*, 162(3), 377–387.

Tulbek, M., Lam, R., Wang, Y. C., Asavajaru, P., & Lam, A. (2017). Pea. *Sustainable Protein Sources*, 145–164.

Uccello, M., Malaguarnera, G., Basile, F., D'Agata, V., Malaguarnera, M., Bertino, G., Vacante, M., Drago, F., Biondi, A. (2012). Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. *BMC Surgery*, 12(Suppl 1), S35.

Ukena, S. N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A., Rogler, G., Suerbaum, S., Buer, J., Gunzer, F., Westendorf, A. M. (2007). Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Inhibits Leaky Gut by Enhancing Mucosal Integrity. *PLoS ONE*, 2(12), e1308.

United Nations. (2019). World Population Prospects 2019. United Nations, Department of Economic and Social Affairs. <https://population.un.org/wpp> (Consulté le 07 novembre 2019)

Upshaw, A. (2014). Post exercise ingestion of plant VS animal protein enhances exercise performance outcomes similarly. Doctor of Philosophy (PhD) in Kinesiology and Exercise Science (The University of Western Ontario, London).

USDA. (2011). National Nutrient Database for Standard Reference SR28. Vegetables and Vegetable Products. <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/80400535/Data/SR/SR28/reports/sr28fg20.pdf>

- Vara-Ubol, S., Chambers, E., Chambers, D.H. (2004). Sensory characteristics of chemical compounds potentially associated with beany aroma in foods. *Journal of Sensory Studies*, 19(1), 15–26.
- Vliet, S. V., Burd, N. A., & Loon, L. J. V. (2015). The Skeletal Muscle Anabolic Response to Plant-versus Animal-Based Protein Consumption. *The Journal of Nutrition*, 145(9), 1981–1991.
- Wang, Q., & Xiong, Y. L. (2019). Processing, Nutrition, and Functionality of Hempseed Protein: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 936–952.
- Wang, T., Wang, L., Wang, R., & Chen, Z. (2016). Effects of freeze-milling on the physicochemical properties of rice protein isolates. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 832–839.
- Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., Bapat, P., Kwun, I., Shen, C.-L. (2014). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(1), 1–18.
- Wang, X.-S., Tang, C.-H., Yang, X.-Q., & Gao, W.-R. (2008). Characterization, amino acid composition and *in vitro* digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. *Food Chemistry*, 107(1), 11–18.
- Wang, M., Hettiarachchy, N., Qi, M., Burks, W., & Siebenmorgen, T. (1999). Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 411-416.
- Wei, C., Nguyen, S. D., Kim, M. R., & Sok, D.-E. (2007). Rice albumin N-terminal (Asp-His-His-Gln) prevents against copper ion-catalyzed oxidations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2149-2154.
- Wen, S., Zhou, G., Song, S., Xu, X., Voglmeir, J., Liu, L., ... Li, C. (2015). Discrimination of *in vitro* and *in vivo* digestion products of meat proteins from pork, beef, chicken, and fish. *Proteomics*, 15(21), 3688–3698.
- Wildman, R.E.C., and Medeiros, D.M. (2000). Protein. In: *Advanced Human Nutrition*. CRC Press New York, NY. pp. 123-150.
- Wolfe, R. R., Miller, S. L., Miller, K. B. (2008). Optimal protein intake in the elderly. *Clinical Nutrition*, 27(5), 675–684.
- World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1991). Protein quality evaluation: report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, Bethesda, Md., USA, 4-8 December 1989.
- World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2001). Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.
- World Health Organization. (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. Geneva: WHO Press.
- Wu, G., & Meininger, C. J. (2002). Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annual Review of Nutrition*, 22, 61–86.

Yan, F., & Polk, D. (2011). Probiotics and immune health. *Current Opinion in Gastroenterology*, 27(6), 496–501.

Yang, L., & Kadowaki, M. (2009). Effects of Rice Proteins from Two Cultivars, Koshihikari and Shunyo, on Hepatic Cholesterol Secretion by Isolated Perfused Livers of Rats Fed Cholesterol-Enriched Diets. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 54(4), 283–290.

Zanoni, C., Aiello, G., Arnoldi, A., & Lammi, C. (2017). Hempseed peptides exert hypocholesterolemic effects with a statin-like mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 8829–8838.

Zentner, R., Lafond, G., Derksen, D., Nagy, C., Wall, D., & May, W. (2004). Effects of tillage method and crop rotation on non-renewable energy use efficiency for a thin Black Chernozem in the Canadian Prairies. *Soil and Tillage Research*, 77(2), 125–136.

Zhai, C., Lu, C., Zhang, X., Sun, G., & Lorenz, K. (2001). Comparative Study on Nutritional Value of Chinese and North American Wild Rice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(4), 371–382.

CHAPITRE 2: SÉLECTION DES BOISSONS FERMENTÉES ENRICHIES EN PROTÉINES VÉGÉTALES

Différentes sources de protéines ont été mélangées et ajoutées à une boisson végétale à base de riz brun, fermentée, fournie par la société Bio-K+ International. Les sources de protéines ont été choisies en accord avec la société et sont le pois jaune, le riz brun et le chanvre. Les différents mélanges de protéines ont été sélectionnés en fonction de leurs indices chimiques, de la quantité de protéines ajoutées, de la faisabilité, du goût, et du Coefficient d'Efficacité Protéique (CEP) théorique.

1. Contenu en protéines et en acides aminés

Les pourcentages de protéines dans l'isolat de riz brun, de chanvre et de pois sont présentés dans le **Tableau 1**. Les trois sources de protéines ont des pourcentages élevés avec 80% de protéines pour le riz et le pois et 90% pour le chanvre.

Tableau 1. Teneur en protéines des différentes sources de protéines.

Type de protéine	Teneur en protéines (%)
Riz	80
Chanvre	90
Pois	80

Les acides aminés essentiels (AAE) ne sont pas synthétisés par le corps humain et doivent donc être apportés par l'alimentation. La FAO et l'OMS ont déterminé les besoins nécessaires en AAE pour avoir une protéine complète. La composition en AAE a été communiquée par le fournisseur des protéines. La composition en AAE de chaque produit, exprimée en g / 100 g de protéines, est indiquée dans le **Tableau 2**, ainsi que dans celle de la protéine de référence de la FAO et de l'OMS (2007). On observe que le riz et le chanvre sont faibles en lysine, alors que le pois est pauvre en méthionine. En général, les légumineuses sont déficientes en méthionine alors que les céréales le sont en lysine. Un mélange des deux peut donc aider à équilibrer ces valeurs (Khaldi *et al.*, 2014). Tous les autres acides aminés sont en quantité suffisante. Le total des acides aminés essentiels de chaque source de protéines est sensiblement le même (entre 44 et 45 g / 100 g de protéines) et il est bien supérieur à celui du profil protéique de référence (27,7 g / 100 g de protéines).

Tableau 2. Composition en acides aminés essentiels des différentes sources de protéines.

Acides aminés (g/100 g protéines)	Riz	Chanvre	Pois	Référence FAO/OMS ¹
His	2,13	2,61	2,56	1,5
Ile	4,23	4,44	4,87	3
Leu	7,75	7,53	8,59	5,9
Lys	2,65	4,05	7,44	4,5
Met	2,85	2,07	0,95	1,6
Cys	2,04	2,51	1,67	0,6
AAS (Met et Cys)	4,89	4,58	2,62	2,2
AAA (Phe et Tyr)	12,90	8,71	9,1	3,8
Thr	3,50	3,6	3,59	2,3
Trp	1,40	3,76	0,79	0,6
Val	5,59	5,16	5,13	3,9
Total AAE	45,04	44,44	44,69	27,7

AAS : Acides aminés soufrés. AAA : Acides aminés aromatiques. AAE : Acides aminés essentiels. ¹ : Recommandations de la FAO/OMS en g/100g de protéines pour un adulte pour une protéine idéale.

2. Indice chimique

Les indices chimiques sont définis pour chaque AAE comme étant le rapport entre sa teneur dans les différentes sources de protéines et celle dans la protéine de référence (FAO, 2007). S'il est inférieur à 1, cela signifie que l'acide aminé correspondant est présent en une quantité inférieure aux recommandations pour l'Homme. Le riz et le chanvre étant déficitaires en lysine, indices chimiques sont inférieurs à 1 et il est inférieur à 1 pour la méthionine pour le pois (**Tableau 3**). Tous les autres acides aminés ont des indices supérieurs à 1.

Tableau 3. Indices chimiques des différentes sources de protéines.

Acides aminés	Riz	Chanvre	Pois
	Indice chimique		
His	1,42	1,74	1,71
Ileu	1,41	1,48	1,62
Leu	1,31	1,28	1,46
Lys	0,59	0,90	1,65
Met	1,78	1,29	0,59
Cys	3,40	4,18	2,78
AAS (Met et Cys)	2,22	2,08	1,19
AAA (Phe et Tyr)	3,39	2,29	2,39
Thr	1,52	1,57	1,56
Trp	2,33	6,27	1,32
Val	1,43	1,32	1,32

AAS : Acides aminés soufrés. AAA : Acides aminés aromatiques.

3. Composition des mélanges de protéines

Afin d'obtenir un indice chimique supérieur à 1 dans la boisson, des mélanges des différentes sources de protéines ont été choisis en fonction de cet indice. Le pois peut être associé au riz et au chanvre, car ils se complètent au niveau du contenu en lysine et en méthionine. Mais si le riz et le chanvre sont associés, il y aura une déficience en lysine dans la boisson. Ainsi, afin que les contenus en AAE se complètent, les mélanges de protéines pois/riz et pois/chanvre ont été préférés.

Les indices chimiques des mélanges de protéines de pois et de riz sont présentés dans le **Tableau 4**. Le mélange contenant 30% de concentré de protéines de pois et 70% de poudre de riz brun (PR1) présente son indice le plus faible pour la lysine avec une valeur de 0,91. Le mélange PR5, contenant plus de pois que de riz, voit donc son indice être de 0,95 pour la méthionine. Par conséquent, le mélange retenu est PR3, car c'est celui qui a les indices chimiques les plus élevés.

Tableau 4. Indices chimiques de mélanges de protéines de pois et de riz.

	PR1	PR2	PR3	PR4	PR5
	Pois 30% Riz 70%	Pois 40% Riz 60%	Pois 50% Riz 50%	Pois 60% Riz 40%	Pois 70% Riz 30%
Acides aminés	Indices chimiques				
His	1,50	1,53	1,56	1,59	1,62
Ileu	1,47	1,49	1,52	1,54	1,56
Leu	1,36	1,37	1,38	1,40	1,41
Lys	0,91	1,01	1,12	1,23	1,33
Met	1,43	1,31	1,19	1,07	0,95
Cys	3,21	3,15	3,09	3,03	2,97
AAS (Met et Cys)	1,91	1,81	1,71	1,60	1,50
AAA (Phe et Tyr)	3,09	2,99	2,89	2,79	2,69
Thr	1,53	1,54	1,54	1,55	1,55
Trp	2,03	1,93	1,83	1,72	1,62
Val	1,40	1,39	1,37	1,36	1,35
% protéines	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00

AAS : Acides aminés soufrés. AAA : Acides aminés aromatiques. PR : Mélange de protéines de pois et de riz.

Le pois et le chanvre ont également été associés pour compléter leur manque respectif en méthionine et en lysine. Le mélange PH1 (30% de pois, 70% de chanvre) est celui qui a les meilleurs indices chimiques et également le pourcentage le plus élevé en protéines (87%) (**Tableau 5**). C'est donc ce mélange qui a été sélectionné.

Tableau 5. Indices chimiques de mélanges de protéines de pois et de chanvre.

	PH1	PH2	PH3	PH4	PH5
	Pois 30% Chanvre 70%	Pois 40% Chanvre 60%	Pois 50% Chanvre 50%	Pois 60% Chanvre 40%	Pois 70% Chanvre 30%
Acides aminés	Indices chimiques				
His	1,73	1,73	1,72	1,72	1,72
Ileu	1,52	1,54	1,55	1,57	1,58
Leu	1,33	1,35	1,37	1,38	1,40
Lys	1,13	1,20	1,28	1,35	1,43
Met	1,08	1,01	0,94	0,87	0,80
Cys	3,76	3,62	3,48	3,34	3,20
AAS (Met et Cys)	1,81	1,73	1,64	1,55	1,46

AAA (Phe et Tyr)	2,32	2,33	2,34	2,35	2,36
Thr	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56
Trp	4,78	4,29	3,79	3,30	2,80
Val	1,32	1,32	1,32	1,32	1,32
% protéines	87,00	86,00	85,00	84,00	83,00

AAS : Acides aminés soufrés. AAA : Acides aminés aromatiques. PH : Mélange de protéines de pois et de chanvre.

4. Estimation des Coefficients d'Efficacité Protéique

Il existe des allégations nutritionnelles déterminées par Santé Canada pour un aliment enrichi en protéines. Une allégation nutritionnelle « source de protéines » signifie que l'aliment fournit une quantité significative de protéines, tandis que « excellente source de protéines / riche en protéines » signifie que l'aliment fournit une très grande quantité de ce nutriment (Agence Canadienne d'inspection des aliments, 2019). Ces allégations sont déterminées selon la valeur de la cote protéique du produit. Celle-ci est définie par la teneur en protéines par ration quotidienne normale du produit, multipliée par le coefficient d'efficacité protéique (CEP). La ration quotidienne normale correspond à une portion moyenne de l'aliment consommé par jour. Le CEP est déterminé en faisant une analyse *in vivo* du produit et il est calculé comme le rapport entre le gain de poids moyen de l'animal (généralement des rats) et la quantité de protéines ingérées (Health Protection Branch, 1981). Si la cote protéique est supérieure à 20, le produit peut prétendre à l'allégation « source de protéines », si elle est supérieure à 40, il peut prétendre à « excellente source de protéines ».

Certains CEP d'aliments sont communiqués par l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (2018). Seulement, énormément de produits n'y figurent pas. De plus, les CEP diffèrent selon les espèces de légumes, céréales, étudiées, la manière dont les protéines ont été extraites, etc. Le CEP théorique du pois est de 1,2, il est de 1,5 pour le riz et de 1,65 pour le chanvre (Agence Canadienne d'Inspection des Aliments, 2018; House *et al.*, 2010). La protéine de référence est la caséine, une protéine du lait. Elle a un CEP de 2,5. Les aliments ayant un CEP supérieur à celui de la caséine sont considérés comme étant de très bonnes sources de protéines.

Afin d'avoir une idée sur les CEP des mélanges de protéines PR et PH, les CEP théoriques ont été estimés selon les valeurs de CEP de la littérature et le pourcentage de protéines ajoutées selon le calcul suivant :

$$CEP = (\% \text{ source de protéine 1} \times CEP \text{ protéine 1}) + (\% \text{ source de protéine 2} \times CEP \text{ protéine 2})$$

Les CEP estimés des deux mélanges de protéines Pois/Riz et Pois/Chanvre sont présentés dans le **Tableau 6**. Les deux mélanges ont des CEP assez faibles, de 1,35 pour le mélange PR et de 1,52 pour le mélange PH. Ces CEP estimés doivent être vérifiés par une étude *in vivo* pour déterminer les CEP réels des mélanges de protéines.

La cote protéique a également pu être estimée en multipliant la quantité de protéines estimée dans la boisson (ce qui correspond à la ration quotidienne) par le CEP estimé. On obtient des cotes inférieures à 20, ce qui voudrait signifier que la boisson ne peut prétendre à une allégation protéique. Encore une fois, les expériences *in vivo* vont permettre d'obtenir des résultats réels.

Tableau 6. CEP estimé des mélanges de protéines.

Mélange	Sources de protéines ajoutées (%)		Quantité de protéines estimée (%)	CEP estimé	Cote protéique estimée
PR3	Pois	50	14,0	1,35	18,9
	Riz	50			
PH1	Pois	30	11,9	1,52	18,1
	Chanvre	70			

5. Conclusion

Les mélanges de protéines à ajouter à la boisson végétale Bio-K+^{MD} à base de riz ont été sélectionnés selon leurs quantités de protéines et leurs indices chimiques afin d'avoir un indice supérieur à 1 et ainsi satisfaire les exigences de la FAO. Les prototypes retenus sont les suivants :

- PR : 50% de pois et 50% de riz,
- PH : 30% de pois et 70% de chanvre.

Références

Agence Canadienne d'Inspection des Aliments. (2018). Éléments du tableau de la valeur nutritive. ACIA, gouvernement du Canada. <https://www.inspection.gc.ca/aliments/exigences-et-directives/etiquetage/industrie/etiquetage-nutritionnel/elements-du-tableau-de-la-valeur-nutritive/fra/1389206763218/1389206811747?chap=7> (Consulté le 07 octobre 2019).

Agence Canadienne d'Inspection des Aliments. (2019). Exigences particulières concernant les allégations relatives à la teneur nutritive - Allégations relatives aux protéines. ACIA, gouvernement du Canada. <https://www.inspection.gc.ca/exigences-en-matiere-d-etiquetage-des-aliments/etiquetage/industrie/teneur-nutritive/exigences-particulieres-concernant-les-allegations/fra/1389907770176/1389907817577?chap=3> (Consulté le 05 février 2020).

FAO. (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. Report of a joint WHO/FAO/UNU expert consultation. Geneva, Switzerland. (WHO technical report series, No. 935).

Health Protection Branch. (1981). Determination of protein rating, Official method. Ottawa, Health Canada, Health protection branch, FO-1.

House, J. D., Neufeld, J., & Leson, G. (2010). Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa L.*) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11801–11807.

Khaldi, N., Holton, T. A., Shields, D. C. (2014). Amino acid enrichment and compositional changes among mammalian milk proteins and the resulting nutritional consequences. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1248-1258.

Lien entre les chapitres 2 et 3

Dans le but de développer une boisson probiotique enrichie en protéines et ayant une bonne valeur nutritive, il était nécessaire de fabriquer plusieurs boissons pour ensuite sélectionner la meilleure d'entre elles. Ainsi, le chapitre 2 « Sélection des boissons fermentées enrichies en protéines végétales » explique le processus de sélection des boissons en fonction des indices chimiques, de la quantité de protéines qu'il est possible d'ajouter à la boisson, et du CEP estimé. Deux boissons ont été sélectionnées sur ces bases, une boisson enrichie en protéines de pois et de riz (PR) et une autre boisson enrichie en protéines de pois et de chanvre (PH).

Le chapitre 3 présente les résultats des analyses physico-chimiques et la détermination de la digestibilité *in vitro* de ces deux boissons et de leurs équivalents non fermentés et non enrichis en protéines afin d'évaluer l'effet de la fermentation et de l'enrichissement notamment sur la digestibilité protéique et sur le profil peptidique.

CHAPITRE 3: *IN VITRO* PROTEIN DIGESTIBILITY AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA FERMENTED BEVERAGES ENRICHED WITH PLANT PROTEINS

Johanne Manus¹, Mathieu Millette², Blanca R. Aguilar Uscanga³, Stéphane Salmieri¹, Behnoush Maherani¹, Monique Lacroix^{1*}.

Digestibilité protéique *in vitro* et propriétés physico-chimiques de boissons fermentées à base de bactéries lactiques, enrichies en protéines végétales.

L'article a été soumis au « Journal of Food Composition and Analysis » le 08 mai 2020 et a été rejeté le 24 mai 2020. Il a été modifié en prenant en compte les remarques reçues et a été soumis au « Journal of Food Science » le 28 mai 2020.

Contributions des auteurs

Johanne Manus a réalisé les manipulations et la rédaction de l'article.

Mathieu Millette a participé à la validation de la méthodologie, il a supervisé et fourni du matériel. Il a également participé à la correction de l'article.

Blanca Rosa Aguilar Uscanga a supervisé la recherche et a participé à la correction de l'article.

Stéphane Salmieri a apporté son aide tout au long de la recherche ainsi que pour les analyses statistiques.

Behnoush Maherani a aidé à la rédaction et la recherche de protocole ainsi qu'à la correction de l'article.

Monique Lacroix a été la directrice de recherche et la coordinatrice de ce projet de recherche. Elle a participé à la planification des expériences et à la correction de l'article.

Résumé

L'objectif de cette étude était de développer des boissons probiotiques, enrichies en protéines végétales, à haute valeur nutritionnelle. Une boisson à base de riz fermentée avec une formulation probiotique spécifique comprenant *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 a été enrichie avec une combinaison de protéines de pois et de riz (PR) ou de protéines de pois et de chanvre (PH) à 13% et 11% de protéines totales respectivement. Ces associations de protéines ont été sélectionnées car leurs indices chimiques étaient supérieurs à 1, comme recommandé par la FAO. Les boissons enrichies en protéines avaient une viscosité 10 fois supérieure grâce à l'enrichissement, tandis que la fermentation a réduit la viscosité de 50% pour PR et de 20% pour PH. Les résultats de la digestibilité protéique *in vitro* ont montré que l'enrichissement en protéines ainsi que la fermentation augmentaient significativement les valeurs de digestibilité avec une valeur de 72.7% pour la boisson fermentée PR et 61.4% pour la boisson contrôle fermentée non-enrichie ($p \leq 0,05$). Les profils peptidiques des boissons enrichies en PR et PH indiquent que la fermentation a entraîné une réduction d'environ 60% des peptides de haut poids moléculaire et une augmentation de plus de 50% des peptides de bas poids moléculaire. Par conséquent, la fermentation et l'enrichissement en protéines ont tous deux augmenté la valeur nutritionnelle des boissons à base de riz.

Mots-clés

Digestibilité protéique *in vitro*, protéines végétales, fermentation, probiotique, *Lactobacillus*.

***In vitro* protein digestibility and physico-chemical properties of lactic acid bacteria fermented beverages enriched with plant proteins**

Johanne Manus¹, Mathieu Millette², Blanca R. Aguilar Uscanga³, Stéphane Salmieri¹, Behnoush Maherani¹, Monique Lacroix^{1*}.

¹ Research Laboratories in Sciences Applied to Food, Canadian Irradiation Center, INRS-Institut Armand-Frappier, Institute of Nutraceutical and Functional Foods, 531 des Prairies blvd, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada.

² Bio-K Plus, a division of Kerry Group, 495 Armand-Frappier blvd, Laval, Québec, H7V 4B3, Canada.

³ Research Laboratory of Industrial Microbiology. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara. 1421, Blvd. Marcelino Garcia Barragan. Col. Olímpica, 44430. Guadalajara, Jalisco, Mexico.

* Corresponding author. Dr. Monique Lacroix, Email: Monique.Lacroix@inrs.ca.

Tel: 450-687-5010 # 4489, Fax: 450-686-5501.

Abstract

The objective of this study was to develop probiotic beverages, enriched with plant proteins, with high nutritional value. A rice-based beverage fermented with a specific probiotic formulation comprised *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 has been enriched with a combination of pea and rice proteins (PR) or pea and hemp proteins (PH) at 13% and 11% total protein respectively. These protein associations have been selected because their amino acid ratios were >1, as recommended by the FAO. The beverage enriched with protein significantly increased its viscosity by more than 10 times thanks to the enrichment, while the fermentation reduced it by 50% for PR and 20% for PH. *In vitro* protein digestibility results showed that the protein enrichment and the fermentation treatment significantly increased digestibility values of the beverages with value of 72.7% for fermented PR beverage and 61.4% for unenriched fermented control beverage ($p \leq 0.05$). Peptide profiles of PR and PH enriched beverages indicated that the fermentation led to a reduced level of high molecular weight (HMW) peptides of about 60% and an increase of low molecular weight (LMW) peptides by over 50%. Therefore, both the fermentation and the enrichment in protein increased the nutritional value of the rice-based beverages.

Keywords

In vitro protein digestibility, plant protein, fermentation, probiotics, *Lactobacillus*.

1. Introduction

Consumers are showing increasing interest in natural foods with general health benefits. The functional foods market is highly expanding (Statista, 2018). Among them, probiotics and protein-enriched foods are very popular. Probiotics are defined as “live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” (Hill *et al.*, 2014). The most commonly used genera of bacteria showing beneficial properties are *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. (Holzapfel *et al.*, 2001). Most of the time, probiotic products are delivered through dairy products such as yogurt, but because of lactose intolerance, or by conviction, an increasing number of people turn towards plant alternatives. Another trend widely observed is consumption of protein-enriched foods, especially for nutritional purposes. Protein-enriched products are mainly popular within active individuals, people dieting and can be an interesting source of protein for elderly people. The majority of protein-enriched products contains whey, a dairy by-product, but various plant proteins like soy, pea or hemp are more and more adopted as whey replacements. With the world population increasing, global warming, the lack of arable lands, more and more people are beginning to modify their dietary habits. Plant proteins can be an alternative to animal production because they need fewer farming resources and generate lower amounts of greenhouse gases (Clark & Tilman, 2017).

The concern is that plant proteins are often limited in essential amino acids (EAA), and are therefore called "incomplete". In general, legumes are methionine deficient while cereals are lysine deficient. Because of this lack of EAA, and the presence of antinutritional factors, plant proteins are considered of lower quality and have, most of the time, a lower digestibility compared to animal proteins (Yun *et al.*, 2005; Sarwar Gilani *et al.*, 2012; Tomé, 2013). By combining cereals and legumes, global quality of protein is improved and intake of EAA can be complete (Khaldi *et al.*, 2014), as recommended by the FAO and WHO (2007). The quality of a protein is defined by several factors like its content of EAA, its digestibility and its bioavailability. Transformation processes, like germination, fermentation, irradiation, drying, have a considerable effect on plant proteins by modifying their structures, making them more accessible to enzymes, increasing their nutritional qualities and their digestibility (Ghavidel & Prakash, 2007; Osman *et al.*, 2012; Kalpanadevi *et al.*, 2013). It has been demonstrated that some *Lactobacillus* spp. have proteolytic activity and can therefore hydrolyze proteins into smaller peptides (Kiers *et al.*, 2000; Raveschot *et al.*, 2018) which are better absorbed compared to native protein (Grimble, 1994).

A few studies have looked at the proteolytic activity of lactic acid bacteria (LAB) and its consequences on the digestibility were mainly focused on milk and soy (Matar *et al.*, 1996; Kiers *et al.*, 2000; Amadou *et al.*, 2011; Vithana *et al.*, 2011; Aguirre *et al.*, 2014), our current knowledge of this subject of pea, rice and hemp is very scarce.

The probiotic association *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 has demonstrated a high degree of gastrointestinal survival (Millette *et al.*, 2008; Millette *et al.*, 2013) and multiple health benefits. Indeed, it has been proven it can prevent and reduce the incidence of antibiotic-associated diarrhea (Beausoleil *et al.*, 2007), and *Clostridioides difficile* associated diarrhea (McFarland *et al.*, 2018), reduce symptoms of irritable bowel syndrome (Preston *et al.*, 2018) and it also has anticancer properties (Baldwin *et al.*, 2010; Desrouillères *et al.*, 2015). The protein enrichment of products containing this combination of probiotics has never been studied.

The objective of this study was to develop functional beverages rich in probiotics and in protein. The commercial probiotic beverage containing an association of *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 was used with specific protein combinations (brown rice, hemp and peas) in order to obtain beverages with complete EAA, according to FAO specifications (FAO, 2007). Subsequently, the effect of the lactic acid fermentation on the hydrolysis of pea, rice and hemp proteins was evaluated by analyzing, before and after the fermentation, the peptide profiles and the *in vitro* protein digestibility of the developed beverages, which were also compared to non protein-enriched beverages.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Commercial probiotic (Bio-K+ Blueberry) beverage, Bio-K+ ferment (composed of *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2), organic pea protein concentrate containing 80% protein (Fying, Riverside, CA, USA), organic brown rice protein containing 80% protein (Fying) and organic hemp protein powder containing 90% protein (Fying) were kindly supplied by Bio-K Plus, a division of Kerry Group (Laval, Québec, Canada). Pepsin (≥ 250 units/mg solid, 41.9% purity) and trypsin (1500 units/mg solid, 20.1% purity) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

2.2. Amino acid composition

The amino acid composition was given by the supplier of the protein supplements (**Table 1**). According to the FAO (2007), the amino acid score (AAS) determines the effectiveness with which absorbed dietary nitrogen can meet the essential amino acids (EAA) requirements as the safe level of protein intake. The AAS was calculated as the quantity of each EAA divided by its reference value given by the FAO (2007), which corresponds to the EAA daily requirements for an adult in mg/g protein. When the AAS is inferior to 1, the corresponding EAA is considered as limiting and thus the protein does not provide enough of this EAA. In order to have AAS > 1, combinations of different proteins (pea, rice and hemp) were made to compensate for the limiting amino acid of certain proteins and to have a complete source of protein to be incorporated in beverages.

2.3. Preparation of the beverages

All the ingredients in powder form of Bio-K+ Blueberry, plus a 50/50 blend of pea and brown rice protein concentrates (PR), or a 30/70 blend of pea and hemp protein (PH), were weighed and hydrated with filtered water to obtain the enriched beverages. A control non-enriched beverage was also prepared. The beverages were then pasteurized at 90 ± 2 °C for 60 sec, packaged in 98 g plastic bottles, aluminium-sealed, and then cooled to 37 °C. Beverages were then inoculated with Bio-K+™ ferment at 10^8 CFU/mL, incubated at 37 ± 1 °C for 14 ± 2 h, and cooled to 4 °C. In order to analyze the effect of the fermentation, fermented and non-fermented beverages were prepared.

2.4. Product characterization

Total protein content of the beverages was determined using Kjeldahl method ($N \times 6.25$) according to AOAC Official Method 991.20 (2000). Total solid content was determined according to AOAC Official Method 985.26 (2000) by drying the samples overnight at 105 °C in an oven (Isotemp 500 Series, Fisher Scientific, NH, USA). The pH of samples was measured with a pH meter. The titratable acidity (TA), expressed as % lactic acid, was determined by the titration method with 0.1 N NaOH solution, according to AOAC Official Method 942.15 (2000). Viscosity was evaluated with a Brookfield DV-II viscometer (Brookfield Engineering, MA, USA). Due to the large variation of viscosity between beverages, measures of viscosity were made at 4 °C at 100 rpm with spindle 00 for non-enriched drinks and at 20 rpm with spindle 02 for protein-enriched drinks.

2.5. Microbial analysis

Total viable count of *Lactobacillus* spp. was determined by spread plate method on MRS agar. The plates were incubated at 37 °C for 48 h. Analyzes were done on fermented control, PR and PH beverages.

2.6. Determination of peptides molecular weight distribution by Size Exclusion-High Performance Liquid Chromatography (SEC-HPLC)

Molecular weight distribution of soluble fractions of fermented and non-fermented beverages were analyzed by size exclusion HPLC. A Biosep-SEC 2000 column (300 × 7.8 mm, 5 mm particle size, pore size 145 Å) from Phenomenex (Torrance, CA, USA) connected to an Agilent 1260 HPLC Infinity system (Agilent Technologies, Saint-Laurent, QC, Canada) was used. Samples were initially centrifuged at 10,000 × *g* for 20 min. Then, a 0.2 µm filtered sample of 10 µL was injected on the column, and eluted using 100 mM of sodium phosphate buffer solution (pH 6.8) at a flow rate of 1 mL/min for 20 min. Detection was then performed using a diode array detector which measured absorbance at 280 nm. Bovine thyroglobulin (670 kDa), IgA (300 kDa), IgG (150 kDa), ovalbumin (44 kDa), myoglobin (17 kDa) and uridine (244.2 Da) were used as standards. The total surface area of chromatograms of peptide profiles was integrated and separated into three ranges of molecular weight (>2,700 Da; 200-2,700 Da; <200 Da), expressed as a percentage of the total area. Analysis of peptide profiles was executed on fermented and non-fermented control, PR and PH beverages before and during *in vitro* digestion.

2.7. *In vitro* digestion procedure

The *in vitro* protein digestibility (IVPD) of the fermented probiotic beverages were evaluated using the pepsin and trypsin sequential digestion model according to the method of Wang *et al.* (2008) with minor modifications. Briefly, 0.5 g of protein material, from beverages, was suspended in 9.5 mL of 0.1 M HCl. Then 0.5 mL of pepsin solution (20 mg/mL diluted in 0.1 M HCl) was added. The ratio of enzyme to protein substrate was 1:50, w/w. The mixture of protein solution and pepsin was incubated at 37 °C for 120 min, under agitation at 100 rpm. After which, the pepsin-digested hydrolysate was adjusted to pH 8 with 1.0 M NaOH, followed by addition of 10 mg of trypsin (the enzyme to initial protein ration was 1:50, w/w). This mixture was then incubated at 37 °C for another 120 min, under agitation at 100 rpm. Samples of 1 mL were taken at various digestion times, and heated at 95 °C for 5 min to inactivate the enzymes, and then centrifuged at 10,000 × *g* for 20 min. Supernatants were filtered through 0.2 µm filters and then analyzed by SEC-HPLC

on a Biosep-SEC 2000 column for molecular weight distribution determination of the soluble protein hydrolysates.

2.8. Determination of soluble nitrogen release

The soluble nitrogen released during the digestion process was evaluated on the supernatant after precipitation with trichloroacetic acid (TCA) as described by Ali *et al.* (2007) with some modifications. A 6 mL quantity of the digestive sample was mixed with the same volume of 20% (w/w) TCA, for a final concentration of 10% TCA, and then centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min. The nitrogen content of the supernatant was determined by Kjeldahl method ($N \times 6.25$) according to AOAC Official Method 991.20 (2000). The percentage of nitrogen released was calculated as follows:

$$\% \text{ N release} = \frac{\text{Nitrogen in the supernatant}}{\text{Nitrogen in the sample}} \times 100$$

2.9. Statistical analysis

The experiment was done in triplicate and for each replicate, three samples were analyzed. The data were reported as mean \pm standard deviation. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) by SPSS 22.0 software (IBM, NY, USA). Differences among means values were examined by the Duncan's multiple comparison test at a $p \leq 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Amino acid score

The amino acid score (AAS) value depends on the amino acid composition and the reference protein (FAO, 2007). If the quantity of amino acids in the product is greater than the quantity given by the reference, the AAS will be superior to 1 and the protein in the product is considered complete. The objective was to determine the quantity of each plant protein added in order to obtain an AAS value > 1 . Lysine is limited in rice and in hemp, showing a respective AAS value of 0.6 and 0.9 (**Table 1**). Methionine is limiting in pea, as normally observed for legumes, and showed an AAS value of 0.6. The control beverage, with only rice as a source of protein, showed an AAS of 0.59 due to the deficiency in lysine in rice. By combining pea:rice (proportion of 50/50) and pea:hemp (proportion of 30/70), the AAS values were respectively 1.12 and 1.08, thus the added

proteins complemented each other and resulted in a complete combination. Based on these results, these beverages PR (pea:rice) and PH (pea:hemp) at these proportions were selected for this study.

Table 1–Amino acid score of rice, hemp and pea proteins and control, PR and PH beverages.

Amino acid	Protein source			Beverage		
	Rice	Hemp	Pea	Control	PR	PH
His	1.42	1.74	1.71	1.42	1.56	1.73
Ileu	1.41	1.48	1.62	1.41	1.52	1.52
Leu	1.31	1.28	1.46	1.31	1.38	1.33
Lys	0.59	0.9	1.65	0.59	1.12	1.13
Met	1.78	1.29	0.59	1.78	1.19	1.08
Cys	3.4	4.18	2.78	3.4	3.09	3.76
Cys + Met	2.22	2.08	1.19	2.22	1.71	1.81
Phe + Tyr	3.39	2.29	2.39	3.39	2.89	2.32
Thr	1.52	1.57	1.56	1.52	1.54	1.56
Trp	2.33	6.27	1.32	2.33	1.83	4.78
Val	1.43	1.32	1.32	1.43	1.37	1.32

Control: rice beverage non-enriched in protein. PR: rice beverage enriched in pea:rice proteins. PH: rice beverage enriched in pea:hemp proteins.

3.2. Product characterization

Addition of protein significantly increased ($p \leq 0.05$) the level of protein from 3% in the control beverages (C) to 11.2 and 13% for PH and PR beverages respectively (**Table 2**). For all beverages, the fermentation with the Bio-K+ ferment had no effect on the total protein content ($p > 0.05$). Protein enrichment also increased the level of total solid content. PR contained the highest percentage of solids with about 26% when compared to 16 and 23% for the control and PH respectively.

The fermentation resulted in a decreased pH. The PR beverage showed the highest pH value after fermentation, passing from 6.2 to 4.9, as compared to the control and PH beverages, passing respectively from 6.2 to 4.2 and from 6.3 to 4.4 after the fermentation. Fermentation with the Bio-K+ ferment and enrichment in plant proteins has led to an increase in titratable acidity (TA) (**Table 2**). The fermented PH beverage showed the highest TA, with 1.18%, as compared to 0.37 and 0.73% for CF and PRF, respectively. The TA of non-fermented enriched samples (PRNF and PHNF) were significantly higher ($p \leq 0.05$) than the non-fermented non-enriched control beverage

(CNF), showing respective values of 0.25, 0.31 and 0.10% for PRNF, PHNF and CNF. The pH and the TA are both involved in the measurement of the acidity but they are not always related. Indeed, two products can have the same pH and different TA values (Wang *et al.*, 2009), and the opposite is also possible (Nnam & Obiakor, 2003). This can be explained by the fact that TA value corresponds to the total quantity of acids present in the food whereas the pH is correlated with the dissociation capacity of these acids (Tyl & Sadler, 2017). The higher TA value of PRF and PHF beverages indicated their increased concentration of lactic acid when compared to the CF beverage and the higher pH indicated a lower capacity of dissociation of acids and buffering activity by resisting the decrease of pH while the quantity of lactic acid was rising. An increase in protein content in fermented beverages tends to increase acid production and buffering activity. Pereira *et al.* (2015) observed a TA of 7.7% for a probiotic drink containing whey protein and a TA of 3% for the same drink without whey protein, with pH values of 4.2 and 4.4 respectively. Similarly, Zare *et al.* (2012b) observed that adding 2% pea protein to a probiotic milk increased the buffering activity by 13%.

Table 2–Total protein content (TPC), total solid content (TSC), pH, titratable acidity (TA), viscosity and total viable count (TVC) of plant beverages.

Sample	TPC (%)	TSC (%)	pH	TA (%)	Viscosity (cP)	TVC (log CFU/mL)
CNF	3.1 ± 0.3 ^a	16.7 ± 0.7 ^b	6.2 ± 0.0 ^d	0.10 ± 0.0 ^a	4.0 ± 0.2 ^a	ND
CF	3.0 ± 0.1 ^a	15.5 ± 0.1 ^a	4.2 ± 0.0 ^a	0.37 ± 0.0 ^d	3.8 ± 0.1 ^a	9.0 ± 0.0 ^a
PRNF	13.0 ± 0.3 ^c	26.0 ± 0.7 ^d	6.2 ± 0.0 ^d	0.25 ± 0.0 ^b	83.7 ± 1.6 ^e	ND
PRF	13.0 ± 0.3 ^c	26.7 ± 0.2 ^d	4.9 ± 0.0 ^c	0.73 ± 0.0 ^e	39.1 ± 2.1 ^b	9.5 ± 0.0 ^b
PHNF	11.2 ± 0.2 ^b	23.4 ± 0.7 ^c	6.3 ± 0.0 ^d	0.31 ± 0.0 ^c	69.8 ± 3.0 ^d	ND
PHF	11.2 ± 0.3 ^b	23.5 ± 0.8 ^c	4.4 ± 0.0 ^b	1.18 ± 0.0 ^f	54.0 ± 0.2 ^c	9.5 ± 0.0 ^b

C: control beverage non-enriched in protein. **PR:** beverage enriched in pea:rice protein. **PH:** beverage enriched in pea:hemp protein. **NF:** non-fermented. **F:** fermented. Means with different uppercase letters within the same column are significantly different ($P \leq 0.05$). **ND:** not determined.

The viscosity depends on total solid content as well as type of protein and protein content (Oliveira *et al.*, 2001). Indeed, the enrichment with protein significantly increased ($p \leq 0.05$) the viscosity of the beverages while fermentation decreased it (**Table 2**). The apparent viscosity of the control beverages showed a value of 4.0 cP for the non-fermented (CNF) and 3.8 cP for the fermented one (CF). Nevertheless, despite the fact that PRNF and PRF had the same solids content, the apparent viscosity of PRF showed a value of 39.1 cP while the PRNF showed a significantly higher

value of 83.7 cP ($p \leq 0.05$). In the same way, the viscosity of PHNF was higher than the one of PHF, with respectively 69.8 cP and 54 cP ($p \leq 0.05$). These results are similar to those found by Magala *et al.* (2015) who observed a decrease of the viscosity of a rice beverage after fermentation by LAB. This can be explained by protein hydrolysis by LAB, leading to more soluble proteins. The difference in viscosity of PRNF (83.7 cP) compared to the viscosity of PHNF (69.8 cP) is proportional to the difference in their total protein content, with PHNF having a 15% lower viscosity and protein content than PRNF. Furthermore, fermentation had a greater impact on the viscosity of the PR beverage than on that of PH beverage, resulting in a reduction of 50% and 20% respectively. These results can be due to differences in functional properties of proteins present in beverages like the difference in solubility, water retention capacity or gelling properties between pea, rice and hemp could affect the viscosity of the beverages (Agboola *et al.*, 2005; Boye *et al.*, 2010; Sun & Arntfield, 2010; Raikos *et al.*, 2014; Akin & Ozcan, 2017).

The total viable count of *Lactobacillus* spp. was determined in CF, PRF and PHF (**Table 2**). The results of *Lactobacillus* spp. showed higher values in protein-enriched beverages than in the control beverage. The enrichment in protein, led to a small increase in the quantity of probiotic bacteria with 9.0 log CFU/mL for CF and 9.5 log CFU/mL for PRF and PHF. The amino acid profile, mineral content and all components in general (proteins, carbohydrates...) can influence probiotic growth. Zare *et al.* (2012a) observed that the concentration of *L. rhamnosus* AD200 of a probiotic milk was higher when milk was supplemented with 3% pea flour, passing from 8.1 to 9.3 log CFU/mL. It was suggested that the growth enhancement of *L. rhamnosus* AD200 may be due to stimulatory factors in pea flour like vitamins, antioxidants and amino acids. Despite variations in the viable count of *Lactobacillus* spp. in this study, considering that they were below 1 log CFU/mL, these changes had little microbiological significance.

3.3. Molecular weight distribution

The molecular weight distribution of the control beverage non-enriched in protein (A), the PR beverage (B) and the PH beverage (C) are presented in **Figure 1**. Peptides were divided into three different size groups, the high molecular weight peptides (HMW), the medium molecular weight peptides (MMW) and the low molecular weight peptides (LMW). The molecular weights of the groups were respectively >2700 Da (corresponding mainly to polypeptides), between 2700 and 200 Da (corresponding to oligopeptides and tripeptides) and <200 Da (corresponding mainly to dipeptides and free amino acids).

Results showed that fermentation led to a greater decrease of HMW for PRF and PHF than for CF with more than a 60% reduction for enriched beverages and 40% for CF. The difference of quantity of MMW between fermented and non-fermented was not significant ($p > 0.05$) for PR and PH beverages, but it was for the control beverages ($p \leq 0.05$). These contained more MMW than PR and PH beverages with 58% for CF and around 45% for PRF and PHF. In addition, the proportion of LMW peptides increased by more than 50% after fermentation for PRF and PHF, but was not significant for CF ($p > 0.05$). These results suggest that the fermentation process had a

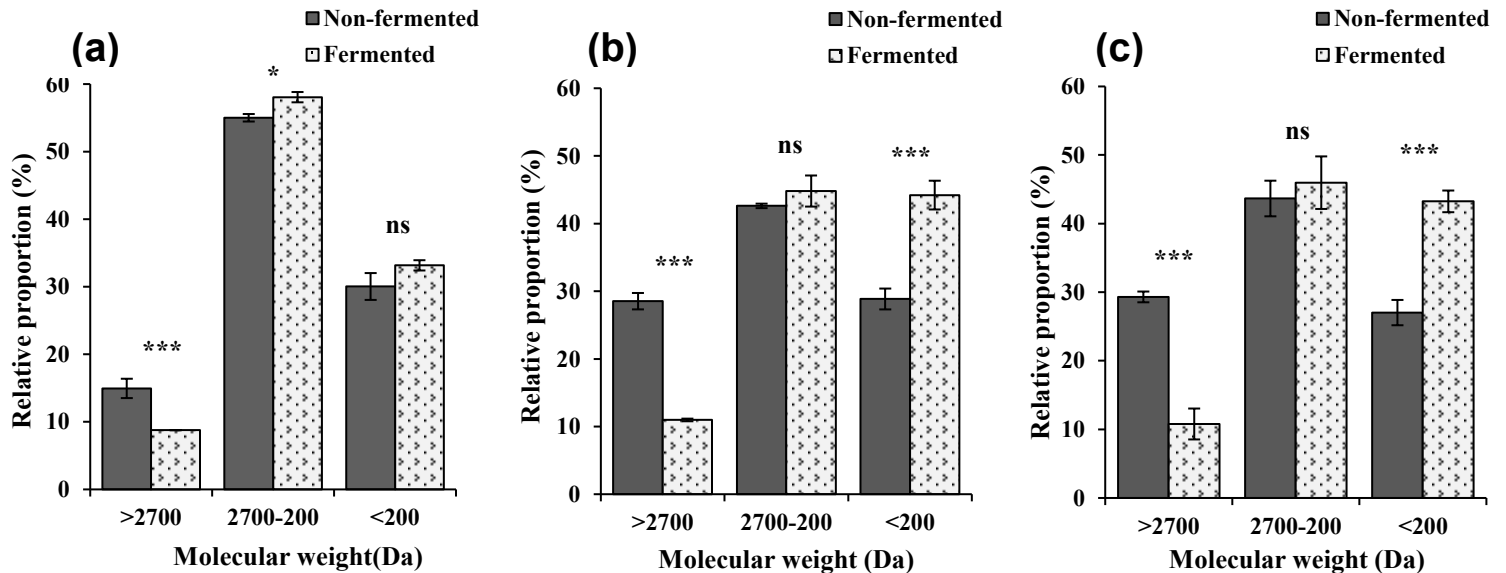


Figure 1–Molecular weight distribution of fermented and non-fermented Control (a), PR (b) and PH (c) beverage. ns: p-value > 0.05, *: p-value ≤ 0.05, **: p-value ≤ 0.01, ***: p-value ≤ 0.001.

major impact on the peptides molecular weight in enriched beverages compared to the non-enriched beverage (Control). This can be due to the higher protein content in PRF and PHF, promoting the proteolytic activity of probiotic bacteria (Vithana *et al.*, 2011).

Only a few studies have analyzed the effect of fermentation of plant protein on the molecular weight distribution of proteins and peptides. Kiers *et al.* (2000) analyzed the effect of a 48h fermentation with five *Bacillus spp.* strains on soybeans and they observed a decrease of peptides > 1100 Da, from 90% to 30%, and an increase of peptides comprised between 1100 and 200 Da, from 8% before the fermentation to 68% after the fermentation. The proteolytic activity of bacteria is known to be strain dependent (Zhang *et al.*, 2014). The results of this study showed that the specific combination of probiotics *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 had a proteolytic activity on PR and PH protein mixtures. The bacteria of *Lactobacillus* genus can generate, due to their proteolytic activity, “bioactive peptides” which have a positive

impact on human health, notably thanks to their antioxidative or antihypertensive functions (Coda *et al.*, 2012; Raveschot *et al.*, 2018). Furthermore, many studies reported that LMW peptides present higher antioxidant activity (Rajapakse *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2008). Further research is needed to characterize the biological properties of peptides released during the fermentation by the Bio-K+ probiotic formulation.

Peptide profiles of control, PR and PH beverages were analyzed during *in vitro* digestion in order to evaluate their molecular weight distribution (**Table 3**). Molecular weight is an essential criterion, giving information about protein hydrolysis which is associated with the absorption rate (Roberts *et al.*, 1999) and the bioactivity of protein hydrolysates (Li *et al.*, 2008). For all the beverages, total HMW peptides decreased during the digestion while MMW and LMW increased. This was the result of the digestion process with the enzymatic hydrolysis with pepsin and trypsin which cleave proteins and peptides into smaller peptides and free amino acids. Peptide bonds of protein with HMW tend to be more disrupted.

Table 3–Molecular weight (MW) distribution of Control, PR and PH beverages during *in vitro* digestion.

Sample	MW (Da)	NF ¹	NFP ²	NFPT ³	Δ ⁷	F ⁴	FP ⁵	FPT ⁶	Δ ⁷
Control	>2700	12.6	8.5	6.3	-50.2	12.9	8.2	6.6	-49.2
	2700-200	51.2	54.5	55.1	7.6	50.9	54.5	55.2	8.5
	<200	36.2	37	38.6	6.6	36.2	37.3	38.2	5.6
PR	>2700	16.6	7.9	6.6	-60.1	21.6	13.2	8.3	-61.5
	2700-200	47.1	53.3	52.9	12.2	48.3	54.8	59.0	22.2
	<200	36.3	38.8	40.5	11.7	30.1	32	32.7	8.5
PH	>2700	22.5	11.0	8.2	-63.5	23.8	12.6	9.3	-60.9
	2700-200	46.5	55.3	55.3	18.9	46.1	55.2	54.0	17.0
	<200	31.0	33.7	36.5	17.8	30.1	32.2	36.7	22.1

¹NF: non-fermented, at the beginning of the digestion. ²NFP: non-fermented, after the pepsin digestion. ³NFPT: non-fermented, after the pepsin+trypsin digestion. ⁴F: fermented, at the beginning of the digestion. ⁵FP: fermented, after the pepsin digestion. ⁶FPT: fermented, after the pepsin+trypsin digestion. ⁷Δ: relative difference of MW distribution between the end and the beginning of the *in vitro* digestion.

To examine the difference in the efficacy of the hydrolysis during the digestion between fermented and non-fermented products, enriched and non-enriched products, proportions at the beginning of the digestion of each group of peptides had to be compared with their proportions after the digestion (Δ values). Therefore, control beverages had the smallest differences with about 50% reduction of HMW after the digestion for both the fermented and the non-fermented beverages. The MMW peptides increased by with +8.5% for the fermented control (CF) and +7.6% for the

non-fermented control (CNF). A similar increase was observed for the LMW peptides with +5.6% for CF and +6.6% for CNF. PR and PH beverages showed about 60% reduction of HMW after *in vitro* digestion with pepsin and trypsin. The results showed an increase of 22% of MMW in the PRF beverage after the digestion as compared to an increase of 12% for the PRNF beverage. These results demonstrate that in addition to hydrolysis by pepsin and trypsin during digestion, the bacterial fermentation of pea, rice and hemp protein increased hydrolysis and resulted in the release of high or low molecular weight peptides.

3.4. *In vitro* protein digestibility

The *in vitro* protein digestibility (IVPD) was determined by the method of the nitrogen release during digestion with pepsin and trypsin. The nitrogen released during digestion indicates how the food is digested and allows to the comparison of the digestion of different formulations (Tang, 2007). **Figure 2** shows the nitrogen released during the *in vitro* digestion with pepsin (0-120 min) and trypsin (120-240 min) for the control, PR and PH beverages, before and after fermentation. The IVPD values (% N release) of the different beverages are summarized in **Table 4**.

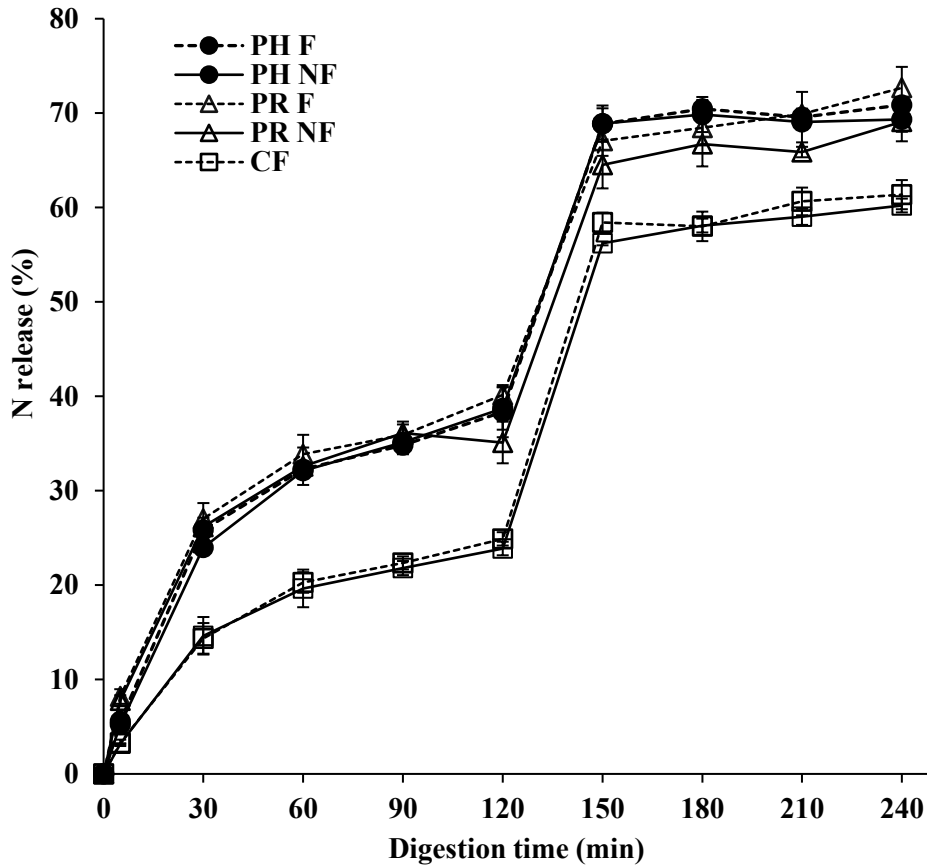


Figure 2—Percentage of nitrogen released from non-fermented (NF) and fermented (F) Control, PR and PH beverages during the *in vitro* digestion.

Our results showed that all the beverages had the same pattern of nitrogen release during digestion. The nitrogen released during the first 30 min of digestion with pepsin was fast, decelerating to between 30 and 60 min and was slow between 60 and 120 min. There was a huge increase between 120 and 150 min following the addition of trypsin and a slight increase until the end of the digestion. For control and PH beverages, there were no significant differences ($p > 0.05$) between the fermented and the non-fermented beverages during the whole digestion. However, the fermentation of PR had led to a significant increase in the digestibility ($p \leq 0.05$). Indeed, IVPD values after pepsin digestion were 35.1% with the non-fermented PR beverage, 40.2% with the fermented one and 69.3% and 72.7% after trypsin digestion, respectively. For the entire digestion period, results showed significantly higher N released in protein enriched beverages, PR and PH, as compared to the control non-enriched in protein ($p \leq 0.05$). After the pepsin digestion, the increase was approximately 35% between CF and PHF or PRF. The increase after the trypsin digestion was around 15% between CF and PHF or PRF.

Table 4—*In vitro* protein digestibility (% N released) after digestion with pepsin (120 min) and pepsin + trypsin (240 min) of Control, PR and PH beverages.

Beverages	Digestion time (min)	
	120	240
CNF	23.9 ± 0.7 ^a	60.2 ± 0.7 ^a
CF	24.9 ± 0.7 ^a	61.4 ± 1.5 ^a
PRNF	35.1 ± 2.2 ^b	69.1 ± 1.1 ^b
PRF	40.2 ± 1.0 ^c	72.7 ± 2.2 ^c
PHNF	38.7 ± 2.2 ^c	69.3 ± 2.3 ^b
PHF	38.3 ± 2.7 ^c	70.9 ± 0.6 ^{bc}

Mean values with different superscript letters within the same column are significantly different ($p \leq 0.05$).

Our results showed that digestibility is related to the hydrolysis of HMW peptides into MMW and LMW peptides. Digestibility is proportional to the increase in the hydrolysis of HMW peptides in MMW and LMW peptides. Konieczny *et al.* (2020) observed an increase of the *in vitro* protein digestibility after an enzymatic hydrolysis of a pea protein-enriched flour and attributed this increase to the release of small peptides and amino acids. Furthermore, Vithana *et al.* (2011) found that LAB fermentation of deer and cow milk increased the digestibility and the release of peptides and that the result was superior in deer milk probably due to its high protein content, providing a favorable substrate for proteolytic activity. The higher release of small peptides after the fermentation and the greater *in vitro* digestibility of protein enriched products (PR and PH) can be due to their higher protein content compared to the control beverage.

In addition to improving the digestibility of proteins, the hydrolysis of proteins can generate peptides with antihypertensive and antioxidant properties (Raveschot *et al.*, 2018). Our control beverage contained only rice protein, whereas the PR beverage contained pea and rice protein and the PH beverage contained rice, pea and predominantly hemp protein. Due to this disparity, the digestibility of these various types of protein is different (Corgneau *et al.*, 2019) and this can explain our results. Indeed, pea proteins are generally better digested than hemp and rice proteins (House *et al.*, 2010; Rutherford *et al.*, 2014). The protein digestibility of an isolate or a concentrate of rice protein is around 80-90% (Rutherford *et al.*, 2014), the one of hemp protein is about 90% (House *et al.*, 2010) and for pea protein the value is > 95% (Rutherford *et al.*, 2014; Franczyk, 2018). The digestibility value depends on many parameters such as the food matrix, the protein extraction procedure, the species used or the digestibility method used. Compared to these

values, the experimental ones obtained in this study are notably lower. Determination of IVPD can lead to the underestimation of the true protein digestibility, depending on the method used. Franczyk (2018) and Urbano *et al.* (2005) found that *in vitro* digestibility had values 10 to 25% lower than its true digestibility, determined *in vivo*. Furthermore, *in vitro* digestion does not consider all the intrinsic and extrinsic factors of *in vivo* digestion. Nevertheless, the results obtained in this study are comparable to those presented by Mridula & Sharma (2015) who obtained IVPD values of about 70% for non-dairy probiotic drinks containing sprouted cereals, legumes and soymilk. Low results can also be explained by the presence of antinutritional factors in the source of protein employed. Indeed, these factors limit the absorption of nutrients and so they reduce the protein digestibility (Gilani *et al.*, 2012). Pea contains antinutritional factors like phytates, tannins and trypsin inhibitors (Fernández-Quintela *et al.*, 1997; Vidal-Valverde *et al.*, 2003). Phytates bind to minerals and reduce protein digestibility (Ekholm *et al.*, 2003) and trypsin inhibitors are responsible for reducing digestibility and protein bioavailability by inhibiting the action of trypsin. Tannins bind and precipitate proteins, they also bind to minerals, inhibit trypsin and lipases (Adamczyk *et al.*, 2017; Hall, 2008). Rice and hemp contain very few antinutritional factors (Russo & Reggiani, 2015; Hoogenkamp *et al.*, 2017) but rice still contains a very slight amount of phytates (Albarracín *et al.*, 2013). Further analysis is needed to determine the amount of antinutritional compounds present in these proteins as well as to determine the true digestibility.

4. Conclusion

The results showed the fermentation with the mixture of the three LAB caused changes in physico-chemical properties by improving the beverage viscosity. Also, the fermented rice-based beverages showed a significantly higher nutritional value as compared to the control beverage. The fermentation of enriched beverages, PR and PH, led to an increased reduction in viscosity. The lactic acid fermentation caused an important decrease in the quantity of HMW peptides and an increase in the quantity of LMW peptides, especially in PH and PR-based beverages. PH and PR-based beverages had higher IVPD than control non-enriched beverage and the fermentation allowed an increase of the IVPD of the PRF beverage. Therefore, the lactic acid fermentation has contributed to the hydrolysis of large proteins into smaller, more digestible peptides. This research demonstrated that the quality of pea, rice and hemp proteins can be improved with probiotic LAB. Finally, an addition of pea-rice or pea-hemp proteins to a probiotic beverage gives a functional beverage with greater source of complete protein and with a good digestibility profile.

Acknowledgments

This research was supported by the Ministry of Economy and Innovation (MEI) of the province of Québec, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and by Bio-K Plus, a division of Kerry Group (Laval, Québec, Canada). Bio-K Plus is also acknowledged for providing Bio-K+ beverages and for supplying pea, rice and hemp proteins. The authors thank Fattah Rezzouk and Meriem Haddi for their technical support for the preparation of beverages and the microbial analyses.

Conflicts of interest

M. M. is paid employee of Bio-K Plus.

References

- Adamczyk, B., Simon, J., Kitunen, V., Adamczyk, S., & Smolander, A. (2017). Tannins and Their Complex Interaction with Different Organic Nitrogen Compounds and Enzymes: Old Paradigms versus Recent Advances. *ChemistryOpen*, 6(5), 610–614.
- Agboola, S., Ng, D., & Mills, D. (2005). Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates. *Journal of Cereal Science*, 41(3), 283-290.
- Aguirre, L., Hebert, E. M., Garro, M. S., & de Giori, G. S. (2014). Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains on soybean proteins. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 780-785.
- Akin, Z., & Ozcan, T. (2017). Functional properties of fermented milk produced with plant proteins. *LWT – Food Science and Technology*, 86, 25-30.
- Albarracín, M., González, R. J., & Drago, S. R. (2013). Effect of soaking process on nutrient bio-accessibility and phytic acid content of brown rice cultivar. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 76–80.
- Ali, M., El Tinay, A., & Abdalla, A. (2003). Effect of fermentation on the *in vitro* protein digestibility of pearl millet. *Food Chemistry*, 80(1), 51-54.
- Amadou, I., LE, G. W., SHI, Y. H., Gbadamosi, O. S., Kamara, M. T., & Jin, S. U. N. (2011). Optimized *Lactobacillus plantarum* Lp6 solid-state fermentation and proteolytic hydrolysis improve some nutritional attributes of soybean protein meal. *Journal of Food Biochemistry*, 35(6), 1686-1694.
- AOAC. (2000). Method 942.15. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International, 17th ed. AOAC International: Gaithersburg, ML.
- AOAC. (2000). Method 991.20. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International, 17th ed. AOAC International: Gaithersburg, ML.
- AOAC. (2000). Method 985.26. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International, 17th ed. AOAC International: Gaithersburg, ML.
- Baldwin, C., Millette*, M., Oth, D., Ruiz, M. T., Luquet, F. M., & Lacroix, M. (2010). Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei* mix sensitize colorectal tumoral cells to 5-fluorouracil-induced apoptosis. *Nutrition and Cancer*, 62(3), 371-378.
- Beausoleil, M., Fortier, N., Guénette, S., L'Ecuyer, A., Savoie, M., Franco, M., ... & Weiss, K. (2007). Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* C1285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 21.
- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S. H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537-546.

Coda, R., Rizzello, C. G., Pinto, D., & Gobbetti, M. (2012). Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1087-1096.

Corgneau, M., Gaiani, C., Petit, J., Nikolova, Y., Banon, S., Ritié-Pertusa, L., Le, D. T. L., Scher, J. (2019). Nutritional quality evaluation of commercial protein supplements. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(8), 2586–2594.

Clark, M., & Tilman, D. (2017). Comparative analysis of environmental impacts of agricultural production systems, agricultural input efficiency, and food choice. *Environmental Research Letters*, 12(6), 064016.

Desrouillères, K., Millette, M., Vu, K. D., Touja, R., & Lacroix, M. (2015). Cancer preventive effects of a specific probiotic fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 on male F344 rats treated with 1, 2-dimethylhydrazine. *Journal of Functional Foods*, 17, 816-827.

Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., & Yang, H. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolyzates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107(4), 1485-1493.

Ekholm, P., Virkki, L., Ylinen, M., & Johansson, L. (2003). The effect of phytic acid and some natural chelating agents on the solubility of mineral elements in oat bran. *Food Chemistry*, 80(2), 165–170.

FAO/WHO. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, 10, 1–4.

FAO-WHO. (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. Report of a joint WHO/FAO/UNU expert consultation. Geneva, Switzerland. (WHO technical report series, No. 935).

Fernández-Quintela, A., Macarulla, M. T., Del Barrio, A. S., & Martínez, J. A. (1997). Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51(4), 331-341.

Franczyk, A. (2018). Evaluation of *in vitro* methodology to determine protein digestibility and quality of plant-based proteins. Master's thesis. University of Manitoba, Winnipeg.

Ghavidel, R. A., & Prakash, J. (2007). The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, *in vitro* iron and calcium bioavailability and *in vitro* starch and protein digestibility of some legume seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 40(7), 1292–1299.

Gilani, G. S., Xiao, C. W., & Cockell, K. A. (2012). Impact of Antinutritional Factors in Food Proteins on the Digestibility of Protein and the Bioavailability of Amino Acids and on Protein Quality. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S315–S332.

Grimble, G. K. (1994). The significance of peptides in clinical nutrition. *Annual review of nutrition*, 14(1), 419-447.

Hall, C. (2008). Antinutrients, digestibility and antigenicity of pulses. In: Pulse quality and utilization short course, October, 2008, Fargo, ND.

- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Calder, P. C. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514.
- Holzapfel, W., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal Of Clinical Nutrition*, 73(2), 365s-373s.
- Hoogenkamp, H., Kumagai, H., & Wanasundara, J. (2017). Rice Protein and Rice Protein Products. *Sustainable Protein Sources*, 47–65.
- House, J. D., Neufeld, J., & Leson, G. (2010). Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11801–11807.
- Kalpanadevi, V., & Mohan, V. (2013). Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of the underutilized legume, *Vigna unguiculata* (L.) Walp subsp. *unguiculata*. *LWT - Food Science and Technology*, 51(2), 455–461.
- Khalidi, N., Holton, T. A., Shields, D. C. (2014). Amino acid enrichment and compositional changes among mammalian milk proteins and the resulting nutritional consequences. *Journal of Dairy Science*, 97(3):1248-58.
- Kiers, J. L., Rombouts, F. M., & Nout, M. J. R. (2000). *In vitro* digestibility of *Bacillus* fermented soya bean. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2-3), 163-169.
- Konieczny, D., Stone, A. K., Nosworthy, M. G., House, J. D., Korber, D. R., Nickerson, M. T., & Tanaka, T. (2020). Nutritional properties of pea protein-enriched flour treated with different proteases to varying degrees of hydrolysis. *Cereal Chemistry*, 97(2), 429-440.
- Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., & Liu, J. (2008). Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 106(2), 444-450.
- Magala, M., Kohajdova, Z., Karovičová, J., Greifova, M., & Hojerova, J. (2015). Application of lactic acid bacteria for production of fermented beverages based on rice flour. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(5), 458-463.
- Matar, C., Amiot, J., Savoie, L., & Goulet, J. (1996). The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the release of peptides during in vitro digestion. *Journal of Dairy Science*, 79(6), 971-979.
- McFarland, L. V., Ship, N., Auclair, J., & Millette, M. (2018). Primary prevention of *Clostridium difficile* infections with a specific probiotic combining *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, and *L. rhamnosus* strains: assessing the evidence. *Journal of Hospital Infection*, 99(4), 443-452.
- McFarland, L. V. (2007). Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 5(2), 97–105.
- Millette, M., Nguyen, A., Amine, K. M., & Lacroix, M. (2013). Gastrointestinal survival of bacteria in commercial probiotic products. *International Journal of Probiotics & Prebiotics*, 8(4), 149.

- Millette, M., Luquet, F. M., Ruiz, M. T., & Lacroix, M. (2008). Characterization of probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *Dairy Science and Technology*, 88(6), 695-705.
- Mridula, D., & Sharma, M. (2015). Development of non-dairy probiotic drink utilizing sprouted cereals, legume and soymilk. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 482-487.
- Nnam, N. M., & Obiakor, P. N. (2003). Effect of fermentation on the nutrient and antinutrient composition of baobab (*Adansonia digitata*) seeds and rice (*Oryza sativa*) grains. *Ecology of Food and Nutrition*, 42(4-5), 265-277.
- Oliveira, M. N. D., Sodini, I., Remeuf, F., & Corrieu, G. (2001). Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 11(11-12), 935-942.
- Osman, A. M. A., Hassan, A. B., Osman, G. A. M., Mohammed, N., Rushdi, M. A. H., Diab, E. E., & Babiker, E. E. (2012). Effects of gamma irradiation and/or cooking on nutritional quality of faba bean (*Vicia faba* L.) cultivars seeds. *Journal of Food Science and Technology*, 51(8), 1554–1560.
- Pereira, C., Henriques, M., Gomes, D., Gomez-Zavaglia, A., & de Antoni, G. (2015). Novel functional whey-based drinks with great potential in the dairy industry. *Food Technology and Biotechnology*, 53(3), 307-314.
- Preston, K., Krumian, R., Hattner, J., de Montigny, D., Stewart, M., & Gaddam, S. (2018). *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 improve quality-of-life and IBS symptoms: a double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Beneficial Microbes*, 9(5), 697-706.
- Raikos, V., Neacsu, M., Russell, W., & Duthie, G. (2014). Comparative study of the functional properties of lupin, green pea, fava bean, hemp, and buckwheat flours as affected by pH. *Food Science & Nutrition*, 2(6), 802-810.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9), 562-569.
- Raveschot, C., Cudennec, B., Coutte, F., Flahaut, C., Fremont, M., Drider, D., & Dhulster, P. (2018). Production of Bioactive Peptides by *Lactobacillus* Species: From Gene to Application. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2354.
- Roberts, P. R., Burney, J. D., Black, K. W., & Zaloga, G. P. (1999). Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion*, 60(4), 332-337.
- Russo, R., & Reggiani, R. (2015). Evaluation of protein concentration, amino acid profile and antinutritional compounds in hempseed meal from dioecious and monoecious varieties. *American Journal of Plant Sciences*, 6, 14–22.
- Rutherford, S. M., Fanning, A. C., Miller, B. J., & Moughan, P. J. (2014). Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats. *The Journal of Nutrition*, 145(2), 372–379.

Sarwar Gilani, G., Wu Xiao, C., & Cockell, K. (2012). Impact of Antinutritional Factors in Food Proteins on the Digestibility of Protein and the Bioavailability of Amino Acids and on Protein Quality. *British Journal Of Nutrition*, 108(S2), S315-S332.

Statista. (2018). U.S. functional foods market – Statistics & facts. Retrieved September 30, 2019 from: <https://www.statista.com/topics/1321/functional-foods-market/>

Sun, X. D., & Arntfield, S. D. (2010). Gelation properties of salt-extracted pea protein induced by heat treatment. *Food Research International*, 43(2), 509-515.

Tang, C. H. (2007). Functional properties and *in vitro* digestibility of buckwheat protein products: Influence of processing. *Journal of Food Engineering*, 82(4), 568-576.

Tomé, D. (2013). Digestibility Issues of Vegetable versus Animal Proteins: Protein and Amino Acid Requirements—Functional Aspects. *Food and Nutrition Bulletin*, 34(2), 272-274.

Tyl, C., & Sadler, G. D. (2017). pH and titratable acidity. In *Food analysis* (pp. 389-406). Springer, Cham.

Urbano, G., López-Jurado, M., Ławomir Frejngel, S., Gómez-Villalva, E., Porres, J. M., Frías, J., ... & Aranda, P. (2005). Nutritional assessment of raw and germinated pea (*Pisum sativum* L.) protein and carbohydrate by *in vitro* and *in vivo* techniques. *Nutrition*, 21(2), 230-239.

Vidal-Valverde, C., Frias, J., Hernández, A., Martín-Alvarez, P. J., Sierra, I., Rodríguez, C., ... & Vicente, G. (2003). Assessment of nutritional compounds and antinutritional factors in pea (*Pisum sativum*) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(4), 298-306.

Vithana, N. O., Mason, S. L., Bekhit, A. E. A., & Morton, J. D. (2011). The release of peptides by *in-vitro* digestion of fermented red deer (*Census elphus*) and cow (*Bos taurus*) milk. In *Proceedings of the Nutrition Society of New Zealand* (Vol. 35, pp. 12-19). Nutrition Society of New Zealand (Inc).

Wang, J., Guo, Z., Zhang, Q., Yan, L., Chen, W., Liu, X. M., & Zhang, H. P. (2009). Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2468-2476.

Wang, X-Sh., Tang, Ch-He., Yang, X-Q., Gao, W-R. (2008). Characterization, amino acid composition and *in vitro* digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. *Food Chemistry*, 107: 11–18.

Yun, J., Kwon, I., Lohakare, J., Choi, J., Yong, J., & Zheng, J. *et al.* (2005). Comparative efficacy of plant and animal protein sources on the growth performance, nutrient digestibility, morphology and caecal microbiology of early-weaned pigs. *Asian-Australasian Journal Of Animal Sciences*, 18(9), 1285-1293.

Zare, F., Boye, J. I., Champagne, C. P., Orsat, V., & Simpson, B. K. (2012a). Probiotic milk supplementation with pea flour: Microbial and physical properties. *Food and Bioprocess Technology*, 6(5), 1321-1331.

Zare, F., Champagne, C. P., Simpson, B. K., Orsat, V., & Boye, J. I. (2012b). Effect of the addition of pulse ingredients to milk on acid production by probiotic and yoghurt starter cultures. *LWT-Food Science and Technology*, 45(2), 155-160.

Zhang, S., Shi, Y., Zhang, S., Shang, W., Gao, X., & Wang, H. (2014). Whole soybean as probiotic lactic acid bacteria carrier food in solid-state fermentation. *Food Control*, 41, 1-6.

Lien entre les chapitres 3 et 4

Le chapitre 3 « Digestibilité protéique *in vitro* et propriétés physico-chimiques de boissons fermentées à base de bactéries lactiques, enrichies en protéines végétales » a permis d'analyser notamment la digestibilité *in vitro* de deux boissons enrichies en différentes protéines. Grâce aux résultats obtenus de digestibilité, de contenu en protéines totales, d'indices chimiques et de distribution de poids moléculaires de peptides, il a été possible de sélectionner une boisson ayant les meilleurs résultats et avec laquelle la suite des expériences se déroulerait. Ainsi, la boisson PR a été choisie du fait de sa plus grande concentration en protéines, de son meilleur indice chimique et de sa meilleure digestibilité protéique *in vitro*.

Ainsi, de par la complexité à reproduire l'appareil digestif et afin de confirmer ou non les résultats obtenus *in vitro* il était pertinent d'analyser la digestibilité protéique *in vivo*. Également, dans le but d'obtenir une allégation nutritionnelle au Canada, il était indispensable de réaliser une expérience *in vivo* en utilisant le modèle des rats. Ainsi, avec le chapitre 4 « Qualité protéique d'une boisson probiotique enrichie en protéines de pois et de riz », il a été possible d'analyser la digestibilité protéique *in vivo* de la boisson sélectionnée, la boisson PR, enrichie en protéines de pois et de riz.

CHAPITRE 4: PROTEIN QUALITY OF A PROBIOTIC BEVERAGE ENRICHED IN PEA AND RICE PROTEINS

Manus, J.^a, Dridi, C.^a, Salmieri, S.^a, Millette, M.^b, Aguilar, B.^c, Lacroix, M.^{a*}.

Qualité protéique d'une boisson probiotique enrichie en protéines de pois et de riz.

L'article a été soumis au « Journal of Food Science » le 01 février 2021.

Contribution des auteurs

Johanne Manus a réalisé les manipulations et la rédaction de l'article.

Chaima Dridi a aidé aux manipulations avec les rats.

Stéphane Salmieri a aidé aux tests statistiques.

Mathieu Millette a supervisé la recherche, fourni du matériel et participé à la correction de l'article,

Blanca Rosa Aguilar Uscanga a supervisé la recherche et a participé à la correction de l'article.

Monique Lacroix a été la directrice de recherche et la coordinatrice de ce projet de recherche. Elle a participé à la planification des expériences et à la correction de l'article.

Résumé

Le but de cette étude était d'évaluer l'effet de la fermentation d'une boisson probiotique enrichie avec des protéines de pois et de riz (PRF) sur la qualité protéique. La qualité protéique a été déterminée par le coefficient d'efficacité protéique (CEP ou PER), le CEP net (NPR), la digestibilité apparente (AD) et la digestibilité réelle (TD) évalués *in vivo*. La boisson probiotique a été incorporée à un régime alimentaire pour rats à une concentration finale de 10% de protéines, pour l'évaluation du CEP, du NPR, de l'AD et de la TD. L'indice chimique corrigé de la digestibilité (PDCAAS) a également été calculé. Les résultats ont montré que la fermentation d'une boisson enrichie en protéines de pois et de riz (PR) n'avait aucun effet sur la TD mais augmentait significativement le PER et le NPR ($P \leq 0,05$) de 1,88 à 2,32 et de 1,66 à 2,30, respectivement. D'autre part, la quantification des probiotiques dans les fèces a montré une concentration de 7,4 log UFC/g.

Mots-clés

Lactobacillus, protéines végétales, probiotique, digestibilité protéique *in vivo*, coefficient d'efficacité protéique.

Protein quality of a probiotic beverage enriched in pea and rice proteins

Manus, J.^a, Dridi, C.^a, Salmieri, S.^a, Millette, M.^b, Aguilar, B.^c, Lacroix, M.^{a*}.

^a Research Laboratories in Sciences Applied to Food, Canadian Irradiation Center, INRS, Armand-Frappier, Health and Biotechnology Centre, Institute of Nutrition and Functional Foods, 531 des Prairies blvd, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada.

^b Bio-K Plus, a division of Kerry Group, 495 Armand-Frappier blvd, Laval, Québec, H7V 4B3, Canada.

^c Research Laboratory of Industrial Microbiology. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara. 1421, Blvd. Marcelino Garcia Barragan. Col. Olímpica, 44430. Guadalajara, Jalisco, Mexico.

* Corresponding author. Dr. Monique Lacroix, Email: Monique.Lacroix@inrs.ca.
Tel: 450-687-5010 # 4489, Fax: 450-686-5501.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of the fermentation of a probiotic beverage enriched with pea and rice proteins (PRF) on their protein quality. The protein quality was determined as the protein efficiency ratio (PER), net protein ratio (NPR) and the apparent (AD) and the true digestibility (TD) evaluated *in vivo*. The probiotic beverage was incorporated in a rat diet at a final concentration of 10% protein, for the evaluation of the PER, the NPR, the AD and the TD. The protein digestibility amino acid score (PDCAAS) was also calculated. Results showed that the fermentation of a beverage enriched with pea and rice proteins (PR) had no effect on the TD but significantly increased the PER and the NPR ($P \leq 0.05$) from 1.88 to 2.32 and from 1.66 to 2.30, respectively. Additionally, the quantification of probiotics in feces showed a concentration of 7.4 log CFU/g.

Keywords:

Lactobacillus, plant-based protein, probiotic, *in vivo* protein digestibility, protein efficiency ratio.

1. Introduction

The marketing of functional foods, including probiotic products and protein-rich products, is growing around the world. People are more and more concerned about their diet and its impact on health. Numerous beneficial effects of probiotic bacteria on health have been demonstrated, such as the reduction of the incidence of Antibiotic Associated Diarrhea (Beausoleil *et al.*, 2007; Sampalis *et al.*, 2010; Mekonnen *et al.*, 2020), travelers' diarrhea (McFarland, 2007), *Clostridioides difficile* Associated Diarrhea (Gao *et al.*, 2010; McFarland *et al.*, 2018; McFarland *et al.*, 2020), antihypertensive properties (Gómez-Guzmán *et al.*, 2015; Robles-Vera *et al.*, 2017), the reduction of the symptoms of lactose intolerance (Oak & Jha, 2019), the reduction of precancerous loci in rats (Desrouillères *et al.*, 2015), and a synergistic proapoptotic effect with a chemotherapeutic agent against colorectal tumoral cells (Baldwin *et al.*, 2010). In general, probiotics have a role in the modulation of the immune system. For example, it was observed that *Lactobacillus rhamnosus*, *L. johnsonii*, *L. delbruckeii susp. lactis*, *L. acidophilus* and *Streptococcus thermophilus* can induce the secretion of some important cytokines like IFN- γ , TNF- α , and IL-12 which play roles in inducing and modulating the immune responses (De Léséleuc *et al.*, 2002; Chabot *et al.*, 2010; Ashraf & Shah, 2014).

Products enriched in protein, on the other hand, provide a high protein intake for the elderly and active individuals who require a diet with a greater amount of proteins (Phillips & Van Loon, 2011; Wolfe *et al.*, 2008). These products can also be important for individuals on a weight-loss diet (Leidy *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Most probiotics and protein-enriched products present in beverage format are dairy products. Due to lactose intolerance, veganism or environmental awareness, an increasing number of consumers are looking for alternatives to animal proteins (de Boer *et al.*, 2017). In response to consumer demand, a growing number of studies are focusing on the development of functional foods enriched with plant-based proteins and on the nutritional values of plant-based protein isolates such as soy, pea, rice, hemp, cashew nuts or even insects (Singh *et al.*, 2008; House *et al.*, 2010; Joy *et al.*, 2013; Osimani *et al.*, 2018).

Consumer interest in soy proteins is declining, mainly due to their allergenicity and their involvement in deforestation, whilst pea and rice protein markets are growing rapidly because of their nutritional qualities, their low costs and the fact they are not common allergens (McKinsey & Company, 2019). However, it is recognized that plant-based proteins are less well digested and of lower quality compared to animal proteins in terms of protein quality and digestibility (Hossain *et al.*, 1997; Boye *et al.*, 2012; Gilani *et al.*, 2012; Canadian Food Inspection Agency, 2018).

Several elements characterize the nutritional quality of a protein: protein composition in essential amino acids (EAA), protein digestibility as well as protein absorption by the metabolism (FAO, 1991). Most of the time, plant-based proteins have a lack of EAA, turning them into “incomplete” proteins (Tomé, 2013). In general, legumes are methionine deficient while cereals are lysine deficient. Nevertheless, by combining two types of proteins, such as legumes and cereal, the deficiency in EAA can be overcome (Kannan *et al.*, 2001), however, the *in vivo* absorption is not necessarily assured. Plant-based proteins also contain antinutritional factors, restricting the absorption of nutrients, thus affecting digestion (Gilani *et al.*, 2012). It has been demonstrated that transformation processes by physical, chemical or enzymatic processes such as roasting, cooking, micronization, germination or fermentation have great effects on the quality of plant-based proteins, modifying their structures, making them more accessible to enzymes, increasing their nutritional qualities and their digestibility (Ghavidel & Prakash, 2007; Khattab *et al.*, 2009; Kiers *et al.*, 2000; Lacroix *et al.*, 1983). Due to the proteolytic activity of lactic acid bacteria (LAB) (Raveschot *et al.*, 2018), fermentation could pre-digest the proteins, leading to a better assimilation. However, each probiotic bacterium has its own phenotypes (Donkor *et al.*, 2007; Yan & Polk, 2011).

The aim of this study was to evaluate the effect of lactic acid fermentation, using a specific ferment containing probiotic *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2, on the protein quality of a pea and rice protein-enriched beverage. In order to characterize the protein quality of the fermented beverage, the protein efficiency ratio (PER), the net protein ratio (NPR) and the true digestibility (TD) were evaluated *in vivo* in rats and the protein digestibility corrected amino acid score (PDCAAS) was calculated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

A commercial probiotic beverage (Bio-K+™ Blueberry) and Bio-K+™ ferment (composed of *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2), organic pea protein concentrate containing 80% protein (w/w) (Fying, Riverside, CA, USA) and organic brown rice protein containing 80% protein (w/w) (Fying) were kindly supplied by Bio-K Plus, a division of Kerry Group (Laval, Québec, Canada).

2.2. Preparation of beverages

All the ingredients in powder form of Bio-K+™ Blueberry, plus a 50/50 blend of pea and brown rice protein concentrates, were weighed and hydrated with filtered water. Beverages were then pasteurized at 90 ± 2 °C for 60 sec, packaged in 98 g plastic bottles, aluminium-sealed, and then cooled to 37 °C. Beverages were then inoculated with Bio-K+™ ferment at 10^8 CFU/mL, incubated at 37 ± 1 °C for 14 ± 2 h, and cooled to 4 °C. Another beverage was prepared using a similar protocol, but without addition of the probiotic bacteria. This preparation served as control. Both types of beverages, fermented (PRF) and non-fermented (PRNF), containing pea and rice proteins, were prepared with a total protein content of 13% based on preliminary feasibility study (results not shown). The beverages were then freeze-dried and ground to pass through a 20-mesh sieve prior to preparation of the diets.

2.3. Diet formulation

The composition of diets is shown in **Table 5**. The diets were formulated to contain 10% protein (except the protein-free diet) according to the official method of AOAC 960.48.

Table 5—Composition of the diets (g/100 g) used during the animal study.

Ingredients	Casein	Protein free	PRF	PRNF
Casein	11.4	-	-	-
PRNF	-	-	20.2	-
PRF	-	-	-	20.2
Mineral mix	4.5	4.5	4.5	4.5
Vitamin mix	1.2	1.2	1.2	1.2
Soybean oil	7.9	7.9	6.9	6.9
Cellulose	5	5	4.1	4.1
Sucrose	10	10	10	10
Starch	60	71.4	53.1	53.1
Protein %	10	0	10	10

PRF: fermented beverage enriched in pea and rice protein. PRNF: non-fermented beverage enriched in pea and rice protein.

A casein-based diet was used as the reference standard diet and a protein-free diet that contained no protein was used as a negative control. PRF and PRNF-based diets were prepared using the freeze-dried beverages enriched in pea and rice proteins as protein sources. Protein sources were mixed with vegetable oil, vitamins, minerals, sucrose and cellulose in equal quantities and completed with starch to fix calories contained at 4.1 kcal/g. The diets were presented in form of pellets.

2.4. Animal experiment and biological assay

Weanling male Wistar rats, aged 20-23 days, were distributed in 4 groups of 7 rats and each rat was housed in a separate cage. Environmental conditions were an alternation of 12 hours of light and dark period at a temperature of 20 ± 3 °C. After the acclimation period of 4 days during which the rats were fed a standard diet, each group of rats were fed with one of the experimental diets, *ad libitum* for 14 days. For the determination of the Protein Efficiency Ratio (PER), individual rat body weight was recorded every 2 days, feed intake and feed waste were recorded every day in order to calculate weight gain, weight loss and protein intake. The PER was determined as the ratio of weight gain (W_g) of the animal and the amount of protein consumed (P_i). Values were adjusted to a standardized PER value of 2.5 for the standard casein diet to obtain the Adjusted PER (APER). The Net Protein Ratio (NPR) includes the loss in body weight (W_l) of the group fed with the protein-free diet as follows:

$$\text{NPER} = \frac{W_g - W_l}{P_i}$$

In order to determine if the fermented rice-based beverage enriched in pea and rice protein can acquire a protein content claim in Canada, protein rating was calculated as the product of the APER and the amount of protein (g) contained in a standard reference serving size. A protein rating between 20 and 40 is considered as a “source of protein” and a protein rating >40 as an “excellent source of protein” (Canadian Food Inspection Agency, 2019).

For the determination of the digestibility, feces were collected daily. At the end of the experiment, feces were dried in an oven at 105 °C for 24 h, cooled, weighed and ground in a mortar. The amount of nitrogen was determined using Kjeldahl method according to AOAC official method 991.20 (2000). The Apparent Digestibility (AD) and the True Digestibility (TD) were calculated as follows:

$$\text{AD} = \frac{N_i - N_e}{N_i}$$

$$\text{TD} = \frac{N_i - (N_e - N_{ef})}{N_i}$$

Where N_i corresponds to the amount of nitrogen ingested in the diet, N_e to the quantity of nitrogen excreted in feces and N_{ef} represents the fecal nitrogen in the protein-free group, corresponding to the metabolic loss in feces.

The Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS) was calculated as the product of TD and the amino acid score (AAS). The latter corresponds to the quantity of the limiting amino acid divided by the relative abundance of the same amino acid in the protein reference adopted by the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the World Health Organization (WHO) (2007). When the AAS is inferior to 1, the corresponding EAA is considered as limiting and thus the protein does not provide enough of this amino acid.

For the purpose of making a protein claim in the United States, the product of the protein content of a 98 g bottle of the PRF beverage and the PDCAAS of PRF was calculated and corresponded to the corrected level of protein (CLP). The CLP was compared to the daily reference value (DRV), which is 50 g of protein. Food with CLP value between 10 and 19% of the DRV constitute “good source of protein”. Food with CLP value higher than 20% of the DRV are qualified as “excellent source of protein” (FDA, 2020).

2.5. Quantification of probiotics

In order to evaluate the probiotic bacterial resistance to the gastro-intestinal conditions, the bacterial number in feces was quantified. The concentration of probiotics in the PRF diet was determined before the experiment and was 8.5 log CFU/g. Feces were collected in the colon of rats and stored in a sterile plastic tube at the end of the 14 days of the experiment. DNA was extracted from fecal samples with the Qiagen DNeasy PowerSoil Kit. Afterward, probiotic strains were quantified, from the extracted DNA, with quantitative PCR using specific primers targeting *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2. The fluorescence signals obtained were analyzed and compared to those obtained from reference DNA of each of *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 strains. Concentrations were expressed in colony-forming unit (CFU) per gram of feces.

2.6. Statistical analysis

The data were reported as mean \pm standard deviation. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) by SPSS 22.0 software (IBM, NY, USA). Differences among mean values were examined by the Duncan's multiple comparison test at a $p \leq 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Animal growth and protein efficiency ratio

The results related to the diet intake and weight gain of the rats are summarized in **Table 6**. Initial weights of rats were similar for the four groups ($p > 0.05$), between 93.3 and 95.5 g. The results showed that the group of rats fed with the casein diet had the highest final weight with 189.5 ± 18.3 g. The group of rats fed with the PRF-based diet had a final weight slightly superior to the group of rats fed with PRNF, with 170.5 ± 19.5 g and 162.3 ± 16.3 g, respectively. Because of its lack of protein, the rats fed with the protein-free diet lost weight and had a final weight of 75.2 ± 3.5 g. The amount of food intake, and therefore the amount of protein intake, were similar between groups of rats fed with the casein-based diet, the PRF-based diet and the PRNF-based diet with 21.5 ± 2.8 g, 19.5 ± 2.4 g and 19.0 ± 2.5 g of food ingested, respectively ($p > 0.05$).

Table 6–Effect of different diets on the growth of weanling rats.

	Casein	Protein free	PRF	PRNF
Initial weight (g)	93.3 ± 8.4^a	94.9 ± 2.8^a	95.5 ± 8.6^a	95.0 ± 4.8^a
Final weight (g)	189.5 ± 18.3^c	75.2 ± 3.5^a	170.5 ± 19.5^{bc}	162.3 ± 16.3^b
Average daily gain (g/day)	7.7 ± 1.1^c	-1.5 ± 0.1^a	5.5 ± 0.9^b	4.5 ± 0.8^b
Food intake (g/day)	21.5 ± 2.8^b	8.2 ± 1.2^a	19.5 ± 2.4^b	19.0 ± 2.5^b
Protein intake (g/day)	2.1 ± 0.3^b	0.0 ± 0.1^a	2.1 ± 0.2^b	2.0 ± 0.3^b

Mean values with different superscript letters within the same row are significantly different ($p \leq 0.05$).

The PER method is one of the procedures used for the determination of protein quality and it is the official method employed in Canada (Health Canada, 1981). The results of the PER showed that there were no significant differences between the PER of casein and the PER of PRF ($p > 0.05$) with values of 3.25 ± 0.34 and 3.01 ± 0.09 , respectively (**Table 7**). The PER of casein was adjusted to 2.50 in order to obtain the adjusted PER (APER) (Chapman *et al.*, 1959; Health Canada, 1981). The APER of PRF was significantly higher ($p \leq 0.05$) than the APER of PRNF with values of 2.32 ± 0.07 and 1.88 ± 0.11 , respectively. An APER value lower than 1.5 is considered of poor quality, an APER between 1.5 and 2.0 corresponds to a protein with an intermediate quality and an APER >2.0 represents a protein of high quality (Friedman, 1996). Therefore, the results showed that the fermentation had a beneficial impact on pea-rice protein mix quality, improving its PER and enhancing its protein quality from intermediate to high. The determination of the PER takes into account capacity of protein to support growth of the body using the ratio of growth weight

to the amount of ingested protein. These results demonstrate that the fermented PR product promotes the body growth better than the non-fermented PR product. Wang *et al.* (1968) observed that fermentation of soybeans with *Rhizopus oligosporus* increased the PER value from 1.71 to 2.17. Moreover, Berrazaga *et al.* (2018) performed a chemical or lactic acid fermentation of dairy mixed gels containing fava bean and the results showed a higher PER value of the gel fermented with bacteria than the chemically fermented gel, with PER values of 1.9 and 1.2 respectively.

Table 7–Effect of fermentation on nutritional values of plant-based protein beverage.

Diets	PER	APER	NPR
Casein	3.25 ± 0.34 ^b	2.50 ± 0.26 ^b	2.52 ± 0.40 ^b
PRF	3.01 ± 0.09 ^b	2.32 ± 0.07 ^b	2.30 ± 0.13 ^b
PRNF	2.44 ± 0.15 ^a	1.88 ± 0.11 ^a	1.66 ± 0.09 ^a

PER: protein efficiency ratio. APER: adjusted PER. NPR: net protein ratio. Mean values with different superscript letters within the same column are significantly different ($p \leq 0.05$).

Furthermore, the APER value of the PRF beverage, with 2.32 ± 0.07 , showed a higher PER value than the PER value obtained for pea flour, rice, and soy protein, whose PER are 1.2, 1.5, and 2, respectively (Canadian Food Inspection Agency, 2018). Most of the time, the PER of plant-based proteins are between 1 and 2 and those of animal proteins are generally between 2.5 and 3 (Canadian Food Inspection Agency, 2018). Lower PER of plant-based proteins can be attributed to their globular protein structure, the presence of antinutritional factors, and a lack of EAA (Subirade, Gueguen & Pézolet, 1994; El-Niely, 2007; Acevedo-Pacheco & Serna-Saldivar, 2016). Owusu-Ansah & McCurdy (1991) observed that a supplementation with methionine of a pea protein concentrate increased the PER value from 1.10 to 2.18. Moreover, Sarwar *et al.* (1975) found a PER value of 2.21 for a blend made of 50% pea and 50% rice. However, the PER method is known to overestimate the quality of animal proteins and underestimate the quality of plant-based proteins (Boye *et al.*, 2012; FAO, 1991), mainly due to the rapid growth of rats compared to humans, which increase the need for EAAs (Elango *et al.*, 2009). The requirements for sulfur-containing amino acids are much higher for rats than for humans (Sarwar & McDonough, 1990).

The NPR value takes into account the weight loss of rats fed the protein-free diet, reduces the major deficiency of the PER method which is criticized for not taking into account the proteins used for the maintenance of the body (Boye *et al.*, 2012; Gilani & Lee, 2003). The PRNF diet showed the lowest NPR value with 1.66 ± 0.09 , as compared to casein and PRF diet with NPR values 2.52 ± 0.40 and 2.30 ± 0.13 , respectively. In summary, the NPR of the PRF beverage

represented 91% of the NPR value of casein, the reference protein, whereas the NPR of the PRNF beverage represented 66% of the NPR value of casein.

The protein rating is obtained by multiplying the protein content in a standard reference serving size and the APER of the product (Canadian Food Inspection Agency, 2019). With a protein content of 13% and a serving size of 98 g, the protein rating of PRF beverage is 29.6. The PRF beverage may qualify for a protein claim “source of protein” in Canada, which takes into account food with protein rating between 20 and 40 (Canadian Food Inspection Agency, 2019).

3.2. In vivo digestibility and PDCAAS

The true and apparent protein digestibility values of casein, PRF and PRNF-based beverages are presented in **Table 8**.

Table 8– Effect of the fermentation on the digestibility of plant-based protein beverage.

Diets	AD (%)	TD (%)	PDCAAS (%)
Casein	94.41 ± 0.88 ^b	96.07 ± 0.76 ^b	100 ¹
PRF	87.64 ± 0.78 ^a	89.48 ± 0.89 ^a	100
PRNF	87.03 ± 0.83 ^a	89.07 ± 0.49 ^a	99.8

AD: apparent digestibility. TD: true digestibility. PDCAAS: protein digestibility corrected amino acid score. ¹: FAO, 1991. Mean values with different superscript letters within the same column are significantly different ($p \leq 0.05$).

The TD considers the nitrogen from basal metabolism from the protein-free group diet. Despite a significantly higher PER, results showed that the TD value of PRF-based beverage was not significantly different ($p > 0.05$) from the TD value of the PRNF-based beverage with $89.48 \pm 0.89\%$ and $89.07 \pm 0.49\%$, respectively. Casein had a significantly higher TD ($p \leq 0.05$) than PRF and PRNF-based beverage with a value of $96.07 \pm 0.76\%$. Actually, an increase of the digestibility is not automatically related to an improvement of the PER (Cruz *et al.*, 2003). Other studies found no correlation between the PER and the digestibility, such as Khattab *et al.* (2009) who analyzed different physical treatments effect on protein quality of legume seeds. Some treatments had increased the TD without increasing the PER and others had the opposite effect (Khattab *et al.*, 2009).

Only few studies had analyzed pea and rice concentrates true digestibility. Several studies have shown that the digestibility of pea protein concentrate is between 92% and 99% (Sarwar *et al.*, 1989; Rutherford *et al.*, 2015) and the digestibility of rice protein concentrate is 88% (Rutherford

et al., 2015). Sarwar *et al.* (1975) found a protein digestibility of 92% for a mixture of 50% rice and 50% peas. Therefore, results of this study are in accordance with the literature. With a TD value approaching 90%, and a demonstration of a high absorption of proteins, a PRF-based beverage can be considered as a product with a high digestibility. Compared to casein, the lower digestibility observed for the two PR-based beverages product can be due to antinutritional compounds present in pea. These compounds, such as trypsin inhibitors or phytates, are often present in pea (Vidal-Valverde *et al.*, 2003). They can interfere with nutrient absorption and therefore affect the protein digestibility (Ekholm *et al.*, 2003).

The PDCAAS is recommended by the FAO and the WHO for protein quality evaluation and has become the reference method in the USA (FAO, 1991). This method takes into account the TD of the protein and the AAS which is the quantity of EAA in the test protein compared to a reference protein given by the FAO. Milk protein (casein) and egg white have the maximum PDCAAS value with a value of 100% (FAO, 1991), whereas pea protein concentrate has PDCAAS between 71% and 89% (Rutherford *et al.*, 2015; Mathai *et al.*, 2017), and rice protein concentrate has a PDCAAS of 42% (Rutherford *et al.*, 2015). The low PDCAAS value of plant-based proteins is mainly due to their low EAA content. By combining legumes and cereals, which are respectively deficient in methionine and in lysine, the intake of EAA can be complete and the global quality of proteins can be improved (FAO, 1991; Kannan *et al.*, 2001; Mensa-Wilmot *et al.*, 2001). In this way, with an AAS of 1.12 (Manus *et al.*, 2020), the PDCAAS of PRF reached the maximum value of 100% and PRNF 99.8% (Table 4). The PDCAAS has been criticized for the fact that values higher than 100% are not accepted and thus are truncated to 100% (Rutherford *et al.*, 2015). This method does not consider additional nutritional benefit given by high quality proteins (PDCAAS values >100%) which can balance the amino acid composition of lower proteins (PDCAAS values <100%) (Schaafsma, 2000).

The corrected level of protein (CLP), corresponding to the product of the protein content of a 98 g bottle of PRF and the PDCAAS of PRF, was 12.74 g, representing 25.5% of the DRV for protein. Therefore, the PRF product would qualify as “excellent source of protein” in the United States (FDA, 2020).

3.3. Probiotic bacteria concentration

To provide health benefits, the viability of the probiotic bacteria must resist and survive in the gastrointestinal tract and in particular to acid and bile stress (Binda *et al.*, 2020). The method of detection used in this study quantifies viable and non-viable bacteria. Nevertheless, results of

Kramer *et al.* (2009) demonstrated that results obtain by real-time PCR for the quantification of *L. acidophilus* didn't differ significantly from those obtain by PMA real-time PCR. Probiotic concentrations of casein, protein-free and PRNF diets were all under the detection limit with a concentration of probiotics <4 log relative CFU/g. The concentration of probiotic in the feces of rats fed with the PRF diet, showed a concentration greater than 7.4 ± 0.1 log relative CFU/g. The result indicates that *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 were in high concentration after the gastrointestinal tract transit conditions of rats with just a one log reduction difference between the concentration of probiotics in the diet and in the feces. The rice-based beverage appeared to be a good probiotic carrier matrix.

4. Conclusion

The PRF-based beverage showed an adjusted PER value of 2.32. However, the fermentation of the PR-based beverage did not significantly improve its digestibility. Still, the combination of pea and rice proteins in the beverage has allowed to reach the maximum PDCAAS value. This beverage would qualify for protein claim as an “excellent source of protein” in the USA and as a “source of protein” in Canada. With good nutritional values and high probiotic digestion survival, the functional PRF-based beverage provides health benefits and is a great source of protein.

Acknowledgments

This research was supported by the Ministry of Economy and Innovation (MEI) of the province of Québec, Canada, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and by Bio-K Plus, a division of Kerry Group (Laval, Québec, Canada). Bio-K Plus is also acknowledged for providing Bio-K+ beverages and for supplying pea and rice proteins. The authors thank Fettah Rezzouk and Meriem Haddi for their technical support for the preparation of beverages.

Conflicts of interest

M. M. is paid employee of Bio-K Plus.

References

- Acevedo-Pacheco, L., & Serna-Saldivar, S. O. (2016). *In vivo* protein quality of selected cereal-based staple foods enriched with soybean proteins. *Food & Nutrition Research*, 60(1), 31382.
- AOAC. (2000). Method 991.20. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International, 17th ed. AOAC International: Gaithersburg, ML.
- AOAC. (2000). Method 960.48. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International, 17th ed. AOAC International: Gaithersburg, ML.
- Ashraf, R., & Shah, N. P. (2014). Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 938–956.
- Baldwin, C., Millette*, M., Oth, D., Ruiz, M. T., Luquet, F. M., & Lacroix, M. (2010). Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei* mix sensitize colorectal tumoral cells to 5-fluorouracil-induced apoptosis. *Nutrition and Cancer*, 62(3), 371-378.
- Beausoleil, M., Fortier, N., Guénette, S., L'Ecuyer, A., Savoie, M., Franco, M., ... & Weiss, K. (2007). Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* CL1285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 21(11), 732-736.
- Berrazaga, I., Mession, J. L., Laleg, K., Salles, J., Guillet, C., Patrac, V., ... & Husson, F. (2019). Formulation, process conditions, and biological evaluation of dairy mixed gels containing fava bean and milk proteins: Effect on protein retention in growing young rats. *Journal of Dairy Science*, 102(2), 1066-1082.
- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., ... & Ouwehand, A. C. (2020). Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1662.
- Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R., & Burlingame, B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S183-S211.
- Canadian Food Inspection Agency. (2019). Specific nutrient content claim requirements, Protein claims. <https://www.inspection.gc.ca/food-label-requirements/labelling/industry/nutrient-content/specific-claim-requirements/eng/1389907770176/1389907817577?chap=3> (accessed online April 1, 2020).
- Canadian Food Inspection Agency. (2018). Elements within the Nutrition Facts Table, Protein. <https://www.inspection.gc.ca/food-label-requirements/labelling/industry/nutrition-labelling/elements-within-the-nutrition-facts-table/eng/1389206763218/1389206811747?chap=7> (accessed online May 10, 2020).
- Chabot, S., Yu, H. L., De Léséleuc, L., Cloutier, D., Van Calsteren, M. R., Lessard, M., ... & Oth, D. (2001). Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes. *Le Lait*, 81(6), 683-697.

Chapman, D. G., Castillo, R., & Campbell, J. A. (1959). Evaluation of protein in foods: 1. A method for the determination of protein efficiency ratios. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(5), 679-686.

Cruz, G. A. D. R., Oliveira, M. G. D. A., Pires, C. V., Gomes, M. R. D. A., Costa, N. M. B., Brumano, M. H. N., & Moreira, M. A. (2003). Protein Quality and *in Vivo* Digestibility of Different Varieties of Bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Brazilian Journal of Food Technology*, 2, 157-162.

de Boer, J., Schösler, H., & Aiking, H. (2017). Towards a reduced meat diet: Mindset and motivation of young vegetarians, low, medium and high meat-eaters. *Appetite*, 113, 387-397.

De Léséleuc, L., Chabot, S., Cloutier, D., Roy, D., Lacroix, M., & Oth, D. (2002). Quantitative aspects in pro-inflammatory cytokines and gamma interferon (IFN- γ) production capacities among various lactic acid bacteria (LAB). *Milchwissenschaft*, 57(6), 316-319.

Desrouillères, K., Millette, M., Vu, K. D., Touja, R., & Lacroix, M. (2015). Cancer preventive effects of a specific probiotic fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 on male F344 rats treated with 1, 2-dimethylhydrazine. *Journal of Functional Foods*, 17, 816-827.

Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007). Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and *in vitro* angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Le Lait*, 87(1), 21-38.

Ekholm, P., Virkki, L., Ylinen, M., & Johansson, L. (2003). The effect of phytic acid and some natural chelating agents on the solubility of mineral elements in oat bran. *Food Chemistry*, 80(2), 165–170.

Elango, R., Ball, R. O., & Pencharz, P. B. (2009). Amino acid requirements in humans: with a special emphasis on the metabolic availability of amino acids. *Amino acids*, 37(1), 19.

EI-Niely, H. F. (2007). Effect of radiation processing on antinutrients, *in-vitro* protein digestibility and protein efficiency ratio bioassay of legume seeds. *Radiation Physics and Chemistry*, 76(6), 1050-1057.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1991). *Protein Quality Evaluation: Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation-Bethesda, MD 4-8 December 1989*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FDA - U.S. Food and Drug Administration and Department of Health and Human Services. (2020). Nutrient content claims for “good source,” “high,” “more,” and “high potency.” 21 CFR, Part 101, Subpart D, Section 101.54. Electronic Code of Federal Regulations. www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=&SID=bad23c28ebd662323b3ace1e3f5ee94f&mc=true&n=pt21.2.101&r=PART&ty=HTML#se21.2.101_154. (accessed online June 1, 2020)

Friedman, M. (1996). Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 6-29.

Gao, X. W., Mubasher, M., Fang, C. Y., Reifer, C., & Miller, L. E. (2010). Dose–Response Efficacy of a Proprietary Probiotic Formula of *Lactobacillus acidophilus* CL1285 and *Lactobacillus casei* LBC80R for Antibiotic-Associated Diarrhea and *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea Prophylaxis in Adult Patients. *American Journal of Gastroenterology*, 105(7), 1636-1641.

- Ghavidel, R. A., & Prakash, J. (2007). The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. *LWT-Food Science and Technology*, 40(7), 1292-1299.
- Gilani, G. S., Xiao, C. W., & Cockell, K. A. (2012). Impact of antinutritional factors in food proteins on the digestibility of protein and the bioavailability of amino acids and on protein quality. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S315-S332.
- Gilani, G. S., & Lee, N. (2003). PROTEIN| Quality. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 4847-4854.
- Gómez-Guzmán, M., Toral, M., Romero, M., Jiménez, R., Galindo, P., Sánchez, M., ... & Duarte, J. (2015). Antihypertensive effects of probiotics *Lactobacillus* strains in spontaneously hypertensive rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(11), 2326-2336.
- Health Canada. (1981). Determination of protein rating, Official method FO-1. Health Protection Branch, Ottawa, Canada.
- House, J. D., Neufeld, J., & Leson, G. (2010). Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa L.*) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22), 11801-11807.
- Hughes, G. J., Ryan, D. J., Mukherjea, R., & Schasteen, C. S. (2011). Protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS) for soy protein isolates and concentrate: Criteria for evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12707-12712.
- Johnston, B. C., Goldenberg, J. Z., Vandvik, P. O., Sun, X., & Guyatt, G. H. (2011). Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (11).
- Joy, J. M., Lowery, R. P., Wilson, J. M., Purpura, M., Souza, E. O. D., Wilson, S. M., Kalman, D. S., Dudeck, J. E., Jäger, R. (2013). The effects of 8 weeks of whey or rice protein supplementation on body composition and exercise performance. *Nutrition Journal*, 12(1), 12–86.
- Kannan, S., Nielsen, S. S., & Mason, A. C. (2001). Protein digestibility-corrected amino acid scores for bean and bean– rice infant weaning food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 5070-5074.
- Khattab, R. Y., Arntfield, S. D., & Nyachoti, C. M. (2009). Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments, Part 1: Protein quality evaluation. *LWT-food Science and Technology*, 42(6), 1107-1112.
- Kiers, J. L., Rombouts, F. M., & Nout, M. J. R. (2000). *In vitro* digestibility of Bacillus fermented soya bean. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2-3), 163-169.
- Kramer, M., Obermajer, N., Matijašić, B. B., Rogelj, I., & Kmetec, V. (2009). Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(6), 1137-1147.
- Lacroix, M., Amiot, J., Brisson, J. (1983) Hydrolysis and ultrafiltration treatment to improve the nutritive value of rapeseed proteins. *Journal of Food Science*, 48 (6), 1644-1645.

Leidy, H. J., Clifton, P. M., Astrup, A., Wycherley, T. P., Westerterp-Plantenga, M. S., Luscombe-Marsh, N. D., ... & Mattes, R. D. (2015). The role of protein in weight loss and maintenance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101(6), 1320S-1329S.

Manus, J., Millette, M., Aguilar Uscanga, B. R., Salmieri, S., Maherani, B., Lacroix, M. (2020). *In vitro* protein digestibility and physico-chemical properties of lactic acid bacteria fermented beverages enriched with plant proteins. *Journal of Food Science*. (Submitted for publication).

Mathai, J. K., Liu, Y., & Stein, H. H. (2017). Values for digestible indispensable amino acid scores (DIAAS) for some dairy and plant proteins may better describe protein quality than values calculated using the concept for protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS). *British Journal of Nutrition*, 117(4), 490-499.

McFarland, L. V., Johnson, S., & Evans, C. T. (2020). Perils and pitfalls of probiotic quasi-experimental studies for primary prevention of *Clostridioides difficile* infection: A review of the evidence. *American Journal of Infection Control*.

McFarland, L. V., Ship, N., Auclair, J., & Millette, M. (2018). Primary prevention of *Clostridium difficile* infections with a specific probiotic combining *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, and *L. rhamnosus* strains: assessing the evidence. *Journal of Hospital Infection*, 99(4), 443-452.

McFarland, L. V. (2007). Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 5(2), 97-105.

McKinsey & Company. (2019). Alternative proteins: The race for market share is on. <https://www.mckinsey.com/industries/agriculture/our-insights/alternative-proteins-the-race-for-market-share-is-on> (Accessed online February 02, 2020)

Mekonnen, S. A., Merenstein, D., Fraser, C. M., & Marco, M. L. (2020). Molecular mechanisms of probiotic prevention of antibiotic-associated diarrhea. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 226-234.

Mensa-Wilmot, Y., Phillips, R., & Hargrove, J. (2001). Protein quality evaluation of cowpea-based extrusion cooked cereal/legume weaning mixtures. *Nutrition Research*, 21(6), 849-857.

Oak, S. J., & Jha, R. (2019). The effects of probiotics in lactose intolerance: a systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(11), 1675-1683.

Osimani, A., Milanović, V., Cardinali, F., Roncolini, A., Garofalo, C., Clementi, F., ... & Zamporlini, F. (2018). Bread enriched with cricket powder (*Acheta domesticus*): A technological, microbiological and nutritional evaluation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, 150-163.

Owusu-Ansah, Y. J., & McCurdy, S. M. (1991). Pea proteins: a review of chemistry, technology of production, and utilization. *Food Reviews International*, 7(1), 103-134.

Phillips, S. M., & Van Loon, L. J. (2011). Dietary protein for athletes: from requirements to optimum adaptation. *Journal of Sports Sciences*, 29(sup1), S29-S38.

Raveschot, C., Cudennec, B., Coutte, F., Flahaut, C., Fremont, M., Drider, D., & Dhulster, P. (2018). Production of Bioactive Peptides by *Lactobacillus* Species: From Gene to Application. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2354.

- Robles-Vera, I., Toral, M., Romero, M., Jiménez, R., Sánchez, M., Pérez-Vizcaíno, F., & Duarte, J. (2017). Antihypertensive effects of probiotics. *Current Hypertension Reports*, 19(4), 26.
- Rutherford, S. M., Fanning, A. C., Miller, B. J., & Moughan, P. J. (2015). Protein digestibility-corrected amino acid scores and digestible indispensable amino acid scores differentially describe protein quality in growing male rats. *The Journal of Nutrition*, 145(2), 372-379.
- Sampalis, J., Psaradellis, E., & Rampakakis, E. (2010). Efficacy of BIO K+ CL1285® in the reduction of antibiotic-associated diarrhea—a placebo controlled double-blind randomized, multi-center study. *Archives of Medical Science: AMS*, 6(1), 56.
- Sarwar, G., & Mcdonough, F. E. (1990). Evaluation of protein digestibility-corrected amino acid score method for assessing protein quality of foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 73(3), 347-356.
- Sarwar, G., Peace, R. W., Botting, H. G., & Brulé, D. (1989). Digestibility of protein and amino acids in selected foods as determined by a rat balance method. *Plant Foods for Human Nutrition*, 39(1), 23-32.
- Sarwar, G., Sosulski, F. W., & Holt, N. W. (1975). Protein nutritive value of legume-cereal blends. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 8(4), 170-174.
- Schaafsma, G. (2000). The protein digestibility-corrected amino acid score. *The Journal of Nutrition*, 130(7), 1865S-1867S.
- Singh, P., Kumar, R., Sabapathy, S. N., & Bawa, A. S. (2008). Functional and edible uses of soy protein products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(1), 14-28.
- Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B. and Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—a review. *Appetite*, 51:456-467.
- Subirade, M., Gueguen, J., Pézolet, M. (1994) Conformational changes upon dissociation of a globular from pea: A fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochimica et Biophysica Acta*. 13, 1205 (2) 239-247.
- Tomé, D. (2013). Digestibility issues of vegetable versus animal proteins: Protein and amino acid requirements—Functional aspects. *Food and Nutrition Bulletin*, 34(2), 272-274.
- Vidal-Valverde, C., Frias, J., Hernández, A., Martín-Alvarez, P. J., Sierra, I., Rodríguez, C., ... & Vicente, G. (2003). Assessment of nutritional compounds and antinutritional factors in pea (*Pisum sativum*) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(4), 298-306.
- Wang, H. L., Ruttle, D. I., & Hesseltine, C. W. (1968). Protein quality of wheat and soybeans after *Rhizopus oligosporus* fermentation. *The Journal of Nutrition*, 96(1), 109-114.
- Wang, S., Yang, L., Lu, J., & Mu, Y. (2015). High-protein breakfast promotes weight loss by suppressing subsequent food intake and regulating appetite hormones in obese Chinese adolescents. *Hormone Research in Paediatrics*, 83(1), 19-25.
- Wolfe, R. R., Miller, S. L., & Miller, K. B. (2008). Optimal protein intake in the elderly. *Clinical nutrition*, 27(5), 675-684.

World Health Organization. (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. Geneva: WHO Press.

Yan, F., & Polk, D. B. (2011). Probiotics and immune health. *Current Opinion in Gastroenterology*, 27(6), 496.

Lien entre les chapitres 4 et 5

Le chapitre 4 a permis de déterminer plusieurs éléments déterminant la qualité protéique de la boisson PRF (CEP, TD, PDCAAS). Le chapitre 5 « Propriétés physico-chimiques et appréciation sensorielle d'une nouvelle boisson probiotique fermentée enrichie en protéines de pois et de riz » traite des caractéristiques physico-chimiques, ainsi que de l'acceptation sensorielle du produit, et la viabilité des probiotiques au cours de l'entreposage.

CHAPITRE 5: PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND SENSORIAL APPRECIATION OF A NEW FERMENTED PROBIOTIC BEVERAGE ENRICHED WITH PEA AND RICE PROTEINS

Manus, J.^a, Millette, M.^b, Aguilar-Uscanga, B. R.^c, Salmieri, S.^a, Lacroix, M.^{a*}.

Propriétés physico-chimiques et appréciation sensorielle d'une nouvelle boisson probiotique fermentée enrichie avec des protéines de pois et de riz.

L'article a été soumis au journal « LWT - Food Science and Technology » le 16 décembre 2020.

Contribution des auteurs

Johanne Manus a réalisé les manipulations et la rédaction de l'article.

Mathieu Millette a supervisé la recherche, fourni du matériel et participé à la correction de l'article.

Stéphane Salmieri a aidé aux tests statistiques.

Blanca Rosa Aguilar Uscanga a supervisé la recherche et a participé à la correction de l'article.

Monique Lacroix a été la directrice de recherche et la coordinatrice de ce projet de recherche. Elle a participé à la planification des expériences et à la correction de l'article.

Résumé

Le but de cette étude était d'évaluer la stabilité physico-chimique, les propriétés sensorielles et la qualité microbienne d'une boisson fermentée enrichie en protéines de pois et de riz (PRF) pendant l'entreposage à 4 °C. Afin de déterminer l'effet de la fermentation et de l'enrichissement en protéines, la qualité de la boisson PRF a été comparée à celle des boissons non fermentées et non enrichies. Les résultats ont montré que l'enrichissement en protéines induisait une augmentation du pH, de l'acidité titrable et de la viscosité des produits PR. La fermentation a conduit à une diminution du pH et de la viscosité. Cependant, une augmentation significative de la viscosité de PRF de 39 à 57 cP a été observée pendant les 143 jours d'entreposage ($p \leq 0.05$). La boisson PRF contenait beaucoup plus de peptides <200 Da que la boisson non fermentée (PRNF) et ces petits peptides ont également été libérés pendant l'entreposage. Malgré les modifications physico-chimiques, les propriétés sensorielles du produit PRF ont été appréciées pendant l'entreposage, en particulier la texture. De plus, la boisson a conservé une forte concentration de probiotiques viables pendant toute la durée de l'entreposage, avec 8,4 log/ml après 143 jours.

Mots-clés

Fermentation; *Lactobacillus*; Protéines végétales; Probiotique; Boisson de riz; Analyses alimentaires.

Physico-chemical properties and sensorial appreciation of a new fermented probiotic beverage enriched with pea and rice proteins

Manus, J.^a, Millette, M.^b, Aguilar-Uscanga, B. R.^c, Salmieri, S.^a, Lacroix, M.^{a*}.

^a Research Laboratories in Sciences Applied to Food, Canadian Irradiation Center, INRS Institut Armand-Frappier, Health and Biotechnology Centre, Institute of Nutrition and Functional Foods, 531 des Prairies blvd, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada.

^b Bio-K Plus, a division of Kerry group, 495 Armand-Frappier blvd, Laval, Québec, H7V 4B3, Canada.

^c Research Laboratory of Industrial Microbiology. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara. 1421, Blvd. Marcelino Garcia Barragan. Col. Olímpica, 44430. Guadalajara, Jalisco, Mexico.

* Corresponding author. Dr. Monique Lacroix, Email: Monique.Lacroix@inrs.ca.
Tel: 450-687-5010 # 4489, Fax: 450-686-5501.

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the physico-chemical stability, the sensorial properties and the microbial quality of a fermented beverage enriched with pea and rice proteins (PRF) during storage at 4 °C. In order to determine the effect of the protein enrichment and of the fermentation, the PRF beverage quality was compared with non-fermented and non-enriched beverages. Results showed that the enrichment in protein induced an increased of the pH, of the titratable acidity and of the viscosity of the PR products. The fermentation led to a decrease of the pH and of the viscosity. However, a significant increase of the viscosity of PRF from 39 to 57 cP was observed during the 143 days of storage ($p \leq 0.05$). The PRF beverage contained significantly more peptides <200 Da than the non-fermented one (PRNF) and these small peptides were also released during the storage. Despite the physico-chemical modifications, the sensorial properties of the PRF product were appreciated over the storage, particularly for the texture. Furthermore, the beverage maintained a high concentration of viable probiotics during the entire storage with 8.4 log/mL after 143 days.

Keywords:

Fermentation; *Lactobacillus*; Plant-based protein; Probiotic; Rice beverage; Food analysis.

1. Introduction

Functional foods, like probiotic products and protein-enriched foods, are increasingly popular among consumers of western countries. Probiotics are defined as “live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” (Hill *et al.*, 2014). Many health benefits are attributed to probiotic bacteria, such as the prevention of diarrhea due to *Clostridioides difficile* (Kullar *et al.*, 2020), traveler’s diarrhea (McFarland, 2007) and antibiotic-associated diarrhea (Lia *et al.*, 2020), the reduction of irritable bowel syndrome symptoms (Didari *et al.*, 2015) and a general modulation of the immune system (De Léséleuc *et al.*, 2002; Chabot *et al.*, 2010; Ashraf & Shah, 2014). On the other hand, products enriched with protein provide a high protein intake and most of the time are low in fat and sugar. For these reasons, they are mainly consumed and appreciated by athletes and individuals following a calorie-restrictive diet. Also, these products can be an interesting source of protein for elderly individuals by increasing their protein intake to reduce their risk of frailty (Tieland *et al.*, 2012) and increase their body mass and strength (Børsheim *et al.*, 2008). Generally, probiotic and protein-enriched foods are found as dairy products beverages such as drinkable yoghurt or milk, and whey which is mainly used to enrich products with protein. However, because of veganism, lactose intolerance or environmental consciousness, a growing number of consumers are looking for substitutes, like plant-based proteins. Because of their non-allergenicity, pea and rice proteins are good alternatives to whey (Health Canada, 2018) and they have a low environmental impact (Zentner *et al.*, 2004; Chapagain & Hoekstra, 2011). Moreover, pea and rice proteins are comparable to whey concerning their beneficial effect on muscle strength and thickness (Joy *et al.*, 2013; Babault *et al.*, 2015). However, in contrast to casein, these proteins lack certain essential amino acids (EAA) (Tomé, 2013). The combination of cereals and legumes, respectively deficient in lysine and methionine, leads to a mixture of proteins complete in EAA (Kannan *et al.*, 2001). This solution is used to compensate for the lack of EAA in plant-based proteins. Nevertheless, a complete amino acid composition is not synonymous with good protein absorption or digestibility and vice versa. However, rice and pea protein isolates are known to have a high digestibility ranging from 92 and 99% for pea protein concentrate and 88% for rice protein concentrate (Sarwar *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1999; Rutherford *et al.*, 2015). Furthermore, bacteria of the genus *Lactobacillus* spp. are able to hydrolyze proteins and generate peptides and amino acids that are more readily absorbed compared to native protein (Grimble, 1994; Matar *et al.*, 1996; Raveschot *et al.*, 2018). Thus, the hydrolysis of proteins through fermentation can improve their digestibility and their absorption (Clemente, 2000; Koopman *et al.*, 2009).

The enrichment in proteins and the storage time can change significantly the physicochemical and the sensorial properties of fermented beverages. Therefore, the objective of this study was to develop a functional probiotic beverage enriched with pea and rice protein and to evaluate the physicochemical properties, the microbial quality and the sensorial characteristics over the entire storage period at 4 °C for 143 days. The effect of the protein enrichment and of the fermentation were also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

A commercial probiotic beverage (Bio-K+™ Blueberry), Bio-K+™ ferment (composed of *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactocaseibacillus (Lactobacillus) casei* LBC80R and *Lactocaseibacillus (Lactobacillus) rhamnosus* CLR2), organic pea protein concentrate containing 80% protein (w/w) (Fying, Riverside, CA, USA) and organic brown rice protein containing 80% protein (w/w) (Fying) were kindly supplied by Bio-K Plus, a division of Kerry Group (Laval, Québec, Canada).

2.2. Preparation of the beverages

In order to analyze the effect of the fermentation, fermented beverages enriched with pea and rice protein (PRF) were prepared as well as non-fermented beverages enriched with pea and rice protein (PRNF). In addition, fermented and non-fermented commercial Bio-K+™ Blueberry (CF and CNF respectively) were also evaluated as non-enriched control beverages. All the ingredients in powder form of Bio-K+™ Blueberry, plus a 50/50 blend of pea and brown rice protein concentrates, were weighed and hydrated with filtered water. The PR-based beverages contained pea and rice proteins at a total protein content of 13% whereas the CF and CNF beverages contained only rice proteins for a total protein content of 3%. The beverages were then pasteurized at 90 ± 2 °C for 60 sec, packaged in 98 g pots, sealed, and then cooled to 37 °C. To produce the fermented beverages, a part of the beverages was inoculated with Bio-K+™ ferment at 10^8 CFU/mL, incubated at 37 ± 1 °C for 14 ± 2 h, and cooled to 4 °C.

2.3. Product characterization

The pH of samples was measured with a pH meter (Fisher Scientific, MA, USA). The titratable acidity (TA), expressed as % lactic acid, was determined by the titration method with 0.1 N NaOH solution, according to AOAC Official Method 942.15 (2000). The viscosity was evaluated with a

Brookfield DV-II viscometer (Brookfield Engineering, MA, USA). Due to the large variation of viscosity between beverages, measures of viscosity were made at 4 °C at 100 rpm with spindle 00 for non-enriched drinks (CF and CNF) and at 20 rpm with spindle 02 for protein-enriched drinks (PRF and PRNF). Color parameters were determined with a Color reader CR 10 (Konica Minolta Sensing, Inc, Mahwah, NJ, USA) and expressed as L^* (lightness), C^* (chroma), h^* (hue angle) values. The color difference (ΔE) of the products from the beginning to the end of the storage was calculated as follows:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Where a^* value is the green-red axis, b^* value is the blue-yellow axis and the L^* value is the lightness from white to black.

All parameters were determined during the storage at 4 °C, every 21 days for 143 days, based on the storage duration of the commercialized control beverage.

2.4. Determination of peptide molecular weight distribution by Size Exclusion-High Performance Liquid Chromatography (SEC-HPLC)

Molecular weight distribution of soluble fractions of fermented and non-fermented beverages were analyzed by size exclusion HPLC. A Biosep-SEC 2000 column (300 × 7.8 mm, 5 mm particle size, pore size 145 Å) from Phenomenex (Torrance, CA, USA) connected to an Agilent 1260 HPLC Infinity system (Agilent Technologies, Saint-Laurent, QC, Canada) was used. Samples were first centrifuged at 10,000 × g for 20 min at room temperature. Then, a 0.2 µm filtered supernatant sample of 10 µL was injected on the column, and eluted using 100 mM of sodium phosphate buffer solution (pH 6.8) at a flow rate of 1 mL/min for 20 min. Detection was then performed using a diode array detector at 280 nm. Bovine thyroglobulin (670 kDa), IgA (300 kDa), IgG (150 kDa), ovalbumin (44 kDa), myoglobin (17 kDa) and uridine (244.2 Da) were used as standards. The total surface area of chromatograms of peptide profiles was integrated and separated into three ranges of molecular weight (>2,700 Da, high molecular weight; 200-2,700 Da, medium molecular weight; <200 Da, low molecular weight), expressed as a percentage of the total area. Analysis of peptide profiles were done on fermented and non-fermented control and PR-based beverages every 21 days during storage at 4 °C for 143 days.

2.5. Microbial analysis

Total viable count of *Lactobacillus* spp. was determined by spread plate method on MRS agar. The plates were incubated at 37 °C for 48 h. Analyses were done during storage at 4 °C every 21 days for 143 days.

2.6. Sensory analysis

The fermented control and PR beverages were tested at days 0, 42 and 84 of storage. Sensorial analysis was performed with 10 evaluators using a 9-point hedonic scale (1 = extremely unpleasant and 9 = extremely good) (Maherani *et al.*, 2019). The parameters of color/appearance, odor, texture, flavor and overall appreciation were assessed.

2.7. Statistical analysis

The experiment was done in triplicate and for each replicate, three samples were analyzed. The data were reported as mean \pm standard deviation. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) by SPSS 22.0 software (IBM, NY, USA). Differences among mean values were examined by the Duncan's multiple comparison test at a $p \leq 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Physico-chemical analysis

The pH results presented in **Figure 3** showed that a pH of 6.2 was maintained throughout the storage period for the non-fermented beverages (CNF and PRNF) (data not shown). The pH of PRF beverage was higher than the one obtained for the CF beverage during the entire storage period ($p \leq 0.05$). The results of the pH of PRF and CF-based beverages showed a decrease from 4.9 to 3.8 and from 4.2 to 3.4, respectively, during the entire storage period. The rate of pH decrease was higher for the PRF beverage than for the CF beverage with slope values of -0.024 and -0.010, respectively. After 42 days of storage, a little decrease from pH 4.0 to 3.8 was

observed for the PRF beverage. A stabilisation of pH was also observed for the CF beverage, after 84 days of storage, with a pH of 3.4 ($p > 0.05$).

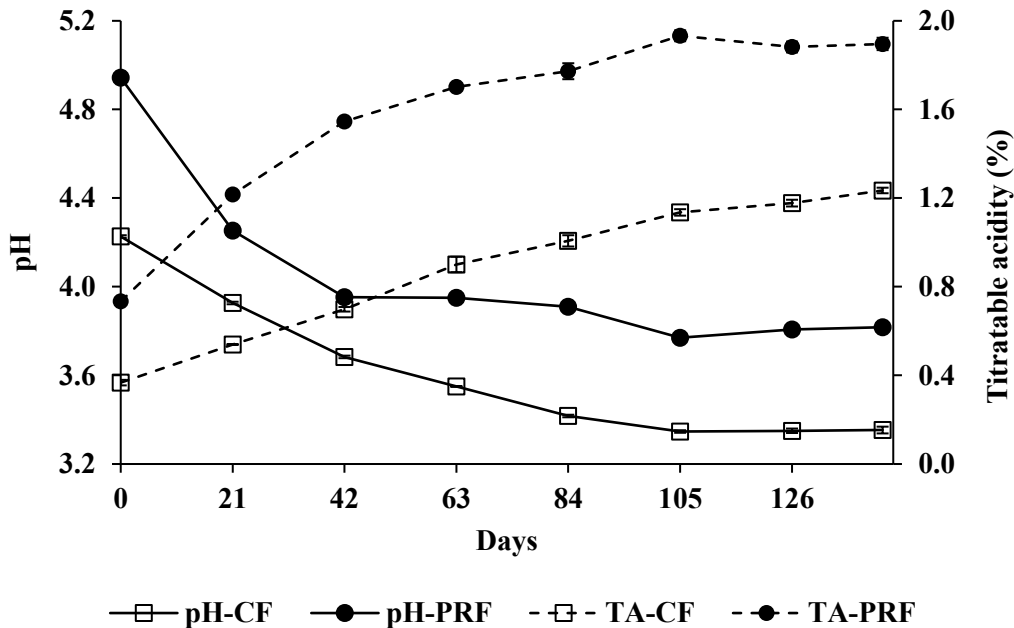


Figure 3—pH and titratable acidity (%) of fermented control beverage (CF) and fermented pea-rice beverage (PRF) during storage at 4 °C for 143 days.

The titratable acidity (TA) results in **Figure 3** showed that the TA of PRNF was three times higher than the TA of CNF with values of 0.3% and 0.1%, respectively (data not shown) and both were stable during the entire storage period ($p > 0.05$). Also, the TA of PRF increased from 0.73% to 1.70% from day 0 to day 63, then, a stabilisation to 1.90% was observed until day 143. Conversely, the TA of CF increased linearly during the whole storage period, from 0.37% to 1.23%. Similarly to the results obtained for pH, the slope of the PRF beverage was higher than the slope of the CF beverage with values of 0.015 and 0.006, respectively.

The pH and the TA are both involved in the measurement of the acidity of the product but they provide different information. The pH is related to the dissociation capacity of acids present in food and the TA value corresponds to the total quantity of acids (Tyl & Sadler, 2017). The higher pH of the PRF beverage compared to the CF beverage could be related to a buffering effect of the proteins whilst its higher TA corresponds to a higher lactic acid concentration. Pereiral *et al.* (2015) observed that the enrichment of a probiotic drink with whey protein increased the TA from 3.0 to 7.7% while the pH remained stable.

The addition of proteins also increased significantly the viscosity from 3.8 cP for CF to 39.1 cP for PRF ($p \leq 0.05$) (Table 9). The protein enrichment increased the total solids content of the beverages (Manus *et al.*, 2020) and the viscosity increased with the level of solids and the protein content (Urbanski *et al.*, 1982; Oliveira *et al.*, 2001; Ringgenberg *et al.*, 2012).

Table 9–Effect of the storage at 4 °C on the viscosity (cP) of CNF, CF, PRNF and PRF beverages.

Days of storage	Viscosity (cP)			
	CNF	CF	PRNF	PRF
0	4.0 ± 0.2 ^{aA}	3.8 ± 0.1 ^{aA}	83.7 ± 1.6 ^{aB}	39.1 ± 2.2 ^{aA}
21	4.1 ± 0.2 ^{aA}	4.2 ± 0.2 ^{bA}	96.7 ± 1.7 ^{bB}	37.4 ± 2.2 ^{aA}
42	4.6 ± 0.1 ^{bA}	4.5 ± 0.1 ^{cdA}	145.3 ± 2.3 ^{cb}	47.3 ± 0.8 ^{bA}
63	4.8 ± 0.4 ^{bB}	4.4 ± 0.1 ^{bcA}	148.7 ± 1.5 ^{cb}	53.4 ± 1.8 ^{ca}
84	5.8 ± 0.2 ^{dB}	5.2 ± 0.3 ^{eA}	156.2 ± 5.1 ^{cdB}	47.4 ± 1.4 ^{bA}
105	5.3 ± 0.3 ^{cb}	4.4 ± 0.1 ^{bcA}	164.8 ± 12.6 ^{dB}	58.7 ± 2.2 ^{deA}
126	5.1 ± 0.1 ^{cb}	4.5 ± 0.3 ^{cdA}	157.5 ± 11.8 ^{cdB}	61.4 ± 3.4 ^{eA}
143	4.7 ± 0.1 ^{bA}	4.8 ± 0.2 ^{dA}	148.5 ± 2.4 ^{cb}	57.0 ± 2.1 ^{cdA}

CNF: non-fermented control beverage. CF: fermented control beverage. PRNF: non-fermented pea-rice beverage. PRF: fermented pea-rice beverage. Mean values with different lowercase letters within the same column are significantly different ($p \leq 0.05$). Mean values with different uppercase letters within the same row for the same base product are significantly different ($p \leq 0.05$).

Fermentation had a large effect on the viscosity of PR beverage by reducing it 2-3 fold. For example, the viscosity of PRNF beverage at day 0 was 83.7 cP, compared to 39.1 cP for PRF beverage.

The storage time had a slight effect on the viscosity of control beverages. Values from 4.0 to 4.7 cP was observed over time for the CNF beverage and values from 3.8 to 4.8 cP for the CF beverage. However, the PR-based beverages showed an important increase in viscosity during the storage time. From day 0 to day 143, the viscosity of PRNF and PRF beverages increased from 83.7 to 148.5 cP and from 39.1 to 57.0 cP, respectively.

The effect of fermentation on the decrease of the viscosity after fermentation can be due to the hydrolysis of protein by bacterial enzymes reducing the molecular size of proteins and peptides, leading to more soluble peptides. Hayta *et al.* (2001), also observed an increase of the protein solubility of fermented boza (a cereal-based beverage) during fermentation and a lower viscosity of fermented boza compared to the same non-fermented boza. Lactic acid bacteria (LAB) can hydrolyze protein and peptides into small peptides and free amino acids (Raveschot *et al.*, 2018).

Manus *et al.* (2020), observed a greater effect of hydrolysis of peptides, due to lactic acid fermentation, for beverages enriched in pea and rice proteins than for non-enriched beverages, resulting in a release of small peptides <200 Da.

Viscosity of PR-based beverages during storage showed an increase of 77% and 46% for PRNF and PRF beverages, respectively, as compared to an increase of 17% and 26% for CNF and CF beverages, respectively. Bernat *et al.* (2014) observed a significant increase ($p \leq 0.05$) of the apparent viscosity of a fermented hazelnut-based milk for 28 days of storage passing from 0.69 Pa.s at day 0 to 1.8 Pa.s at the end of the storage. The increase in viscosity during storage can be due to molecular interactions like polysaccharide-polysaccharide interactions or protein-polysaccharide interactions present in PR proteins (Deshpande *et al.*, 2008; Paquet *et al.*, 2014).

The impact of protein enrichment and of fermentation on the beverage color are presented in **Table 10**. The color of the beverage is characterized by three parameters. The L^* value represents lightness (100) and blackness (0); C^* value corresponds to the chroma (+: high color intensity; -: low color intensity) and h^* value corresponds to hue angle (0°: red, 90°: yellow, 180°: green, 270°: blue) (Pathare *et al.*, 2013). The results showed an increase of the L^* value after fermentation in all samples and a decrease of the L^* value after addition of proteins. The enrichment in protein led to an enrichment in particles in the beverage that obstruct the scattering of light. An increase in clarity after the fermentation process was observed and could be due to protein denaturation caused by the increase in acidity during fermentation (Barbut, 2010). The L^* value increased from 38.0 to 43.0 in CNF and CF and from 34.0 to 39.7 in PRNF and PRF, respectively. The L^* value during storage time showed that the clarity of all beverages was mostly stable during the entire storage period. For example, in PRF, the L^* value increased slightly from 39.7 at day 0 to 41.2 at day 143 ($p > 0.05$). The fermentation increased the chroma values meaning that the intensity of the color of fermented products was higher than the non-fermented. The chroma values increased from around 13 for non-fermented beverages to 16 for fermented beverages. Also, the storage time did not affect the chroma values of all samples. The fermentation did not affect the hue values but the enrichment in protein had an impact on the hue values. The hue values were significantly higher ($p \leq 0.05$) in control beverages as compared to the PR-based beverages, showing values between 78 and 81 and between 72 and 75, respectively. Thus, the color of control beverages was closer to yellow while values of PR beverages were closer to orange. The hue values were also stable in all samples during storage with only small variations respectively.

Table 10—Effect of the storage at 4 °C on the color of CNF, CF, PRNF and PRF beverages.

Days	CNF	CF	PRNF	PRF
------	-----	----	------	-----

0	<i>L</i>	38.0 ± 0.8 ^{bcB}	43.0 ± 1.0 ^{abC}	34.0 ± 2.0 ^{abA}	39.7 ± 0.2 ^{bB}
	<i>C</i>	12.3 ± 0.7 ^{abA}	15.0 ± 0.9 ^{abBC}	13.3 ± 2.0 ^{aAB}	17.1 ± 0.7 ^{bcC}
	<i>h</i>	80.1 ± 0.4 ^{cB}	81.2 ± 2.7 ^{bB}	73.8 ± 1.1 ^{aA}	72.3 ± 0.4 ^{aA}
21	<i>L</i>	35.3 ± 2.4 ^{aAB}	42.3 ± 0.8 ^{aC}	32.8 ± 0.8 ^{aA}	36.3 ± 0.8 ^{aB}
	<i>C</i>	13.6 ± 0.8 ^{bA}	17.1 ± 0.8 ^{cB}	12.4 ± 0.9 ^{aA}	18.2 ± 1.0 ^{cB}
	<i>h</i>	78.2 ± 1.4 ^{bB}	78.4 ± 0.6 ^{aB}	73.7 ± 0.3 ^{aA}	73.4 ± 0.3 ^{bA}
42	<i>L</i>	39.3 ± 1.9 ^{cB}	44.8 ± 1.7 ^{bC}	35.6 ± 0.8 ^{bcA}	40.9 ± 1.5 ^{bB}
	<i>C</i>	13.6 ± 1.2 ^{bA}	16.2 ± 1.0 ^{bcB}	13.4 ± 0.7 ^{aA}	16.3 ± 0.6 ^{abB}
	<i>h</i>	78.1 ± 0.7 ^{bB}	79.3 ± 1.1 ^{abB}	73.8 ± 0.7 ^{aA}	74.2 ± 0.7 ^{cdA}
63	<i>L</i>	36.9 ± 0.1 ^{abB}	42.0 ± 0.6 ^{aD}	34.3 ± 0.8 ^{abA}	39.8 ± 0.2 ^{bcC}
	<i>C</i>	12.5 ± 0.6 ^{abA}	14.8 ± 0.3 ^{aB}	12.5 ± 0.4 ^{aA}	15.5 ± 0.9 ^{aB}
	<i>h</i>	76.6 ± 0.2 ^{aB}	78.8 ± 0.6 ^{aC}	73.4 ± 0.3 ^{aA}	73.7 ± 0.2 ^{bcA}
84	<i>L</i>	37.6 ± 0.7 ^{bcA}	43.0 ± 1.3 ^{abC}	37.1 ± 0.5 ^{cdA}	41.2 ± 0.9 ^{bB}
	<i>C</i>	13.0 ± 0.9 ^{abA}	15.3 ± 0.6 ^{abB}	13.3 ± 0.9 ^{aA}	15.3 ± 0.9 ^{aB}
	<i>h</i>	77.8 ± 0.3 ^{abB}	78.2 ± 0.9 ^{aB}	73.4 ± 0.3 ^{aA}	74.3 ± 0.2 ^{cdA}
105	<i>L</i>	36.6 ± 0.4 ^{abA}	41.9 ± 0.8 ^{aB}	37.0 ± 0.8 ^{cdA}	40.7 ± 1.1 ^{bB}
	<i>C</i>	12.1 ± 0.6 ^{aA}	14.8 ± 0.8 ^{aB}	12.1 ± 0.2 ^{aA}	15.2 ± 0.3 ^{aB}
	<i>h</i>	78.0 ± 1.2 ^{abB}	78.6 ± 0.3 ^{aB}	73.2 ± 0.4 ^{aA}	73.8 ± 0.3 ^{bcA}
126	<i>L</i>	37.9 ± 0.6 ^{bcA}	43.4 ± 0.9 ^{abC}	37.7 ± 0.9 ^{dA}	40.9 ± 1.3 ^{bB}
	<i>C</i>	11.9 ± 0.3 ^{abA}	15.6 ± 0.3 ^{abB}	12.1 ± 0.6 ^{aA}	15.7 ± 0.6 ^{aB}
	<i>h</i>	80.0 ± 0.6 ^{cd}	78.6 ± 0.3 ^{aC}	73.6 ± 0.5 ^{aA}	74.8 ± 0.2 ^{dB}
143	<i>L</i>	38.4 ± 0.5 ^{bcB}	42.6 ± 0.1 ^{aD}	36.8 ± 0.4 ^{cdA}	41.2 ± 1.0 ^{bcC}
	<i>C</i>	12.3 ± 0.6 ^{abA}	15.3 ± 0.7 ^{abB}	12.5 ± 0.6 ^{aA}	15.7 ± 0.6 ^{aB}
	<i>h</i>	79.1 ± 0.6 ^{bcC}	79.6 ± 0.3 ^{abC}	73.4 ± 0.4 ^{aA}	74.4 ± 0.6 ^{cdB}
ΔE		0.46	1.07	2.97	2.18

CNF: non-fermented control beverage. CF: fermented control beverage. PRNF: non-fermented pea-rice beverage. PRF: fermented pea-rice beverage. Mean values with different lowercase letters within the same column of the same parameter are significantly different ($p \leq 0.05$). Mean values with different uppercase letters within the same row are significantly different ($p \leq 0.05$).

The color variation (ΔE) between d0 and d143 was lower than 3 for all beverages, meaning differences of color were not easily detectable by the human eye (Vichi *et al.*, 2004; Adekunte *et al.*, 2010). However, the ΔE of the PRNF beverage was the highest with a value of 2.97 whereas the ΔE of the PRF beverage was 2.18, thus the lactic acid fermentation had a preservative action on the color difference of the PR beverage during the storage (Di Cagno *et al.*, 2011).

3.2. Molecular weight distribution

In order to evaluate the effect of the fermentation and of the storage on the peptides produced and their molecular weight distribution, the peptide profiles of the beverages were analyzed every 21 days by SEC-HPLC (Figure 4).

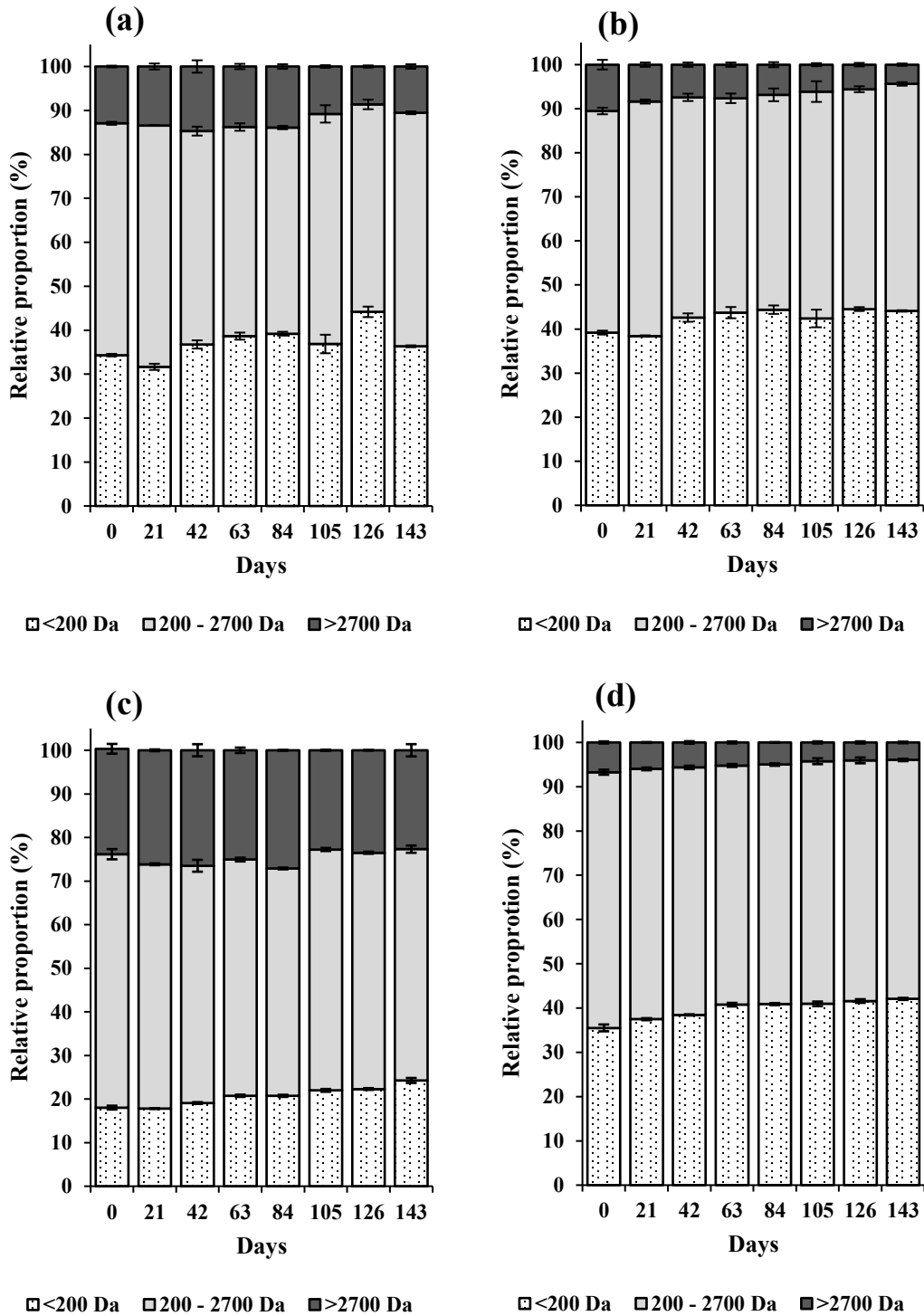


Figure 4—Molecular weight distribution of non-fermented control (CNF) (a), fermented control (CF) (b), non-fermented pea-rice (PRNF) (c) and fermented pea-rice (PRF) (d) beverages during storage at 4 °C for 143 days. At day 0, fermented products (CF and PRF) contained significantly more ($p \leq 0.05$) low molecular weight (LMW) peptides <200 Da than non-fermented products (CNF and PRNF) with an increase

of 14% for control products and an increase of 97% for PR products as compared to their respective non-fermented product. Furthermore, fermented products possessed a significant lower quantity ($p \leq 0.05$) of high molecular weight (HMW) peptides >2700 Da showing a decrease of 18% in control product and a decrease of more than 72% in PR-based product as compared to their respective non-fermented products. These results suggested that fermentation had a greater impact on the molecular weight of peptides of PR products as compared to the control products and allow a release of peptides <200 Da, corresponding mainly to di-peptides.

The effect of the storage on the peptides MW showed that the proportion of LMW peptides of PRF beverage increased by 20% over the course of the storage period as compared to an increase by 12% for the CF beverage. The level of medium molecular weight (MMW) peptides was relatively stable during storage for all beverages with small variations (<10%). The quantity of HMW peptides decreased during storage for all beverages, but our results showed a higher decrease for fermented beverages, CF and PRF, with a respective reduction of 58% and 41%. The release of LMW peptides during storage could be due to the proteolytic activity of the specific combination of *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 of the Bio-K+ ferment over time. In fact, the proteolytic activity of LAB can be maintained during storage (Nielsen *et al.*, 2009). Consequently, our storage conditions led to a release of small peptides <200 Da.

Small peptides are better absorbed than proteins and thus the digestibility can be improved after the hydrolysis (Grimble, 1994; Manus *et al.*, 2020). Furthermore, bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* spp. are able to hydrolyze proteins and generate peptides that are absorbed more efficiently compared to native protein (Grimble, 1994; Matar *et al.*, 1996; Raveschot *et al.*, 2018). Thus, the hydrolysis of proteins through fermentation can improve their digestibility and their absorption (Clemente, 2000; Koopman *et al.*, 2009).

Bioactive peptides can also be produced by LAB (Coda *et al.*, 2012; Raveschot *et al.*, 2018) and can be found in pea and rice (Roy *et al.*, 2010; Rani *et al.*, 2018). These peptides could be “bioactive peptides”, with positive effects on human health, especially due to their antioxidant and antihypertensive activities (Udenigwe & Aluko, 2012). Further research is needed to determine the potentially antioxidant activity of peptides released by the action of Bio-K+ fermentation.

3.3. Microbiological analysis

The concentration of *Lactobacillus* spp. in PRF and CF was followed during 143 days of storage and the results are presented in **Figure 5**. The level of *Lactobacillus* spp. was stable during the 143 days of storage for the CF beverage. Indeed, a small difference of 0.26 log CFU/mL was

noted between the beginning and the end of the storage period, which is less than 1 log and is not considered as a significant microbiological difference. A reduction of 1 log was observed at the end of the storage period of the PRF beverage, from 9.45 to 8.40 log CFU/mL. The addition of pea and rice protein to the beverage changed the composition of the initial product non-enriched in protein and these changes influenced the concentration of *Lactobacillus* spp. during storage. Several factors can affect negatively the viability of probiotic bacteria such as physical, chemical or biological factors (Terpou *et al.*, 2019). Several hypotheses can explain the decrease in the concentration of *Lactobacillus* spp. in the PRF beverage. With a high concentration of probiotics in the PRF beverage at the beginning of storage, the nutrients may have been used too quickly by the bacteria, resulting in a drop in the concentration of *Lactobacillus* spp. Also, even with a buffering capacity and a higher pH than the CF beverage, the high concentration of lactic acid in the PRF beverage may have caused a decrease in the concentration of probiotic bacteria. Indeed, the accumulation of organic acids during storage can lead to a loss of viability of probiotics (Shah, 2000; Gupta & Abu-Ghannam, 2012). However, the level of microorganisms after 143 days is still considered sufficient in terms of nutraceutical properties (CFIA, 2019).

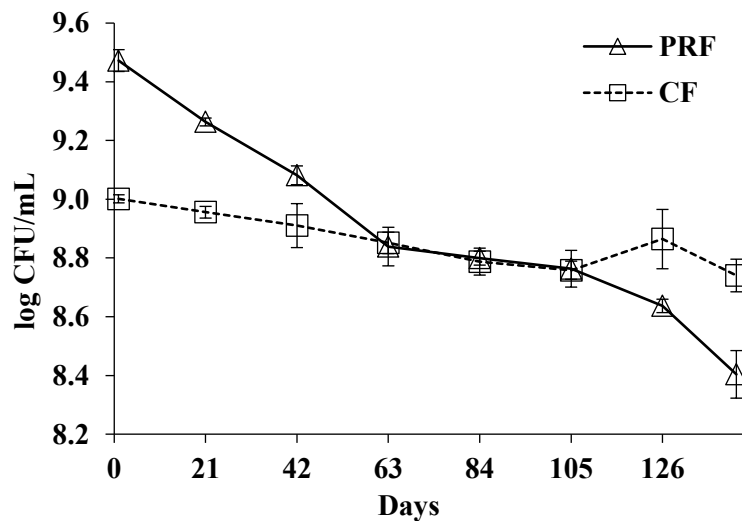


Figure 5—Concentration of *Lactobacillus* spp. of fermented control (CF) and fermented pea-rice (PRF) beverages during storage at 4 °C for 143 days.

Despite the variability in the viability of probiotics during storage, a majority of reports observed a decrease of 1 log or more during the storage of probiotic beverages (Oliveira *et al.*, 2002; Champagne *et al.*, 2005). In addition, the storage period employed is often from 3 to 5 weeks only (Sodini *et al.*, 2002; Martín-Diana *et al.*, 2003; Ortakci & Sert, 2012), in contrast to this study where the analyses were done during 143 days of storage. According to the Canadian Food Inspection

Agency (CFIA), a portion of a food must contain at least 9 log CFU of CFIA-recognized probiotic bacteria to be considered a probiotic food (CFIA, 2019). The results showed that the protein-enriched beverage PRF still contained the minimum of 9 log CFU per serving required by the CFIA, which is a 98 g bottle in this case, during the entire storage period, with 10.4 log CFU detected up to 143 days of storage. As the viability of probiotics could be challenged during storage, it is important to follow that parameter to ensure an acceptable number of bacteria remain viable for the entire storage period.

3.4. Sensory analysis

The results of the sensorial evaluation of the probiotic beverage are presented in **Table 11**. The global appreciation and the flavor were the most appreciated parameters in CF beverage. Values over 7, meaning “moderately liked” were observed over the entire storage period. For the PRF beverage, the product was appreciated mainly for its color-appearance and its texture. Values from 7 to 8.5 were noticed, meaning from “moderately liked” to “extremely liked” and this appreciation was maintained over the entire storage period.

Table 11–Sensory analysis during 84 days of storage of CF and PRF beverages.

	CF			PRF		
	0 d	42 d	84 d	0 d	42 d	84 d
Color/ Appearance	6.4 ± 1.7 ^{aA}	6.9 ± 0.7 ^{aA}	6.4 ± 1.1 ^{aA}	7.4 ± 1.2 ^{abBC}	8.3 ± 0.9 ^{bC}	8.5 ± 0.5 ^{bB}
Odor	6.6 ± 0.7 ^{abA}	7.0 ± 0.7 ^{bA}	6.4 ± 1.7 ^{abA}	5.3 ± 1.4 ^{aA}	6.4 ± 1.7 ^{abAB}	6.6 ± 1.6 ^{abA}
Texture	6.3 ± 1.6 ^{aA}	7.2 ± 1.5 ^{aA}	6.6 ± 1.5 ^{aA}	8.0 ± 0.6 ^{aC}	7.6 ± 1.5 ^{aBC}	6.9 ± 1.7 ^{aA}
Flavor	7.6 ± 0.9 ^{cA}	7.4 ± 1.2 ^{cA}	7.6 ± 1.3 ^{cA}	5.8 ± 1.9 ^{abA}	5.2 ± 1.3 ^{aA}	6.7 ± 1.4 ^{bcA}
Global appreciation	7.4 ± 0.9 ^{bcA}	7.6 ± 0.7 ^{cA}	7.3 ± 1.3 ^{bcA}	6.2 ± 1.2 ^{abAB}	5.3 ± 1.3 ^{aA}	6.6 ± 1.5 ^{bcA}

CNF: non-fermented control beverage. CF: fermented control beverage. PRNF: non-fermented pea-rice beverage. PRF: fermented pea-rice beverage. Scores vary between 1 (extremely disliked) and 9 (extremely liked). Score are means ± SD. Mean values with different lowercase letters within the same row are significantly different ($p \leq 0.05$). Mean values with uppercase lower letters within the same column are significantly different ($p \leq 0.05$).

The pronounced vegetable taste and the beany flavor of peas, that relates to earthy, dusty, powdery and sour notes, can be an obstacle to its use (Vara-Ubol *et al.*, 2004; Murat *et al.*, 2013). In this study, the earthy and powdery notes associated with peas lowered the flavor scores for the PRF beverage, which ranged between 5.2 and 6.7, meaning between “neither liked nor disliked” and “moderately liked”, while the CF beverage scores ranged from 7.4 to 7.6, meaning “moderately liked” to “very much liked”. Overall, the global appreciation scores were in the same range than those observed for flavor. Indeed, the CF beverage was preferred, with values between

7.3 to 7.6, compared to the PRF beverage, which had values between 5.3 and 6.6. Interestingly, the CF beverage is the actual commercial probiotic product which contains an aroma specific to its formula. This could explain the highest appreciation of the CF beverage. Further development will be needed to develop a specific aroma or masking agent to improve the sensory quality of the PR-based beverage.

4. Conclusion

This research has allowed the development of a fermented beverage supplemented in proteins and in viable probiotic bacteria. The product had good sensorial properties. The PRF beverage was especially appreciated for its texture and its appearance. However, some improvement needs to be done in order to improve the flavor appreciation of the product.

Despite a higher lactic acid concentration, a lower pH and a greater viscosity at the end of the storage, the storage did not affect the color of the beverage whose color difference from day 0 to day 143 was not detectable to the human eye. The storage induced, however, some physicochemical variations but these variations did not affect the sensorial quality. Furthermore, the PR-based beverage conserved a high number of viable micro-organisms with over 10.4 log CFU per portion of 98 g up to 143 days of storage.

Acknowledgments

This research was supported by the Ministry of Economy and Innovation (MEI) of the province of Québec, Canada, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and by Bio-K Plus, a division of Kerry Group (Laval, Québec, Canada). Bio-K Plus is also acknowledged for providing Bio-K+ beverages and for supplying pea and rice proteins. The authors thank Fettah Rezzouk and Meriem Haddi for their technical support for the preparation of beverages and the microbial analyses.

Conflicts of interest

M. M. is paid employee of Bio-K Plus.

References

- Adekunte, A. O., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Scannell, A. G. M., & O'donnell, C. P. (2010). Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, 122(3), 500-507.
- AOAC. (2000). Method 942.15. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International, 17th ed. AOAC International: Gaithersburg, ML.
- Ashraf, R., & Shah, N. P. (2014). Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 938–956.
- Babault, N., Païzis, C., Deley, G., Guérin-Deremaux, L., Saniez, M.-H., Lefranc-Millot, C., & Allaert, F. A. (2015). Pea proteins oral supplementation promotes muscle thickness gains during resistance training: a double-blind, randomized, Placebo-controlled clinical trial vs. Whey protein. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 12(1), 3.
- Barbut, S. (2010). Color development during natural fermentation and chemical acidification of salami-type products. *Journal of Muscle Foods*, 21(3), 499-508.
- Bernat, N., Cháfer, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2014). Hazelnut milk fermentation using probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and inulin. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(12), 2553-2562.
- Børsheim, E., Bui, Q.-U. T., Tissier, S., Kobayashi, H., Ferrando, A. A., & Wolfe, R. R. (2008). Effect of amino acid supplementation on muscle mass, strength and physical function in elderly. *Clinical Nutrition*, 27(2), 189–195.
- CFIA. (2019). Health claims on food labels – Probiotic claims. Canadian Food Inspection Agency, Government of Canada. Available at: <https://inspection.gc.ca/food-label-requirements/labelling/industry/health-claims-on-food-labels/eng/1392834838383/1392834887794?chap=10>. (accessed online June 1, 2020).
- Chabot, S., Yu, H. L., De Léséleuc, L., Cloutier, D., Van Calsteren, M. R., Lessard, M., ... & Oth, D. (2001). Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes. *Le Lait*, 81(6), 683-697.
- Champagne, C. P., Gardner, N. J., & Roy, D. (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(1), 61-84.
- Chapagain, A., & Hoekstra, A. (2011). The blue, green and grey water footprint of rice from production and consumption perspectives. *Ecological Economics*, 70(4), 749–758.
- Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 11(7), 254–262.
- Coda, R., Rizzello, C. G., Pinto, D., & Gobbetti, M. (2012). Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1087-1096.

De Léséleuc, L., Chabot, S., Cloutier, D., Roy, D., Lacroix, M., & Oth, D. (2002). Quantitative aspects in pro-inflammatory cytokines and gamma interferon (IFN- γ) production capacities among various lactic acid bacteria (LAB). *Milchwissenschaft*, 57(6), 316-319.

Deshpande, R. P., Chinnan, M. S., & Phillips, R. D. (2008). Process development of a chocolate-flavoured peanut–soy beverage. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(5), 886-894.

Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C. G., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2011). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology*, 28(5), 1062-1071.

Didari, T., Mozaffari, S., Nikfar, S., & Abdollahi, M. (2015). Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: Updated systematic review with meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 21(10), 3072-3084.

Fujimaki, M., Yamashita, M., Okazawa, Y., & Arai, S. (1970). Applying proteolytic enzymes on soybean. 3. Diffusible bitter peptides and free amino acids in peptic hydrolyzate of soybean protein. *Journal of Food Science*, 35(3), 215-218.

Grimble, G. (1994). The significance of peptides in clinical nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 14, 419-447.

Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2012). Probiotic fermentation of plant-based products: possibilities and opportunities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(2), 183-199.

Hayta, M., Alpaslan, M., & Köse, E. (2001). The effect of fermentation on viscosity and protein solubility of Boza, a traditional cereal-based fermented Turkish beverage. *European Food Research and Technology*, 213(4-5), 335-337.

Health Canada. (2018). Common food allergens. Available at: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/food-allergies-intolerances/food-allergies.html> (accessed online July 6, 2020).

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Calder, P. C. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514.

Joy, J. M., Lowery, R. P., Wilson, J. M., Purpura, M., Souza, E. O. D., Wilson, S. M., Kalman, D. S., Dudeck, J. E., Jäger, R. (2013). The effects of 8 weeks of whey or rice protein supplementation on body composition and exercise performance. *Nutrition Journal*, 12(1), 12–86.

Kannan, S., Nielsen, S. S., & Mason, A. C. (2001). Protein digestibility-corrected amino acid scores for bean and bean–rice infant weaning food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 5070-5074.

Koopman, R., Crombach, N., Gijzen, A. P., Walrand, S., Fauquant, J., Kies, A. K., ... Loon, L. J. V. (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.

Kullar, R., Johnson, S., McFarland, L. V., Goff, D. A., & Goldstein, E. J. (2020). Bundling probiotics with antimicrobial stewardship programs for the prevention of clostridioides difficile infections in acute care hospitals. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 28(3), 123-129.

Liao, W., Chen, C., Wen, T., & Zhao, Q. (2020). Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in adults: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Journal of Clinical Gastroenterology*.

Maehashi, K., & Huang, L. (2009). Bitter peptides and bitter taste receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(10), 1661-1671.

Maherani, B., Harich, M., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2019). Antibacterial properties of combined non-thermal treatments based on bioactive edible coating, ozonation, and gamma irradiation on ready-to-eat frozen green peppers: evaluation of their freshness and sensory qualities. *European Food Research and Technology*, 245(5), 1095-1111.

Manus, J., Millette, M., Aguilar Uscanga, B. R., Salmieri, S., Maherani, B., Lacroix, M. (2020). *In vitro* protein digestibility and physico-chemical properties of lactic acid bacteria fermented beverages enriched with plant proteins. *Journal of Food Science*. (Submitted for publication).

Martín-Diana, A. B., Janer, C., Peláez, C., & Requena, T. (2003). Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 13(10), 827-833.

Matar, C., Amiot, J., Savoie, L., & Goulet, J. (1996). The Effect of Milk Fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the Release of Peptides During In Vitro Digestion. *Journal of Dairy Science*, 79(6), 971-979.

McFarland, L. V. (2007). Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 5(2), 97-105.

Murat, C., Bard, M.-H., Dhalleine, C., & Cayot, N. (2013). Characterisation of odour active compounds along extraction process from pea flour to pea protein extract. *Food Research International*, 53(1), 31-41.

Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K. I., & Otte, J. (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *International Dairy Journal*, 19(3), 155-165.

Oliveira, M. N. D., Sodini, I., Remeuf, R., Tissier, J. P., & Corrieu, G. (2002). Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. *Journal of Food Science*, 67(6), 2336-2341.

Oliveira, M. N. D., Sodini, I., Remeuf, F., & Corrieu, G. (2001). Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 11(11-12), 935-942.

Ortakci, F., & Sert, S. (2012). Stability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in yogurt and in an artificial human gastric digestion system. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 6918-6925.

Paquet, É., Hussain, R., Bazinet, L., Makhlouf, J., Lemieux, S., & Turgeon, S. L. (2014). Effect of processing treatments and storage conditions on stability of fruit juice based beverages enriched

with dietary fibers alone and in mixture with xanthan gum. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 131-138.

Pathare, P. B., Opara, U. L., & Al-Said, F. A. J. (2013). Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 36-60.

Rani, S., Pooja, K., & Pal, G. K. (2018). Exploration of rice protein hydrolysates and peptides with special reference to antioxidant potential: Computational derived approaches for bio-activity determination. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 61-70.

Raveschot, C., Cudennec, B., Coutte, F., Flahaut, C., Fremont, M., Drider, D., & Dhulster, P. (2018). Production of Bioactive Peptides by Lactobacillus Species: From Gene to Application. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2354.

Ringgenberg, E., Corredig, M., & Alexander, M. (2012). Physico-chemical characterization of soymilk particles as a function of their volume fraction: comparison with theoretical systems. *Food Biophysics*, 7(3), 244-257.

Roy, F., Boye, J. I., & Simpson, B. K. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, 43(2), 432-442.

Rutherford, S. M., Fanning, A. C., Miller, B. J., & Moughan, P. J. (2015). Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats. *The Journal of Nutrition*, 145(2), 372-379.

Sarwar, G., Peace, R. W., Botting, H. G., & Brulé, D. (1989). Digestibility of protein and amino acids in selected foods as determined by a rat balance method. *Plant Foods for Human Nutrition*, 39(1), 23-32.

Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83(4), 894-907.

Sodini, I., Lucas, A., Oliveira, M. N., Remeuf, F., & Corrieu, G. (2002). Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2479-2488.

Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Bosnea, L. A., & Kopsahelis, N. (2019). Probiotics in food systems: Significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. *Nutrients*, 11(7), 1591.

Tieland, M., Dirks, M. L., Zwaluw, N. V. D., Verdijk, L. B., Rest, O. V. D., Groot, L. C. D., & Loon, L. J. V. (2012). Protein supplementation increases muscle mass gain during prolonged resistance-type exercise training in frail elderly people: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of the American Medical Directors Association*, 13(8), 713-719.

Tomé, D. (2013). Digestibility issues of vegetable versus animal proteins: Protein and amino acid requirements—Functional aspects. *Food and Nutrition Bulletin*, 34(2), 272-274.

Tyl, C., & Sadler, G. D. (2017). pH and titratable acidity. In *Food analysis* (pp. 389-406). Springer, Cham.

Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77(1), R11-R24.

Urbanski, G. E., Wei, L. S., Nelson, A. I., & Steinberg, M. P. (1982). Rheology and water imbibing of major fractions of soybean beverage. *Journal of Food Science*, 47(3), 1021-1022.

Vara-Ubol, S., Chambers, E., Chambers, D.H. (2004). Sensory characteristics of chemical compounds potentially associated with beany aroma in foods. *Journal of Sensory Studies*, 19(1), 15–26.

Vichi, A., Ferrari, M., & Davidson, C. L. (2004). Color and opacity variations in three different resin-based composite products after water aging. *Dental Materials*, 20(6), 530-534.

Wang, M., Hettiarachchy, N., Qi, M., Burks, W., & Siebenmorgen, T. (1999). Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 411-416.

Zentner, R., Lafond, G., Derksen, D., Nagy, C., Wall, D., & May, W. (2004). Effects of tillage method and crop rotation on non-renewable energy use efficiency for a thin Black Chernozem in the Canadian Prairies. *Soil and Tillage Research*, 77(2), 125–136.

CHAPITRE 6 : DISCUSSION GÉNÉRALE

1. Sélection des boissons

L'objectif de cette étude était de mettre au point des boissons enrichies en protéines végétales, en utilisant différentes sources de protéines soit le riz, le pois et le chanvre. Les différents mélanges de protéines à incorporer dans les boissons ont été sélectionnés selon leurs indices chimiques, et leurs CEP théoriques. L'indice chimique est défini pour chaque AAE comme étant le rapport entre sa teneur dans le produit évalué et sa teneur dans une protéine de référence, communiquée par la FAO (2007), qui correspond aux besoins en AAE d'un adulte en mg/g de protéine. Les AAE n'étant pas synthétisés par le corps humain, ils doivent donc être apportés par l'alimentation. Les légumineuses étant généralement pauvres en méthionine et les céréales en lysine, un mélange de ces deux types de protéines peut permettre d'équilibrer l'apport en AAE et satisfaire les recommandations de la FAO et de l'OMS (Kannan *et al.*, 2001, FAO & WHO, 2007). Les indices chimiques inférieurs à 1 pour le riz et le chanvre étaient de 0.59 et 0.90 respectivement et concernaient la lysine. Concernant le pois, l'indice chimique inférieur à 1 était celui de la méthionine avec une valeur de 0.59. Les mélanges pois/riz (PR) et pois/chanvre (PH) ont donc été préférés afin de combler la déficience en méthionine du pois par le riz ou le chanvre et de combler les déficiences en lysine du riz et du chanvre par le pois. Le calcul des indices chimiques a permis de choisir le mélange pois/riz contenant 50% de pois et 50% de riz, et le mélange pois/chanvre contenant 30% de pois et 70% de chanvre. Avec des indices chimiques supérieurs à 1 pour tous les AAE, ces deux mélanges procurent donc des quantités suffisantes en AAE selon les recommandations de la FAO (2007). Les boissons ont été développées pour posséder un maximum de protéines par portion. Ainsi, en ce qui concerne la faisabilité, le pourcentage maximum de protéines par portion était de 13% pour la boisson PR et 11,2% pour la boisson PH. En effet, à des concentrations de protéines plus élevées la viscosité était trop importante pour une fabrication commerciale. Les résultats des calculs de CEP estimés pour les boissons étaient de 1,35 pour la boisson PR et 1,52 pour la boisson PH. Une protéine avec un CEP inférieur à 1,5 est considérée de qualité médiocre, elle est considérée de qualité intermédiaire avec un CEP entre 1,5 et 2,0 et de qualité élevée avec un CEP supérieur à 2,0 (Friedman, 1996). Ces calculs d'estimation de CEP ne prenaient pas en compte la fermentation des protéines ni les possibles interactions des différentes sources de protéines entre elles. De plus, une composition complète en acides aminés n'est pas synonyme de bonne absorption protéique ou de bonne digestibilité

protéique. Les analyses *in vitro* et *in vivo* étaient donc essentielles pour déterminer le CEP réel des protéines.

2. Analyses *in vitro*

Le but de cette étude *in vitro* était, premièrement, d'analyser l'effet de l'enrichissement des boissons en protéines végétales ainsi que l'effet de la fermentation lactique sur les paramètres physico-chimiques et microbiologiques des boissons; et deuxièmement, d'étudier l'effet de ces deux variations, l'enrichissement et la fermentation, sur la digestibilité protéique *in vitro* des boissons.

2.1. Caractérisation des produits

Les résultats obtenus ont indiqué que la fermentation lactique des boissons n'a pas modifié la teneur totale en protéines ou la teneur totale en solide des boissons. L'addition de protéines a permis d'augmenter la teneur totale en protéines des boissons PR et PH. La viscosité étant liée à la teneur en protéines et en solides totaux (Oliveira *et al.*, 2001), la boisson PR non fermentée (PRNF), avec 13% de protéines, avait donc une viscosité plus élevée que la boisson PH non fermentée (PHNF), avec 11,2% de protéines. En revanche, la fermentation a mené à une baisse de la viscosité des boissons. Ceci peut être dû à l'hydrolyse des protéines par les bactéries lactiques, menant à des protéines et des peptides de petits poids moléculaires et ainsi plus solubles. En effet, les bactéries lactiques sont capables d'hydrolyser les protéines et les peptides en petits peptides et en acides aminés libres (Raveschot *et al.*, 2018). La boisson PR fermentée (PRF) est la boisson ayant subi la plus forte diminution de viscosité après la fermentation, avec plus de 50% de baisse, contre 20% pour la boisson PH fermentée (PHF). Ces résultats peuvent être dus aux différences fonctionnelles des protéines de pois, de riz et de chanvre. En effet, ces protéines ont des solubilités, des capacités de rétention d'eau ou encore des propriétés de gélification qui diffèrent les unes des autres et cela peut affecter la viscosité des boissons (Agboola *et al.*, 2005; Boye *et al.*, 2010; Raikos *et al.*, 2014; Akin & Ozcan, 2017).

La fermentation des boissons a fait baisser leur pH et augmenter leur acidité titrable (TA). Cela est dû à la production d'acide lactique par les bactéries. Le pH et la TA sont tous les deux impliqués dans la mesure de l'acidité d'un produit, mais ne sont pas forcément corrélés. Le pH est lié à la capacité de dissociation des acides présents dans le produit tandis que la valeur de TA correspond à la quantité totale de ces acides (Tyl & Sadler, 2017). Ainsi, deux produits peuvent avoir le même pH, mais des TA différentes, l'opposé étant aussi possible (Nnam & Obiakor, 2003;

Wang *et al.*, 2009). De ce fait, les TA plus élevées de PRF et PHF, comparé à la TA de la boisson contrôlée fermentée non enrichie en protéines (CF), signifient une plus grande concentration en acide lactique dans les boissons. En revanche, leurs pH plus élevés indiquent une plus faible capacité de dissociation des acides et une activité tampon en résistant à une baisse de pH tandis que la quantité d'acide lactique augmente.

Les résultats obtenus pour le compte total de *Lactobacillus spp.* viables ont montré une concentration plus élevée pour les boissons PRF et PHF (9.5 log UFC/mL) par rapport à la boisson CF (9.0 log UFC/mL). Ceci peut être dû à des facteurs stimulants présents dans les protéines de pois, de riz et de chanvre, comme des vitamines, des antioxydants (Zare *et al.*, 2012). Les probiotiques sont sensibles et tous les composants d'un produit peuvent avoir une influence sur leur croissance (Vinderola *et al.*, 2000; Terpou *et al.*, 2019). Ces résultats expliquent également la plus grande quantité d'acide lactique produite. Cependant, la différence de concentration en *Lactobacillus spp.* étant inférieure à 1 log UFC/mL, ces différences avaient peu d'importance microbiologique.

Les résultats ont montré que les boissons fermentées possédaient moins de peptides de hauts poids moléculaires (>2700 Da) que les boissons non fermentées et plus de peptides de petits poids moléculaires (<200 Da). Une baisse de plus de 60% des peptides de hauts poids moléculaires a été observée pour les boissons PRF et PHF ainsi qu'une hausse de 50% des peptides de petits poids moléculaires. En revanche, CF contenait 40% de moins de peptides de hauts poids moléculaires que CNF et ne présentait pas de différences significatives ($p > 0.05$) quant à la proportion de peptides de petit poids moléculaires avant et après fermentation. Ces résultats ont montré que la combinaison de probiotiques *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 avait une activité protéolytique et spécialement sur les boissons PR et PH. Cela peut être dû au fait que les boissons PR et PH possèdent une grande quantité de protéines comparativement aux produits contrôles, favorisant ainsi l'activité protéolytique des bactéries probiotiques (Vithana *et al.*, 2011). Les bactéries du genre *Lactobacillus* peuvent hydrolyser les protéines en peptides qui pourront être absorbés plus facilement (Grimble, 1994; Matar *et al.*, 1996; Raveschot *et al.*, 2018). Ainsi, du fait que les petits peptides sont plus facilement assimilables, l'hydrolyse des protéines par la fermentation peut améliorer leur absorption et leur digestibilité (Clemente, 2000; Koopman *et al.*, 2009). Aussi, du fait de leur activité protéolytique, les bactéries lactiques peuvent produire des peptides bioactifs (Coda *et al.*, 2012; Raveschot *et al.*, 2018). Ces peptides peuvent notamment être retrouvés dans le chanvre, le pois et le riz (Roy *et al.*, 2010; Girgih *et al.*, 2014; Rani *et al.*, 2018) et présentent des bénéfices pour la santé

humaine, notamment en raison de leurs propriétés antioxydantes et leurs effets antihypertenseurs (Udenigwe & Aluko, 2012). Plusieurs études rapportent que les peptides de petits poids moléculaires ont une plus forte activité antioxydante que ceux de hauts poids moléculaires (Rajapakse *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2008). Des recherches supplémentaires pourraient être réalisées pour déterminer l'activité antioxydante des peptides libérés par l'action des ferments de Bio-K+.

2.2. Digestion *in vitro*

Lors de la procédure de digestion *in vitro*, les profils peptidiques des boissons contrôles, PR et PH ont été étudiés afin d'analyser l'effet combiné de la fermentation et de l'enrichissement en protéines des boissons sur les peptides au cours de la digestion *in vitro*. La digestion enzymatique à la pepsine et à la trypsine a permis une baisse de la quantité des peptides de hauts poids moléculaires (>2700 Da) et une augmentation des peptides de moyens (200-2700 Da) et petits poids moléculaires (<200 Da). L'observation des poids moléculaires donne des informations sur l'hydrolyse des protéines, qui est associée au taux d'absorption de celles-ci (Roberts *et al.*, 1999). Les résultats indiquent une plus forte hydrolyse des peptides pour les boissons enrichies PR et PH que pour la boisson contrôle. Aussi, la boisson PRF a montré une plus forte hydrolyse des peptides que la boisson PRNF, avec presque le double de peptides de moyens poids moléculaires pour PRF.

Les résultats de la digestibilité protéique *in vitro*, déterminée par la méthode de libération d'azote, ont montré une plus grande digestibilité des produits enrichis en protéines PR et PH, que de la boisson contrôle. Les résultats ont montré que la digestibilité *in vitro* était corrélée à l'hydrolyse des peptides de hauts poids moléculaires en peptides de moyens et de petits poids moléculaires. Parmi les boissons analysées, la boisson PRF a obtenu la plus forte digestibilité protéique ($P \leq 0.05$), avec une valeur de 72,7%. Également, c'est la seule boisson à avoir eu une différence significative de résultats ($P \leq 0.05$) entre la boisson fermentée et la boisson non fermentée. Les trois boissons contiennent des sources de protéines différentes, qui ont chacune des compositions et donc des digestibilités différentes (Corgneau *et al.*, 2019). La digestibilité d'un produit va dépendre de la matrice alimentaire, de la procédure d'extraction ou encore de la méthode de digestion utilisée, qui peut différer notamment selon les enzymes utilisées, les rapports enzymes-substrat et les temps d'incubation employés (Abdel-Aal, 2008; Hur *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011; Tavano *et al.*, 2016; Corgneau *et al.*, 2019). Les résultats obtenus sont singulièrement plus faibles que ceux présentés dans la littérature concernant les isolats de

protéines végétales. En effet, un isolat de protéines de pois a généralement une digestibilité *in vitro* proche de 90% (Tulbek, 2017; Corgneau *et al.*, 2019), un isolat de protéines de chanvre entre 85-95% (House *et al.*, 2010; Malomo & Aluko, 2015) et concernant le riz, les valeurs de digestibilité protéique sont généralement autour de 90% (Wang *et al.*, 1999; Rutherford *et al.*, 2015). Il existe de nombreuses méthodes d'analyses de la digestibilité protéique *in vitro* et celles-ci peuvent sous-estimer grandement la valeur de la digestibilité réelle, déterminée *in vivo* (Urbano *et al.*, 2005; Tavano *et al.*, 2016; Franczyk, 2018). Cela peut être expliqué par le fait de la grande complexité du processus de digestion et que la digestion *in vitro* ne prend pas en compte tous les facteurs intrinsèques et extrinsèques de la digestion *in vivo* (Coles *et al.*, 2005). Les résultats obtenus *in vitro* doivent donc être corrélés avec des résultats obtenus *in vivo* afin d'être pertinents. Les faibles résultats obtenus dans cette étude peuvent également être dus à la présence de facteurs antinutritionnels. En effet, ceux-ci sont notamment présents dans le pois sous forme de phytates, de tannins et d'inhibiteurs de trypsine (Fernández-Quintela *et al.*, 1997; Vidal-Valverde *et al.*, 2003), mais se retrouvent en plus petite quantité dans les isolats protéiques que dans la farine de pois (Fredrikson *et al.*, 2001). En revanche, on les retrouve peu dans le chanvre et le riz (Russo & Reggiani, 2015; Hoogenkamp *et al.*, 2017). Ces facteurs limitent l'absorption des nutriments et réduisent donc leur digestibilité (Gilani *et al.*, 2012). Une analyse complémentaire est nécessaire pour déterminer la quantité de composés antinutritionnels présents dans ces protéines végétales.

Les résultats obtenus lors de cette étude *in vitro* ont mené à la sélection d'une des deux boissons enrichies en protéines, afin de poursuivre les étapes d'analyses *in vivo* et d'analyses au cours du stockage sur la boisson ayant la meilleure qualité protéique. Tout d'abord, la boisson PRF a pu être enrichie en protéines à hauteur de 13%, contre 11,2% pour la boisson PHF, qui saturait au-delà de cette quantité. Ensuite, lors de la digestion *in vitro*, la boisson PRF présentait la plus forte augmentation des peptides de moyens poids moléculaires (correspondant principalement aux tripeptides et oligopeptides), et l'effet de l'hydrolyse due à la fermentation semblait avoir un effet plus marqué pour la boisson PRF que pour la boisson PHF. En hydrolysant les protéines en petits peptides, la fermentation permet une pré-digestion des protéines, celles-ci étant normalement hydrolysées lors de la digestion par les enzymes gastriques, pancréatiques et intestinales, en petits peptides et en acides aminés. Les acides aminés libres sont absorbés plus rapidement que les protéines, mais plus lentement que les dipeptides et les tripeptides (Webb, 1990; Krehbiel & Matthews, 2003). Cette différence est due au système de transport des acides aminés qui induit des mécanismes de compétition entre ses substrats, contrairement au transport des di et tripeptides qui est plus efficace (Di Pasquale, 1997; Matthews & Adibi, 1976). Les résultats ont

ensuite démontré une meilleure digestibilité protéique *in vitro* de PRF que de PHF, montrant un lien entre l'hydrolyse peptidique et la digestibilité. Ces résultats, ainsi que la plus grande concentration en protéines de PRF, ont permis de sélectionner la boisson enrichie en protéines de pois et de riz pour les expériences suivantes, celles-ci étant les analyses *in vivo* et les analyses du produit au cours du stockage.

3. Analyses *in vivo*

Les objectifs des analyses *in vivo* ont été de déterminer la qualité protéique de la boisson enrichie en protéines de pois et de riz en passant par la détermination du CEP, de la digestibilité et du PDCAAS.

À l'issue des 14 jours d'expérience, le groupe de rats ayant pris le plus de poids est celui nourri avec le régime contenant de la caséine, suivi par le groupe nourri avec le régime PRF puis celui nourri avec le régime PRNF. Le groupe dont le régime ne contenait pas de protéines est le seul ayant subi une perte de poids. La quantité de nourriture ingérée était similaire ($p > 0.05$) entre les groupes de rats nourris avec de la caséine, PRF et PRNF. Elle était en revanche nettement inférieure ($p \leq 0.05$) pour le groupe nourri avec le régime sans protéines. Les protéines étant essentielles au bon développement du corps, participant à la formation de la peau, des tendons, des os, intervenant dans presque toutes les fonctions de la vie cellulaire (Nature, 2014), une carence en protéines a des impacts négatifs sur la croissance et peut entraîner une atrophie musculaire (Crews *et al.*, 1969).

Le CEP est utilisé pour déterminer la qualité d'une protéine et correspond au rapport du gain de poids de l'animal sur la quantité de protéines consommées (Health Canada, 1981). La caséine est, dans la majorité des cas, utilisée comme protéine de référence et son CEP est ajusté à 2,5 (Chapman *et al.*, 1959; Health Canada, 1981). Les résultats ont démontré que la fermentation a eu un effet bénéfique sur la qualité du mélange de protéines pois-riz en augmentant significativement le CEP ($p \leq 0.05$) de 1,88 pour PRNF à 2,32 pour PRF. Selon Friedman (1996), le mélange PRF est donc de grande qualité, car son CEP est supérieur à 2,0. Les résultats signifient que le produit PRF favorise davantage la croissance corporelle que le produit PRNF. Le calcul du CEPN (coefficient d'efficacité protéique net) prend en compte la perte de poids des rats nourris avec le régime sans protéines et réduit ainsi la principale lacune de la méthode du CEP qui est critiquée du fait de ne pas prendre en compte les protéines utilisées pour le maintien de l'organisme (Gilani & Lee, 2003; Boye *et al.*, 2012). Le résultat du CEPN du produit PRF était significativement supérieur ($p \leq 0.05$) à celui du PRNF avec 2,30 et 1,66 respectivement, quand

celui de la caséine était de 2,52. Ces résultats ont donc confirmé l'effet bénéfique de la fermentation ainsi que la qualité élevée du produit PRF avec un CEPN qui représentait 91% du CEPN de la caséine contre 66% pour PRNF. Les résultats obtenus *in vivo* sont très différents du CEP estimé du mélange pois-riz qui était de 1,35. Cela démontre qu'il est très difficile d'estimer le CEP d'un produit et encore plus d'un mélange, car l'estimation ne va pas prendre en compte les possibles interactions entre les différentes protéines.

Malgré un CEP significativement plus élevé, les résultats de la digestibilité protéique de PRF n'étaient pas significativement différents de ceux de PRNF ($p > 0.05$), avec respectivement des valeurs de 89,48% et 89,07%, et de 96,07% pour la caséine. Ces résultats indiquent tout de même une bonne absorption des protéines et le produit PRF peut être considéré comme ayant une bonne digestibilité. La différence de digestibilité avec la caséine pourrait être attribuée aux facteurs antinutritionnels des protéines végétales qui interfèrent avec l'absorption des nutriments et donc peuvent affecter négativement leur digestibilité (Ekholm *et al.*, 2003; Vidal-Valverde *et al.*, 2003). Aussi, étant donné que le CEP et la digestibilité *in vivo* sont déterminés de manières complètement différentes, plusieurs études n'ont trouvé aucune corrélation entre le CEP et la digestibilité *in vivo* (Cruz *et al.*, 2003; Khattab *et al.*, 2009).

Le PDCAAS, un autre critère de détermination de la qualité d'une protéine, prend en compte la digestibilité *in vivo* ainsi que l'indice chimique. Les résultats ont montré que les produits PRF et PRNF avaient un PDCAAS de 100% et 99,8% respectivement. La caséine et le blanc d'œuf sont connus pour atteindre la valeur de PDCAAS maximale de 100% (FAO, 1991) tandis que les concentrés de pois et de riz ont généralement des PDCAAS autour de 80 et 40% respectivement (Rutherford *et al.*, 2015; Mathai *et al.*, 2017). Cependant, en combinant une céréale et une légumineuse, qui sont respectivement déficientes en lysine et en méthionine, l'apport en AAE peut être complet et la qualité du mélange protéique peut être améliorée (FAO, 1991; Kannan *et al.*, 2001; Mensa-Wilmot *et al.*, 2001).

La concentration de *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 dans le régime contenant PRF était de 8,5 log UFC/g. Les résultats ont indiqué que ces probiotiques étaient en forte concentration après le passage par le tractus gastro-intestinal des rats avec une concentration de 7,4 log UFC/g dans les fèces des rats nourris avec le régime contenant PRF. Malgré le fait que la technique utilisée quantifiait les bactéries viables et non viables, Kramer *et al.* (2009) ont démontré que les résultats de quantification de *L. acidophilus* par PCR ne différaient significativement pas des résultats obtenus par PMA-PCR, utilisée pour la détection de bactéries viables.

4. Analyses au cours du stockage

Afin d'évaluer la stabilité et l'effet du temps de stockage sur le produit développé aux protéines de pois et de riz, des analyses du pH, de l'acidité titrable, de la viscosité, de la couleur, des profils peptidiques ont été effectuées pendant 143 jours de stockage à 4 °C, ainsi que des analyses microbiologiques et sensorielles.

4.1. Analyse du pH et de l'acidité titrable

Les résultats ont montré que la boisson enrichie en protéines présentait une baisse plus forte du pH que la boisson contrôle pendant les 42 premiers jours d'analyses puis une stabilisation, tandis que le pH de la boisson contrôle s'est stabilisé après 84 jours de stockage. Également l'acidité titrable de la boisson PRF augmente fortement jusqu'au 63^{ème} jour de stockage puis se stabilise alors que l'acidité titrable de la boisson contrôle augmente linéairement tout le long du stockage. Aussi, tout le long du stockage, la boisson PRF a un pH plus faible que la boisson CF, mais une acidité titrable plus élevée, ceci traduisant une activité tampon des protéines et une post-acidification. Akalin *et al.* (2007) ont également observé que l'enrichissement d'un yaourt avec des protéines de lactosérum permettait d'augmenter son pH, du fait de l'activité tampon des protéines de lactosérum, mais également d'augmenter la production d'acide lactique.

4.2. Analyse de la viscosité

Les résultats ont montré que la viscosité a augmenté pendant le stockage pour tous les produits. L'addition de protéines dans la boisson a mené à une plus grande augmentation de la viscosité au cours du stockage avec une augmentation de 46% entre le jour 0 et le jour 143 pour la boisson PRF contre une augmentation de 26% pour la boisson contrôle. L'augmentation de la viscosité pendant le stockage peut être due à des interactions moléculaires comme les interactions polysaccharide-polysaccharide ou les interactions protéine-polysaccharide (Deshpande *et al.*, 2008; Paquet *et al.*, 2014).

4.3. Analyse de la couleur

Les résultats ont montré une augmentation de la valeur L^* , représentant la clarté du produit, après la fermentation et une augmentation de cette valeur suite à l'enrichissement en protéines. Cet enrichissement a mené à une augmentation de particules dans la boisson qui freinent la diffusion de la lumière. L'augmentation de la clarté dans les produits fermentés peut être due à la

dénaturation des protéines causée par l'augmentation de l'acidité après la fermentation. Également, les résultats ont montré que la fermentation avait augmenté les valeurs de C^* , représentant la saturation en couleurs des produits. Concernant les valeurs h^* , représentant l'angle de teinte, les résultats ont montré que les produits PR avaient une couleur proche de l'orange tandis que les produits contrôles avaient une couleur plus proche du jaune. Les trois valeurs, L^* , C^* et h^* étaient principalement stables tout au long du stockage, concernant tous les produits. Les résultats des valeurs de variations de couleurs (ΔE) ont démontré que les différences de couleurs entre J0 et J143 n'étaient pas détectables par l'œil humain, car inférieures à 3, et ce pour tous les produits (Vichi *et al.*, 2004; Adekunle *et al.*, 2010).

4.4. Analyse des profils peptidiques

L'analyse des profils peptidiques des boissons au cours du stockage a montré que la fermentation a permis une baisse des peptides de hauts poids moléculaires ainsi qu'une hausse des peptides de petits poids moléculaires tout au long du stockage. La libération des peptides de petits poids moléculaires peut être due à l'activité protéolytique du ferment de Bio-K+ au cours du temps. En effet, Nielsen *et al.* (2009) ont observé que l'activité protéolytique des bactéries pouvait continuer au cours du stockage. De plus, les petits peptides sont mieux absorbés que les grosses protéines, et donc la digestibilité protéique et la qualité protéique peut être améliorée après l'hydrolyse des protéines par la fermentation (Grimble, 1994; Koopman *et al.*, 2009; Berrazaga *et al.*, 2018).

4.5. Analyses microbiologiques

Une réduction plus importante de la concentration de *Lactobacillus* spp. a été observée pour la boisson PRF avec une réduction de 1 log au cours du stockage contre une réduction de 0.26 log pour CF. Cette baisse peut être due à l'accumulation d'acide lactique dans le produit ou encore au fait d'une utilisation trop rapide des nutriments par les bactéries présentes en concentration très élevée au début du stockage dans le produit PRF. Cette réduction de 1 log reste faible compte tenu de l'étendue de la durée de stockage. En effet, beaucoup d'études ont observé des baisses de 1 log ou plus pour des boissons probiotiques dont le stockage était de 3 à 5 semaines seulement (Sodini *et al.*, 2002; Martín-Diana *et al.*, 2003; Ortakci & Sert, 2012). La boisson PRF, en portion d'une bouteille de 98 g, contenait 10.4 log au bout de 143 jours de stockage, ce qui est bien supérieur au minimum de 9 log par portion demandé par l'agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA, 2019)

4.6. Analyses sensorielles

Les résultats des analyses sensorielles ont montré que la boisson PRF était particulièrement appréciée tout au long du stockage pour son apparence/sa couleur et pour sa texture. Les notes terreuses et poudreuses associées au pois (Vara-Ubol *et al.*, 2004; Murat *et al.*, 2013) ont fait baisser les scores associés à la saveur de la boisson PRF, se situant entre « m'est indifférent » et « me plaît modérément » contrairement à la boisson CF dont les notes se situaient entre « me plaît modérément » et « me plaît beaucoup ». Contrairement à la boisson CF, la boisson PRF ne contenait pas d'arôme spécifique, ceci pourrait expliquer ces résultats.

CHAPITRE 7 : CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce projet avait pour but de développer une nouvelle boisson probiotique fermentée à base de riz et enrichie en protéines végétales et d'analyser l'effet de la fermentation ainsi que l'effet de l'enrichissement en protéines sur les propriétés physico-chimiques et sur la digestibilité protéique de la boisson. Il existe peu de recherches sur l'effet de la fermentation lactique sur la digestibilité protéique des protéines végétales et en particulier des concentrés ou isolats de protéines de chanvre, de pois et de riz. De nombreuses recherches ont été effectuées sur les probiotiques *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 et leurs effets bénéfiques sur la santé, mais c'est la première étude qui analyse l'effet de ces bactéries sur les valeurs nutritives d'une boisson. Cette étude a permis d'observer que la fermentation lactique avait entraîné notamment une baisse de la viscosité des boissons, la libération de peptides de petits poids moléculaires, et une augmentation de la qualité protéique. Elle a aussi permis d'observer que l'enrichissement en protéines couplé à la fermentation lactique avait entraîné, notamment, une augmentation de la quantité de peptides de petits poids moléculaires libérés, une augmentation de la digestibilité protéique *in vitro*.

La boisson développée est riche en protéines de pois et de riz, avec 13% de protéines, elle a une très bonne digestibilité, un CEP élevé, signifiant la très bonne qualité du mélange protéique, et elle atteint la valeur maximale de PDCAAS. Elle conserve également un grand nombre de probiotiques viable tout au long du stockage avec 10.4 log d'UFC après 143 jours à 4 °C. Au niveau sensoriel, la boisson est principalement appréciée pour sa texture et son apparence.

Cette nouvelle boisson fonctionnelle possède une source de protéines complètes et de très bonnes qualités. Elle répond à la demande des consommateurs qui souhaitent des produits sains, ayant des bénéfices pour la santé et de bonnes valeurs nutritionnelles. Cette boisson pourrait être adaptée pour plusieurs types de personnes, telles que les personnes sportives, les personnes

âgées ou jeunes, les végétariens ou encore les personnes intolérantes au lactose. Également, cette boisson pourrait bénéficier d'allégations nutritionnelles relatives aux protéines et être qualifiée comme « source de protéines » au Canada et comme « excellente source de protéines » aux États-Unis.

Dans la poursuite de cette étude, d'autres expériences pourraient être réalisées. Il serait intéressant d'analyser l'activité antioxydante des peptides libérés suite à la fermentation et au stockage. Ces peptides pourraient être des peptides bioactifs et donc avoir des effets bénéfiques pour la santé humaine. Également, un agent masquant ou un arôme spécifique pourrait être développé afin d'améliorer la saveur de la boisson enrichie en protéines de pois et de riz. Aussi, les différents effets du ferment de Bio-K+ ont été montrés dans cette étude, toutefois, d'autres souches de *Lactobacillus* ou d'autres bactéries lactiques pourraient également être étudiées et comparées.

Références

- Abdel-Aal, E.-S. (2008). Effects of baking on protein digestibility of organic spelt products determined by two in vitro digestion methods. *LWT - Food Science and Technology*, 41(7), 1282–1288.
- ACIA. (2019). Allégation santé sur les étiquettes des aliments – Allégations relatives aux probiotiques. Agence canadienne d'inspection des aliments, gouvernement du Canada. <https://www.inspection.gc.ca/exigences-en-matiere-d-etiquetage-des-aliments/etiquetage/industrie/allegations-sante/fra/1392834838383/1392834887794?chap=10>. (Consulté le 1er juin 2020).
- Adekunte, A. O., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Scannell, A. G. M., & O'donnell, C. P. (2010). Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, 122(3), 500-507.
- Agboola, S., Ng, D., & Mills, D. (2005). Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates. *Journal of Cereal Science*, 41(3), 283-290.
- Akalin, A. S., Göncü, S., Ünal, G., & Fenderya, S. E. R. A. P. (2007). Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced-fat probiotic yogurt during storage. *Journal of Food Science*, 72(7), M222-M227.
- Akin, Z., & Ozcan, T. (2017). Functional properties of fermented milk produced with plant proteins. *LWT – Food Science and Technology*, 86, 25-30.
- Berrazaga, I., Mession, J. L., Laleg, K., Salles, J., Guillet, C., Patrac, V., ... & Husson, F. (2019). Formulation, process conditions, and biological evaluation of dairy mixed gels containing fava bean and milk proteins: Effect on protein retention in growing young rats. *Journal of Dairy Science*, 102(2), 1066-1082.
- Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R., & Burlingame, B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S183-S211.
- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S. H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537-546.
- Chapman, D. G., Castillo, R., & Campbell, J. A. (1959). Evaluation of protein in foods: 1. A method for the determination of protein efficiency ratios. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(5), 679-686.
- Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 11(7), 254–262.
- Coda, R., Rizzello, C. G., Pinto, D., & Gobbetti, M. (2012). Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1087-1096.

Coles, L., Moughan, P., & Darragh, A. (2005). In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 421–444.

Corgneau, M., Gaiani, C., Petit, J., Nikolova, Y., Banon, S., Ritié-Pertusa, L., Le, D. T. L., Scher, J. (2019). Nutritional quality evaluation of commercial protein supplements. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(8), 2586–2594.

Crews 3rd, E. L., Fuge, K. W., Oscari, L. B., Holloszy, J. O., & Shank, R. E. (1969). Weight, food intake, and body composition: effects of exercise and of protein deficiency. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 216(2), 359-363.

Cruz, G. A. D. R., Oliveira, M. G. D. A., Pires, C. V., Gomes, M. R. D. A., Costa, N. M. B., Brumano, M. H. N., & Moreira, M. A. (2003). Protein Quality and in Vivo Digestibility of Different Varieties of Bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Brazilian Journal of Food Technology*, 2, 157-162.

Deshpande, R. P., Chinnan, M. S., & Phillips, R. D. (2008). Process development of a chocolate-flavoured peanut–soy beverage. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(5), 886-894.

Di Pasquale, M. G. (2007). Amino acids and proteins for the athlete: *The anabolic edge*. CRC Press.

Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., & Yang, H. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolyzates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107(4), 1485-1493.

Ekholm, P., Virkki, L., Ylinen, M., & Johansson, L. (2003). The effect of phytic acid and some natural chelating agents on the solubility of mineral elements in oat bran. *Food Chemistry*, 80(2), 165–170.

FAO & WHO. (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. Report of a joint WHO/FAO/UNU expert consultation. Geneva, Switzerland. (WHO technical report series, No. 935).

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1991). Protein Quality Evaluation: Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation-Bethesda, MD 4-8 December 1989. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Fernández-Quintela, A., Macarulla, M. T., Del Barrio, A. S., & Martínez, J. A. (1997). Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51(4), 331-341.

Franczyk, A. (2018). Evaluation of in vitro methodology to determine protein digestibility and quality of plant-based proteins. Master's thesis. University of Manitoba, Winnipeg.

Fredrikson, M., Biot, P., Alming, M. L., Carlsson, N.-G., & Sandberg, A.-S. (2001). Production Process for High-Quality Pea-Protein Isolate with Low Content of Oligosaccharides and Phytate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1208–1212.

- Friedman, M. (1996). Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 6-29.
- Gilani, G. S., Xiao, C. W., & Cockell, K. A. (2012). Impact of Antinutritional Factors in Food Proteins on the Digestibility of Protein and the Bioavailability of Amino Acids and on Protein Quality. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S315–S332.
- Gilani, G. S., & Lee, N. (2003). PROTEIN| Quality. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 4847-4854.
- Girgih, A. T., He, R., Malomo, S., Offengenden, M., Wu, J., & Aluko, R. E. (2014). Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. *Journal of Functional Foods*, 6, 384-394.
- Grimble, G. (1994). The significance of peptides in clinical nutrition. *Annual Review Nutrition*, 14, 419-447.
- Health Canada. (1981). Determination of protein rating, Official method FO-1. Health Protection Branch, Ottawa, Canada.
- Hoogenkamp, H., Kumagai, H., & Wanasundara, J. (2017). Rice Protein and Rice Protein Products. *Sustainable Protein Sources*, 47–65.
- House, J. D., Neufeld, J., & Leson, G. (2010). Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11801–11807.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1–12.
- Kannan, S., Nielsen, S. S., & Mason, A. C. (2001). Protein digestibility-corrected amino acid scores for bean and bean– rice infant weaning food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 5070-5074.
- Khattab, R. Y., Arntfield, S. D., & Nyachoti, C. M. (2009). Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments, Part 1: Protein quality evaluation. *LWT-food Science and Technology*, 42(6), 1107-1112.
- Koopman, R., Crombach, N., Gijzen, A. P., Walrand, S., Fauquant, J., Kies, A. K., ... Loon, L. J. V. (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.
- Kramer, M., Obermajer, N., Matijašić, B. B., Rogelj, I., & Kmetec, V. (2009). Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(6), 1137-1147.
- Krehbiel, C. R., & Matthews, J. C. (2003). Absorption of amino acids and peptides. *Amino acids in animal nutrition*, 5(2), 41.

Magala, M., Kohajdova, Z., Karovičová, J., Greifova, M., & Hojerova, J. (2015). Application of lactic acid bacteria for production of fermented beverages based on rice flour. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(5), 458-463.

Malomo, S. A., & Aluko, R. E. (2015). Conversion of a low protein hemp seed meal into a functional protein concentrate through enzymatic digestion of fibre coupled with membrane ultrafiltration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31, 151–159.

Martín-Diana, A. B., Janer, C., Peláez, C., & Requena, T. (2003). Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 13(10), 827-833.

Mathai, J. K., Liu, Y., & Stein, H. H. (2017). Values for digestible indispensable amino acid scores (DIAAS) for some dairy and plant proteins may better describe protein quality than values calculated using the concept for protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS). *British Journal of Nutrition*, 117(4), 490-499.

Matar, C., Amiot, J., Savoie, L., & Goulet, J. (1996). The Effect of Milk Fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the Release of Peptides During In Vitro Digestion. *Journal of Dairy Science*, 79(6), 971–979.

Matthews, D. M., & Adibi, S. A. (1976). Peptide absorption. *Gastroenterology*, 71(1), 151-161.

Mensa-Wilmot, Y., Phillips, R., & Hargrove, J. (2001). Protein quality evaluation of cowpea-based extrusion cooked cereal/legume weaning mixtures. *Nutrition Research*, 21(6), 849–857.

Murat, C., Bard, M.-H., Dhalleine, C., & Cayot, N. (2013). Characterisation of odour active compounds along extraction process from pea flour to pea protein extract. *Food Research International*, 53(1), 31–41.

Nature. (2014). Protein function. Scitable by Nature Education. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/protein-function-14123348/> (Consulté le 20 décembre 2019).

Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K. I., & Otte, J. (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *International Dairy Journal*, 19(3), 155-165.

Nnam, N. M., & Obiakor, P. N. (2003). Effect of fermentation on the nutrient and antinutrient composition of baobab (*Adansonia digitata*) seeds and rice (*Oryza sativa*) grains. *Ecology of Food and Nutrition*, 42(4-5), 265-277.

Oliveira, M. N. D., Sodini, I., Remeuf, F., & Corrieu, G. (2001). Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 11(11-12), 935-942.

Ortakci, F., & Sert, S. (2012). Stability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in yogurt and in an artificial human gastric digestion system. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 6918-6925.

Paquet, É., Hussain, R., Bazinet, L., Makhoulouf, J., Lemieux, S., & Turgeon, S. L. (2014). Effect of processing treatments and storage conditions on stability of fruit juice based beverages enriched

with dietary fibers alone and in mixture with xanthan gum. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 131-138.

Raikos, V., Neacsu, M., Russell, W., & Duthie, G. (2014). Comparative study of the functional properties of lupin, green pea, fava bean, hemp, and buckwheat flours as affected by pH. *Food Science & Nutrition*, 2(6), 802-810.

Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2005). Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9), 562-569.

Rani, S., Pooja, K., & Pal, G. K. (2018). Exploration of rice protein hydrolysates and peptides with special reference to antioxidant potential: Computational derived approaches for bio-activity determination. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 61-70.

Raveschot, C., Cudennec, B., Coutte, F., Flahaut, C., Fremont, M., Drider, D., & Dhulster, P. (2018). Production of Bioactive Peptides by Lactobacillus Species: From Gene to Application. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2354.

Roberts, P. R., Burney, J. D., Black, K. W., & Zaloga, G. P. (1999). Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion*, 60(4), 332-337.

Roy, F., Boye, J. I., & Simpson, B. K. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, 43(2), 432-442.

Russo, R., & Reggiani, R. (2015). Evaluation of protein concentration, amino acid profile and antinutritional compounds in hempseed meal from dioecious and monoecious varieties. *American Journal of Plant Sciences*, 6, 14-22.

Rutherford, S. M., Fanning, A. C., Miller, B. J., & Moughan, P. J. (2015). Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats. *The Journal of Nutrition*, 145(2), 372-379.

Sodini, I., Lucas, A., Oliveira, M. N., Remeuf, F., & Corrieu, G. (2002). Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2479-2488.

Tavano, O. L., Neves, V. A., & Júnior, S. I. D. S. (2016). In vitro versus in vivo protein digestibility techniques for calculating PDCAAS (protein digestibility-corrected amino acid score) applied to chickpea fractions. *Food Research International*, 89, 756-763.

Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Bosnea, L. A., & Kopsahelis, N. (2019). Probiotics in food systems: Significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. *Nutrients*, 11(7), 1591.

Tulbek, M. C., Lam, R. S. H., Asavajaru, P., & Lam, A. (2017). Pea: A sustainable vegetable protein crop. In *Sustainable protein sources* (pp. 145-164). Academic Press.

Tyl, C., & Sadler, G. D. (2017). pH and titratable acidity. In *Food analysis* (pp. 389-406). Springer, Cham.

Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77(1), R11-R24.

Urbano, G., López-Jurado, M., Ławomir Frejngel, S., Gómez-Villalva, E., Porres, J. M., Frías, J., ... & Aranda, P. (2005). Nutritional assessment of raw and germinated pea (*Pisum sativum* L.) protein and carbohydrate by in vitro and in vivo techniques. *Nutrition*, 21(2), 230-239.

Vichi, A., Ferrari, M., & Davidson, C. L. (2004). Color and opacity variations in three different resin-based composite products after water aging. *Dental Materials*, 20(6), 530-534.

Vara-Ubol, S., Chambers, E., Chambers, D.H. (2004). Sensory characteristics of chemical compounds potentially associated with beany aroma in foods. *Journal of Sensory Studies*, 19(1), 15-26.

Vidal-Valverde, C., Frias, J., Hernández, A., Martín-Alvarez, P. J., Sierra, I., Rodríguez, C., ... & Vicente, G. (2003). Assessment of nutritional compounds and antinutritional factors in pea (*Pisum sativum*) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(4), 298-306.

Vinderola, C. G., Bailo, N., & Reinheimer, J. A. (2000). Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33(2), 97-102.

Vithana, N. O., Mason, S. L., Bekhit, A. E. A., & Morton, J. D. (2011). The release of peptides by in-vitro digestion of fermented red deer (*Census elphus*) and cow (*Bos taurus*) milk. In Proceedings of the Nutrition Society of New Zealand (Vol. 35, pp. 12-19). *Nutrition Society of New Zealand (Inc)*.

Wang, J., Guo, Z., Zhang, Q., Yan, L., Chen, W., Liu, X. M., & Zhang, H. P. (2009). Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei Zhang* in soymilk and bovine milk during storage. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2468-2476.

Wang, M., Hettiarachchy, N., Qi, M., Burks, W., & Siebenmorgen, T. (1999). Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 411-416.

Webb Jr, K. E. (1990). Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. *Journal of Animal Science*, 68(9), 3011-3022.

Yang, L., Chen, J., Xu, T., Qiu, W., Zhang, Y., Zhang, L., ... & Liu, H. (2011). Rice protein extracted by different methods affects cholesterol metabolism in rats due to its lower digestibility. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(11), 7594-7608.

Zare, F., Boye, J. I., Champagne, C. P., Orsat, V., & Simpson, B. K. (2012a). Probiotic milk supplementation with pea flour: Microbial and physical properties. *Food and Bioprocess Technology*, 6(5), 1321-1331.