

La compréhension moléculaire au service d'une alimentation innovante

Christian Campargue est biochimiste, directeur des sciences analytiques au centre de recherche de Danone.

1 Introduction

Un peu d'histoire : la science au cœur de Danone

Début xx^e siècle, des centaines de milliers d'Espagnols souffrent de problèmes digestifs, dus en partie à la malnutrition. Immigrant grec vivant à Barcelone, Isaac Carasso (**Figure 1**) est marqué par la situation des enfants. Il se penche alors sur les travaux d'Élie Metchnikoff, lauréat du prix Nobel considéré par beaucoup comme le père de l'immunité naturelle. Cet intérêt pour les recherches de Metchnikoff conduit Carasso à défendre les bienfaits du yaourt pour la santé. Il voit dans ce

produit laitier fermenté traditionnel des Balkans une solution possible aux problèmes



Figure 1

Photo d'Isaac Carasso, fondateur de Danone, et ses premiers yaourts.

nutritionnels généralisés de son pays d'adoption.

Appliquant les connaissances de pointe de l'Institut Pasteur à son yaourt, Carasso entame un parcours d'étude, de maîtrise et d'amélioration du yaourt, avec pour objectif de lutter contre la malnutrition des enfants espagnols.

Il baptise son entreprise Danone, en l'honneur de son fils Daniel, qui poursuivra plus tard sa mission. En 1919, Isaac vend d'abord son yaourt dans les pharmacies, en tant que médicament. Celui-ci acquiert rapidement une réputation de qualité et de bienfaits pour la santé, ce qui contribue à faire de Danone une marque de confiance en Espagne et ouvre la voie à son expansion. En ouvrant un premier magasin à Paris en 1929, Daniel Carasso étend ses activités à la France. Danone continue à mettre

l'accent sur les bienfaits du yaourt pour la santé, tout en accordant une attention croissante au goût, pour rendre ses produits aussi agréables à consommer qu'ils sont sains.

La science et la recherche chez Danone ont donc commencé par le yaourt, les ferments et la santé intestinale, et particulièrement les biotiques. En 2007, l'acquisition de Royal Numico, qui apporte une expertise inégalée dans le domaine de la santé, fondée sur plus de 100 ans de recherche en nutrition infantile et médicale, achève la transformation de Danone en une entreprise axée sur la santé par l'alimentation, avec un portefeuille couvrant toutes les étapes de la vie.

Elle s'étendra à des problématiques extrêmement variées comme l'immunité, l'allergie, la compréhension du lait maternel, mais aussi

LES RACINES ET L'AVENIR DE DANONE SONT BASÉS SUR LA DIFFÉRENTIATION PAR LA SCIENCE



LES FERMENTS,
LA SANTÉ INTESTINALE,
LES BIOTIQUES



L'IMMUNITÉ, L'ALLERGIE,
LE LAIT MATERNEL, LA
NUTRITION MÉDICALE
ET L'HYDRATATION



LA DURABILITÉ
LES
EMBALLAGES

APPORTER LA SANTÉ PAR L'ALIMENTATION AU PLUS GRAND NOMBRE



LA SCIENCE AU COEUR DE DANONE

3

Figure 2

La mission de Danone.

la nutrition médicale moins connue par les consommateurs, l'hydratation et enfin le développement durable et les emballages qui sont des axes clés de l'innovation de Danone.

L'objectif et la mission clé de Danone sont d'apporter la santé par l'alimentation au plus grand nombre, et cela tout au long de la vie (**Figures 2 et 3**).

Pour cela, Danone met sur le marché une gamme de produits extrêmement variés destinés à répondre aux besoins nutritionnels et à l'équilibre alimentaire des consommateurs à différents stades de la vie.

Notre portefeuille de marques couvre des produits pour les bébés jusqu'aux seniors, que ce soient des produits laitiers ou des produits végétaux, des eaux minérales et des boissons.

Dans le cadre de notre démarche d'innovation dans ce large domaine, nous sommes amenés à relever de multiples challenges en mobilisant l'expertise de nos équipes pour optimiser nos formulations. Cela implique une sélection rigoureuse des matières premières, des ingrédients ainsi que des process¹ utilisés. Ces innovations permettent le développement de produits adaptés et différenciés, tout en intégrant une démarche de responsabilité environnementale.

2 La science derrière un yaourt

Pour accompagner ces innovations et répondre à ces

exigences nutritionnelles et sensorielles, la caractérisation moléculaire des produits est essentielle. La recherche analytique s'appuie sur une équipe multidisciplinaire d'ingénieurs et de techniciens analystes : chimistes, biochimistes, physiiciens et microbiologistes.

Ces caractérisations sont conduites en interne, mais s'appuient aussi sur des partenaires externes, notamment des équipes académiques ou des start-up qui vont nous apporter des expertises complémentaires et de nouveaux outils d'analyse innovants.

On va parler de chimie dans ce chapitre, et plus particulièrement de biochimie², approche indispensable à la caractérisation moléculaire des produits fermentés. Les mesures physiques sont également essentielles pour analyser le comportement et la structure des molécules afin

2. Étude des réactions chimiques au sein des êtres vivants.



Figure 3

Un portefeuille de produits de Danone couvrant toutes les étapes de la vie.

1. Procédés.

de répondre aux exigences de texture des produits.

Enfin, nous avons vu que la fermentation est à l'origine du Groupe Danone. La microbiologie³ et la biologie moléculaire sont évidemment des domaines clés pour une meilleure connaissance du comportement de nos bactéries lactiques.

Les sciences analytiques sont très importantes et représentent un accélérateur d'innovation. Notre mission est de caractériser les produits, ce qui nécessite une connaissance approfondie des ingrédients, des matières premières et de l'impact des procédés sur la formulation. C'est ce qui nous permet de mieux

comprendre nos produits au regard des préférences des consommateurs, et particulièrement les liens entre les descripteurs sensoriels, les molécules analysées et leurs caractéristiques chimiques, mais aussi les paramètres physiques. Nous traduisons ensuite ces liens en leviers technologiques sur lesquels les développeurs peuvent jouer pour mettre sur le marché les produits qui correspondent le mieux aux attentes des consommateurs.

2.1. Un yaourt, c'est quoi ?

Avant de partager des exemples concrets de caractérisation moléculaire, revenons à la chimie ou plutôt à la biochimie du yaourt.

Un yaourt, c'est, en fait, la rencontre essentielle entre

3. Science des micro-organismes.



Figure 4

Les bactéries et les molécules produites dans un yaourt.

une matière première, le lait de vache, et des bactéries baptisées par conséquent « lactiques » (Figure 4). Ces bactéries trouvent dans le lait tout ce dont elles ont besoin pour se développer et se multiplier : une source azotée⁴ avec les protéines, une source carbonée⁵ avec les sucres.

Si l'on se concentre sur la partie glucidique, en l'occurrence le lactose, elles le métabolisent pour produire de l'acide lactique. Cet acide lactique est important parce qu'il diminue le pH du lait. Lorsque ce pH atteint 4,6, qui a la particularité d'être exactement le point isoélectrique⁶ des caséines⁷, il entraîne leur déstabilisation. À ce point isoélectrique, les caséines, devenues neutres, se déstabilisent et s'agrègent entre elles. Et c'est là que le miracle de la texture du yaourt apparaît, grâce à ces interactions protéiques.

2.2. La texture : le rôle des bactéries lactiques

Mais il n'y a pas que les protéines qui créent de la texture dans les produits laitiers fermentés. Un premier exemple concerne la capacité des ferments à produire des sucres particuliers : les exopolysaccharides⁸.

Prenons l'exemple d'un Activia (Figure 5), mais cela pourrait être n'importe quel autre produit laitier fermenté.

Les exopolysaccharides sont des sucres polymères⁹ que les bactéries produisent. La création de liaisons entre sucres simples permet de construire un polysaccharide de très grande taille : on peut atteindre plusieurs millions de daltons¹⁰, ce qui est énorme par rapport aux protéines.

Danone dispose d'une collection, appelée « souchothèque », contenant plus de 2 000 micro-organismes différents dont certains ont la capacité de produire ces polysaccharides de très grande taille.

Les enchaînements de monosaccharides, motifs de base de ces polysaccharides, peuvent être extrêmement différents selon la bactérie

9. Longues molécules constituées d'un motif répété.

10. Unité de masse d'un atome. Un dalton équivaut environ à la masse d'un atome d'hydrogène.

4. Qui contient des atomes d'azote.
5. Qui contient des atomes de carbone.
6. pH pour lequel la charge électronique globale de la molécule est nulle.
7. Protéines du lait.
8. Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères glucidiques de haut poids moléculaire produits par des micro-organismes comme les bactéries lactiques dans leur environnement extérieur (ici le yaourt).



Figure 5

Activia, une gamme de yaourts Danone pour toutes les générations.

utilisée. Si l'on regarde le rhamnose, la galactosamine, le galactose, le glucose, en fonction des souches bactériennes sélectionnées, on pourra obtenir des motifs très différents d'exopolysaccharides (**Figure 6, en bas à droite**).

Le fait d'avoir des motifs différents entraîne des textures différentes. Comme on peut le voir sur les cuillères représentées au-dessus (**Figure 6**), on peut avoir des exopolysaccharides qui confèrent des textures plus liquides, qu'on appelle des « textures filantes », jusqu'à des textures beaucoup plus fermes, dites « cassantes ». On va donc pouvoir jouer sur les souches pour donner des textures d'intérêt à nos produits.

2.3. Les protéines au service de la texture

Comme nous l'avons vu précédemment, au point isoélectrique de 4,6, les caséines se déstructurent, coagulent et amènent la texture au produit laitier fermenté. Les protéines sont donc importantes si l'on veut obtenir une bonne texture à nos produits. Prenons l'exemple de HiPRO (**Figure 7**), un produit riche en protéines lancé il y a quelques années à destination des sportifs : environ trois fois plus de protéines que retrouvées naturellement dans le lait.

La qualité des protéines et l'état des protéines sont importants pour garantir les qualités d'un produit laitier à destination des sportifs.



Figure 6

Influence du type de bactéries lactiques sur la composition des exopolysaccharides et sur la texture, en fonction des différentes combinaisons de monosaccharides.

Sur le profil chromatographique d'un produit HiPRO obtenu par chromatographie liquide¹¹ représenté ici (*Figure 8, à gauche*), chaque pic caractérise spécifiquement une protéine laitière. Il y a différents types de protéines laitières : les caséines sur la partie gauche du profil et les protéines sériques sur la partie droite. La surface du pic est proportionnelle à la quantité de protéines détectée. Quand on compare les deux profils chromatographiques¹², on voit, par comparaison avec le lait, le profil en noir en dessous, que l'on a exactement le même profil chromatographique. Cela indique que les

11. Technique séparative d'analyse chimique.

12. Allures des courbes de chromatographie.



Figure 7

HiPRO, un produit laitier riche en protéines.

caractéristiques physicochimiques des protéines sont préservées, assurant une bonne qualité de protéines pour la récupération musculaire.

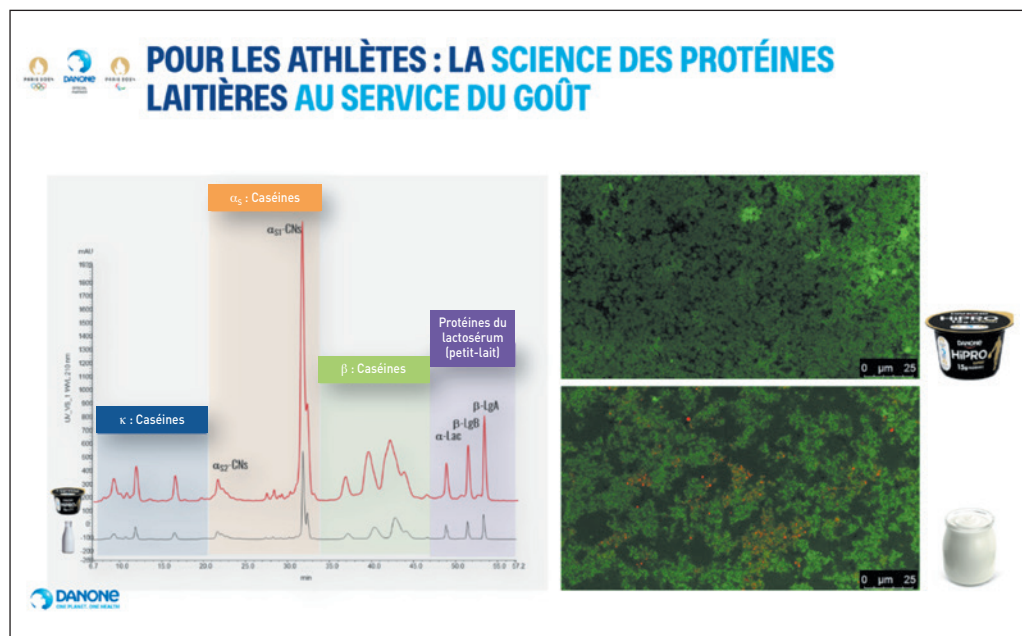


Figure 8

À gauche, analyse chromatographique des protéines de HiPRO. À droite, images de microscopie confocale.

Le deuxième aspect de cette qualité protéique, c'est la création de la texture dans le produit. Si l'on regarde les images de microscopie (**Figure 8, à droite**), elles ont été obtenues par microscopie confocale. La microscopie confocale permet, dans ce cas précis, de révéler et de détecter spécifiquement, sous un faisceau laser particulier, les protéines en vert et la matière grasse en rouge. L'image du haut (**Figure 8**) représente l'HiPRO, celle du bas correspond à un yaourt classique : on voit bien que le réseau protéique créé est beaucoup plus dense en haut qu'en bas. C'est ce qui donne cette texture dense particulière à HiPRO, adaptée aux attentes des consommateurs.

2.4. Les ferments et le goût des yaourts

Si la texture est un facteur clé pour la perception sensorielle, l'aromatique est aussi important. On a la chance, par le biais des bactéries, comme on l'a vu pour les exopolysaccharides, de pouvoir disposer d'une variété de souches extrêmement importante. Lors de la fermentation, ces bactéries produisent des composés volatils de façon différente en fonction du type de micro-organisme étudié.

On peut ainsi clustériser¹³ les bactéries lactiques sur leur capacité à produire des métabolites¹⁴ de fermentation, et plus précisément les composés volatils (chaque petit rond

de la **figure 9** correspond à une bactérie différente¹⁵). On peut par exemple voir qu'on a un cluster¹⁶, le plus important en jaune pâle (**Figure 9, à gauche**), qui génère une classe organoleptique¹⁷ associée à une production importante de diacétyle, qui donne des notes « crème-beurre », qui sont des notes positives dans un produit laitier. C'est aussi le cas avec l'acétaldéhyde (**Figure 9, en haut à droite**), qui va donner des notes fraîches d'agrumes, agréables, et qui contribue à la note « yaourt frais ». Par contre, cela peut parfois amener des notes un peu moins désirées, comme on peut le voir avec l'oct-1-èn-3-ol (**Figure 9, en bas à droite**), qui donne des notes plutôt « terreuses, champignon », ou l'acide acétique produit par certaines bactéries, comme *Bifidus*, qui apporte un goût beaucoup plus acide en bouche que l'on peut définir comme « vinaigre ». On dispose d'une panoplie d'options possibles avec les micro-organismes avec lesquels nous allons pouvoir jouer.

Restons sur l'exemple de HiPRO pour explorer l'univers des saveurs possibles selon les ferments utilisés et les process mis en œuvre. Plus de 200 molécules sont détectées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse dans l'HiPRO vanille. Environ 25 d'entre elles contribuent majoritairement à son goût, et permettent d'établir la roue des saveurs (roue organoleptique, **Figure 10**).

13. Anglicisme qui signifie « grouper ».

14. Molécules organiques issues d'un métabolisme.

15. Ici, molécules odorantes.

16. Groupe.

17. Famille de goûts ou d'odeurs.

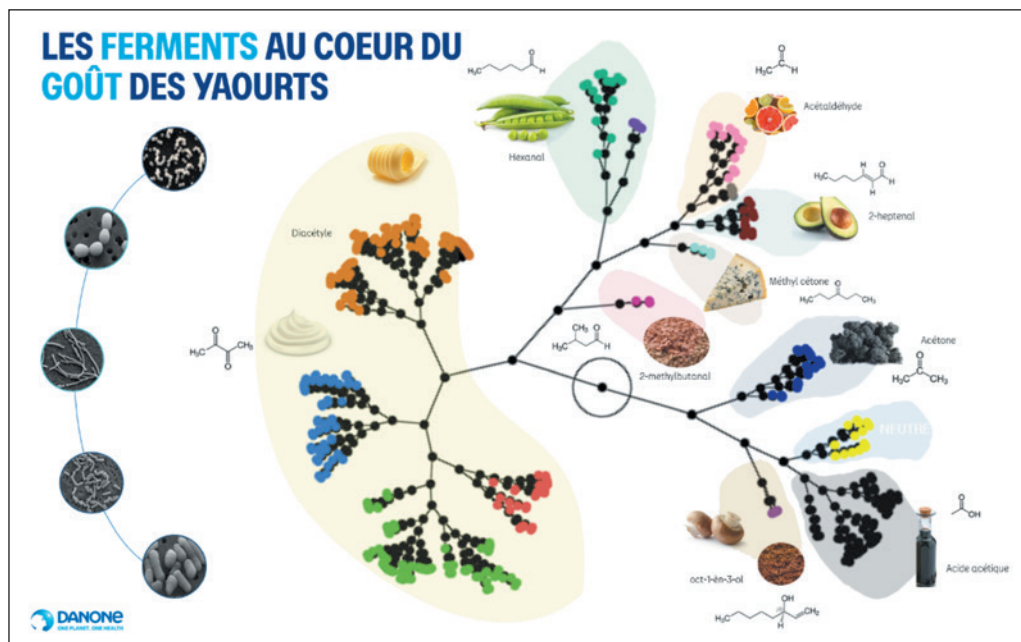


Figure 9

Clustérisation des souches de bactéries lactiques en fonction des molécules volatiles produites ayant un impact organoleptique.

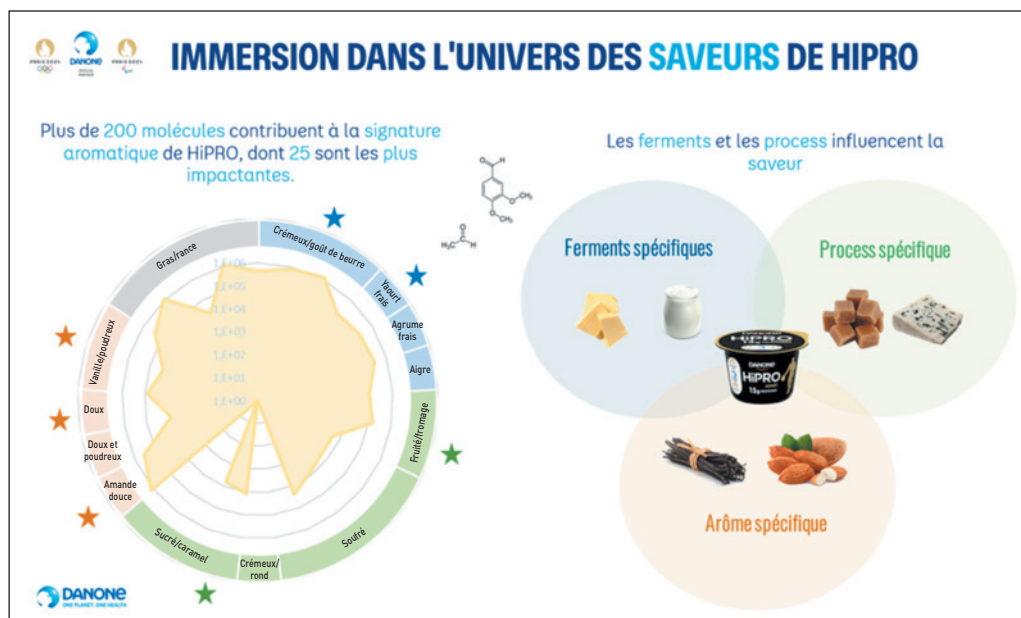


Figure 10

Roue organoleptique des composés volatiles dans HiPro.

Ces 25 molécules les plus importantes sont regroupées dans des classes organoleptiques, ce qui crée la roue à gauche de la **figure 10** représentant la signature de l'HiPRO vanille. En fonction des types de molécules, on sait les associer à leur origine. Les étoiles correspondent à certaines molécules clés. Parmi les étoiles bleues, on peut noter la présence du diacétyl et de l'acétaldéhyde vus précédemment. Les ferments spécifiques utilisés dans HiPRO permettent de produire de façon marquée ces molécules amenant ces notes positives crème-beurre et yaourt, composant la zone bleue. La partie verte représente certains composés volatils créés lors du process, notamment par traitement thermique, et qui apportent des notes fruitées ou rondes, équilibrant bien celles issues des ferments. Enfin, pour la partie arôme vanille, les molécules volatiles le composant équilibrent et apportent une rondeur, une perception

agréable de cet arôme vanille en bouche.

3 Caractérisation moléculaire et amélioration des procédés

Nous avons vu les deux axes qui sont extrêmement importants pour la partie sensorielle : la texture et l'aromatique. Voyons, avec l'exemple d'Aptamil (**Figure 11**), les bénéfices que peuvent apporter les procédés technologiques innovants.

Aptamil est un produit que nous avons développé par le biais de l'application d'un procédé technologique innovant développé au sein du Groupe Danone, appelé Nuturis®. L'objectif de ce procédé est de produire un globule gras¹⁸ extrêmement proche de celui du lait maternel afin d'en reproduire les bénéfices. Comme on le voit dans cet

18. Gouttelette de gras entourée d'une membrane.



Figure 11

Aptamil, un lait infantile en poudre nouvelle génération.



Figure 12

Schéma comparatif des globules gras de laits infantiles vs le lait maternel.

exemple (Figure 12), le globule gras de Nuturis et celui du lait maternel sont extrêmement proches en termes de structure et de taille, ce qui est moins le cas dans les formules infantiles standard, où le globule gras est environ 10 fois plus petit et plus simple.

Tout l'objet de notre travail consiste à nous assurer, par le biais d'approches analytiques, de la structure du globule gras, notamment l'homogénéité de sa répartition, mais aussi sa composition moléculaire, en particulier la partie protéique qui structure le globule gras. Cette spécificité confère un comportement différent par rapport aux formules infantiles standard.

Nous avons été confrontés, selon le type de procédé appliqué, à des comportements différents lors de la

solubilisation¹⁹ de la poudre de lait dans de l'eau chaude, en fonction de l'agitation et donc de l'énergie appliquée. Malgré la combinaison d'approches analytiques physicochimiques complémentaires déployées en interne, nous n'avons pas identifié de différences significatives de structure de la poudre pouvant expliquer une moins bonne solubilisation avec peu d'agitation.

Pour aller plus loin dans la caractérisation structurelle de la poudre de lait, nous avons réalisé une étude en partenariat avec le synchrotron SOLEIL. Grâce à l'accélérateur de particules, de hauts niveaux d'énergie permettent d'explorer avec plus de résolution la matière en profondeur. Comme

19. Dissolution de la poudre.

on peut le voir (*Figure 13, à droite*), en utilisant la micro-tomographie RX²⁰, nous avons constaté que la structure physique de la poudre pouvait expliquer un comportement différent de la migration de l'eau. Dans le cas où il y avait plus d'espaces entre les particules de poudre et des alvéolations²¹ plus importantes (*Figure 13, en haut à gauche*), la migration de l'eau chaude – et donc la solubilisation – était facilitée. Sur la base de ces résultats, nous avons pu savoir exactement quels paramètres process appliquer pour obtenir une poudre adaptée à une bonne solubilisation.

20. Technique d'imagerie 3D par rayons X.

21. Cavités, pores.

4 Analyse moléculaire et choix des matières premières

Je voulais finir avec un dernier exemple, concernant YoPRO (*Figure 14*), pour illustrer que l'innovation peut amener à relever des challenges inattendus.

Lors du développement de YoPRO, un produit riche en protéines, l'innovation ne posait aucun problème sur l'ensemble des formules, à l'exception de la formule cacao, que nous souhaitions lancer sur le marché. Cette recette présentait un aspect granuleux très visible et non acceptable.

Malgré les différents essais de formules et de process des développeurs, aucune solution ne permettait d'éviter ces

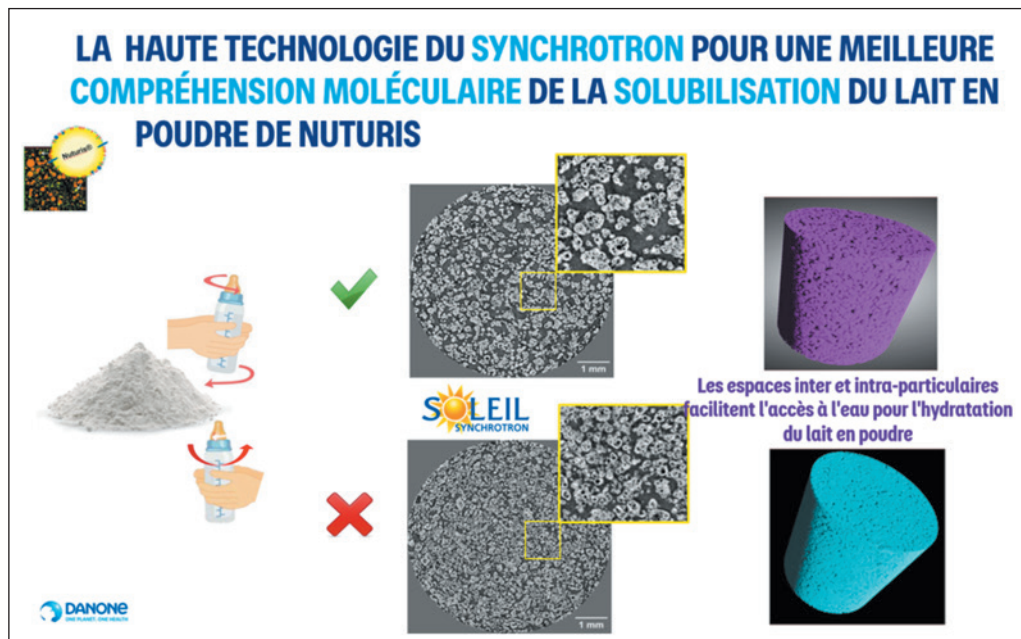


Figure 13

Structure micro-tomographique aux rayons X de la poudre infantile.

grains. En analysant le produit, et en nous concentrant sur la dimension protéines, nous avons découvert que l'agrégation²² des protéines était importante, en particulier en présence de cacao. Sur l'image en haut à gauche (**Figure 15**), en vert, on observe des particules marron, que l'on peut attribuer au cacao. Ce phénomène peut s'expliquer par la richesse en polyphénols²³ du cacao, que nous savons être un facteur pouvant favoriser l'agrégation des protéines. Nous avons donc retravaillé avec les fournisseurs pour obtenir des cacaos moins riches en polyphénols. Comme on peut le voir sur la

22. Agglomération, amas.

23. Famille de molécules issues de végétaux.



Figure 14

YoPRO, gamme de produits laitiers hyperprotéinés de Danone.

partie de droite (**Figure 15**), nous avons ainsi obtenu une texture lisse conforme aux attentes des consommateurs.

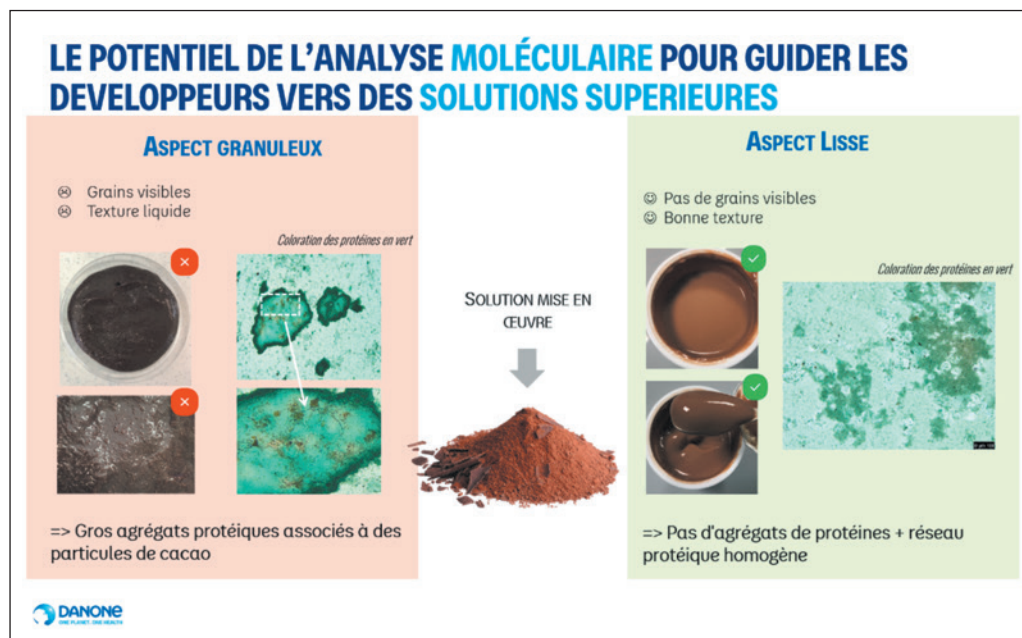


Figure 15

Photos et vues au microscope de la structure de produits laitiers YoPRO cacao.

Conclusion

Malgré la connaissance moléculaire approfondie de nos produits, il nous reste toujours des challenges à relever.

Il est important, par exemple, de se rapprocher du *in vivo* et de développer davantage la dynamique sensorielle, notamment sur les séquences aromatiques en bouche, ou la texture en bouche.

Le deuxième aspect est la physiologie bactérienne ainsi que la compréhension des interactions entre les bactéries lactiques dans nos produits fermentés.

Enfin, le digital et la gestion des données sont essentiels ; nous cherchons à adopter de nouvelles stratégies, notamment des approches d'intelligence artificielle, pour modéliser et prédire des comportements.

Pour conclure, l'ensemble de ces connaissances ne peut être atteint sans l'engagement quotidien d'experts passionnés dans l'équipe Analytical Sciences qui abordent les produits avec l'œil de l'enquêteur en mode « NCIS » ou « les Experts ».