

Développement d'un produit alimentaire à base d'extrait de houblon encapsulé dans une matrice d'alginate/chitosan.

T. GAIGNAUX
Dr Ir N. VELINGS
Ing. S. MEUNIER
ISICHt – Mons

Le houblon est largement reconnu pour son rôle bactériostatique dans l'industrie brassicole et il occupe également une place importante dans de nombreuses pharmacopées. Un produit à base de houblon pourrait donc trouver sa place sur un marché en plein essor constitué d'un nombre croissant de consommateurs qui préfèrent des produits alimentaires sains et pratiques. Ce projet de recherche, mené au CERISIC, porte sur le développement d'un produit alimentaire contenant de l'extrait de houblon encapsulé dans des microbilles d'alginate/chitosan afin de masquer l'amertume et la viscosité inhérentes à cet extrait.

Mots-clés : houblon, extrait de houblon, encapsulation, alginate, chitosan, gélification ionotropique, microbilles, produit alimentaire.

Hop is widely known for its use as a bacteriostatic agent in the brewing industry as well as its importance in numerous pharmacopeia. A hop containing product should therefore be well received on a growing market of consumers preferring healthy and practical foodstuffs. This research project, executed at the CERISIC, aims to develop a food product in which hop extract is encapsulated in microbeads of alginate/chitosan to mask the inherent bitterness and viscosity of this extract.

Keywords : hop, hop extract, encapsulation, alginate, chitosan, ionotropic gelation, microbeads, food product.

1. Contexte du projet

1.1. Houblon

De nos jours, le houblon *Humulus lupulus* est majoritairement utilisé comme matière première pour le brassage de la bière. Les acides et les huiles essentielles qu'il contient sont primordiaux pour conférer aux bières leurs saveurs et leurs arômes. Traditionnellement, le houblon est également ajouté durant le brassage pour aider à la préservation de la bière. Durant notre Histoire, le houblon était pourtant d'abord utilisé pour ses vertus bénéfiques pour la santé. Il contient donc des substances actives d'un point de vue pharmaceutique. Dans les champs de houblon (fig.1, à gauche), seules des plantes femelles non fécondées sont cultivées. Elles produisent des cônes (fig.1, à droite) à partir de leurs fleurs. Ce sont les glandes de lupuline qui présentent un intérêt pour les brasseurs et qui contiennent les principes actifs.

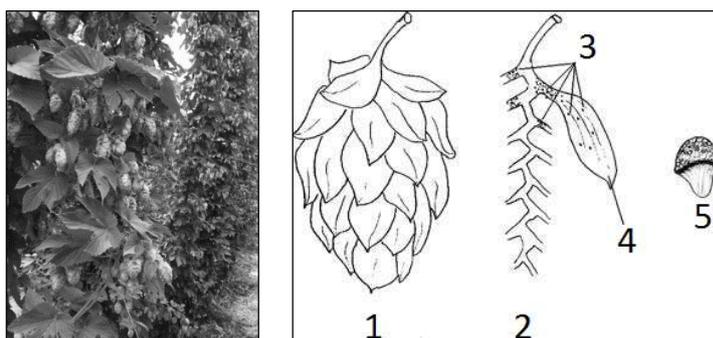


Figure 1 - Photo de plants de houblon cultivé en haies à gauche [1] et morphologie du houblon à droite (1 Cône femelle, 2 Axe, 3 Glandes de lupuline, 4 Feuille, 5 Glande de lupuline) [2].

Trois groupes de composés sont spécialement intéressants dans ces cônes : les résines de houblon, les agents aromatisants et les polyphénols [3]. Tout d'abord, les résines houblonnées représentent entre 5 et 20% du poids sec du cône de houblon. Elles contiennent l'ensemble des composés amérisants. Les composés majoritaires sont des acides α et β dont le pouvoir amérisant diffère. Les acides α s'isomérisent durant l'ébullition en cours de brassage. Les acides α principaux (fig.2) sont l'humulone (35 à 70% du total en acides α), la cohumulone (20 à 65%) et l'adhumulone (10 à 15%). Les acides β ont une faible solubilité dans l'eau et contribuent donc faiblement à l'amertume de la bière. Ensuite, les cônes possèdent entre 0,4 et 2% d'agents aromatisants. Ce sont des huiles essentielles qui sont responsables de l'arôme houblonné et du bouquet. Enfin, les polyphénols représentent entre 4 et 14% du cône en poids sec.

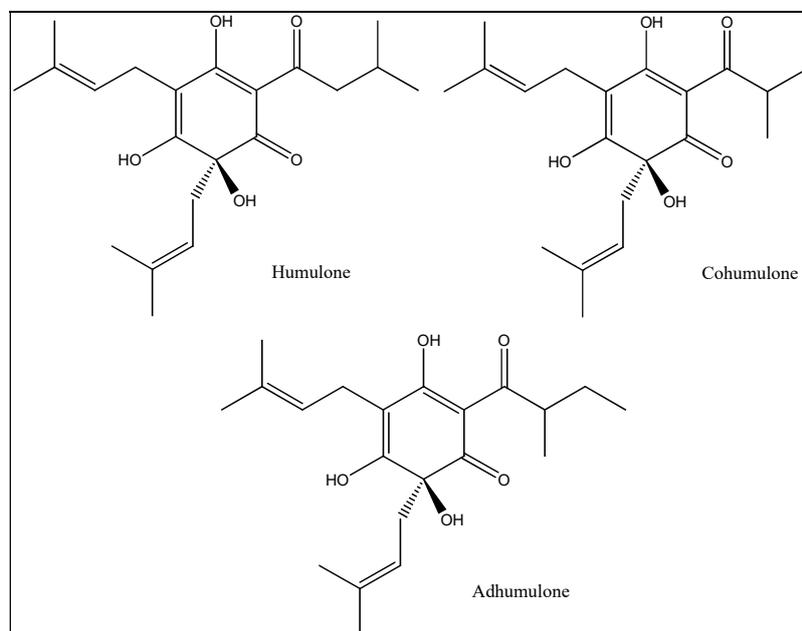


Figure 2 - Acides α majoritaires dans le houblon.

Les extraits de houblon sont obtenus par extraction au dioxyde de carbone supercritique à partir des pellets (des cônes séchés et pressés). Environ 25% de la charge initiale est extraite et 75% sont perdus sous forme de déchets végétaux. Les extraits au dioxyde de carbone, collants et résineux, contiennent, par proportion décroissante, des acides α (jusqu'à 65%), des acides β , des huiles, des cires et de l'eau. Des transformations peuvent être appliquées après extraction (fig.3) : on trouve ainsi des extraits dont les acides α sont pré-isomérisés, ou des extraits enrichis en arômes,... Les extraits contenant les composés intéressants du houblon sont trois extraits se présentant sous forme de pâte très visqueuse à température ambiante. Ces trois extraits (CO₂ Hop Extract, Isomerised Kettle Extract et Potassium-salt IKE) présentent l'avantage de contenir à la fois les acides α , β , et les huiles essentielles, dans des proportions reflétant celles des cônes de houblon de départ. Le tableau 1 reprend les concentrations moyennes pour ces extraits. Ce sont ces trois extraits, CO₂, IKE et PIKE, fournis par la société Yakima Chief, qui ont été utilisés dans le cadre de ce projet.

	Acides α	Iso- α - Acides	Acides β	Huiles
CO₂ Hop Extract	45 – 65 %	0 %	15 – 35 %	5 – 15 %
IKE/PIKE	< 2 %	35 – 65 %	10 – 30 %	< 15 %

Tableau 1 - Compositions de trois extraits de houblon [1].

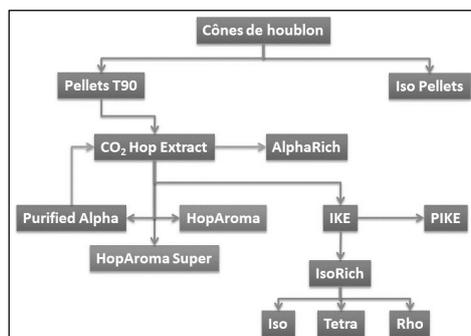


Figure 3 - Transformations du houblon par Yakima Chief [1].

Des publications scientifiques récentes ont confirmé que beaucoup de composés trouvés dans le houblon ont divers effets bénéfiques sur la santé. En 2004, une équipe de recherche japonaise démontra sur des rats qu'une ingestion d'extraits de malt et de houblon inhibe significativement le développement de cancers du côlon induits chimiquement [4]. Au même moment, une autre équipe japonaise menait une étude qui suggéra que les acides α isomérisés pouvaient améliorer la sensibilité à l'insuline chez des patients atteints de diabète de type 2 [5]. Un an plus tard, la même équipe poursuivit ses découvertes en montrant que les acides α isomérisés pouvaient prévenir l'obésité induite par régime alimentaire sur des rongeurs [6]. Il a été confirmé que la fraction polyphénolique du houblon et de certains extraits a une action protectrice significative au sein du plasma à la suite d'une oxydation forcée au peroxydant [7]. Une étude clinique suggéra également que les extraits de houblon pourraient alléger les désagréments et affections post-ménopausiques [8]. Plus récemment, une équipe du Louvain Drug Research Institute [9] montra que les tetrahydro iso- α -acides pouvaient améliorer l'homéostasie du glucose et réduire le gain de masse corporelle ainsi que l'endotoxémie métabolique sur des souris. Il fut également prouvé que l'ingestion d'extraits de houblon dans un régime riche en graisse limitait l'obésité et l'intolérance au glucose [10]. Ces découvertes confirment les propriétés bénéfiques pour la santé que le houblon manifesta dans le passé.

1.2. Encapsulation

Elle consiste à confiner une charge dans des microcapsules. Selon la technique d'encapsulation choisie, il est possible de réaliser des capsules réservoir ou des capsules pleines (fig.4, à gauche). Tout processus d'encapsulation peut habituellement être divisé en trois étapes principales (fig.4, à droite). La première étape est l'incorporation de la charge dans la matrice ou dans le cœur de la capsule par dissolution ou dispersion, voir par adsorption ou agglomération pour un composé solide. Vient ensuite une opération mécanique dans le but de former les microgouttes ou microparticules. La dernière étape consiste à stabiliser la capsule par un processus

chimique, physicochimique ou physique. D'autres étapes secondaires ou spécifiques à certains processus, telles qu'un lavage ou un séchage des capsules formées, peuvent être rencontrées. Ces étapes peuvent être répétées et différentes opérations peuvent être combinées pour obtenir la forme finale désirée.

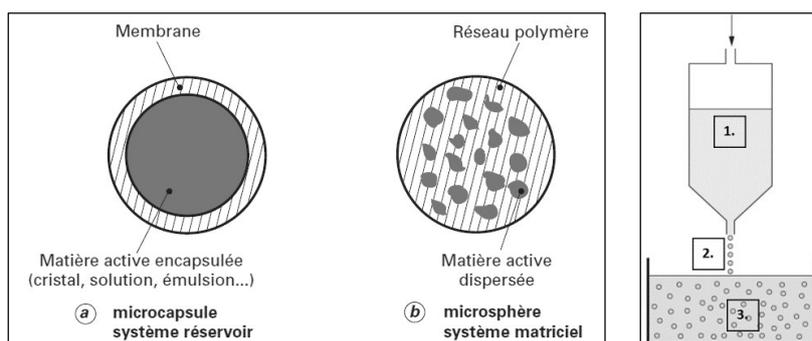


Figure 4 - Types de capsules réalisables par encapsulation à gauche et étapes du processus d'encapsulation (1 Incorporation de la charge, 2 Formation des gouttelettes, 3 Stabilisation des capsules) à droite [11].

Dans le cadre de ce projet, la méthode d'encapsulation choisie est la gélification ionotropique de l'alginate de sodium, qui présente plusieurs avantages. La gélification de l'alginate est aisée et rapide et sa mise en œuvre présente peu de difficultés techniques. De plus, l'alginate et toutes les substances intervenant dans la gélification sont des substances déjà utilisées dans l'industrie alimentaire en Europe. Enfin, l'alginate possède la capacité de complexer avec d'autres polymères.

La gélification ionotropique est basée sur la capacité des polyélectrolytes à se réticuler en présence d'un contre-ion pour former des hydrogels. Les microbilles ainsi formées sont des entités polymériques hydrophiles réticulées. Ces microbilles sont produites en faisant chuter des gouttes d'une solution de polymère chargée dans une solution aqueuse de cations polyvalents (fig.5). Les cations diffusent dans les gouttes de polymère et forment une matrice tridimensionnelle réticulée. Les biomolécules peuvent être chargées dans ces microbilles sous des conditions douces qui leur permettent de conserver leurs propriétés. L'alginate, le chitosan et la pectine, par exemple, sont largement utilisés pour l'encapsulation de principes actifs en pharmacologie et permettent une libération différée des principes actifs.

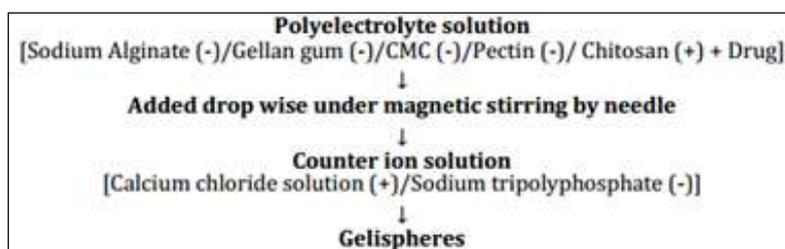


Figure 5 - Schéma de base de la gélification ionotrope [12].

Plusieurs paramètres interviennent dans la technique de gélification ionotrope. Les concentrations du polyélectrolyte et de son contre-ion jouent un rôle primordial dans la formulation des microbilles. L'efficacité du confinement dans les billes dépend du type et de la concentration de l'électrolyte. La température influence la taille des billes formées ainsi que le temps de réticulation. Le pH de la solution réticulante modifie l'équilibre de la réaction ainsi que la forme et la taille des billes. La charge à encapsuler doit se trouver dans un ratio correct par rapport au polymère. Sa concentration affecte grandement l'efficacité de l'encapsulation.

1.3. Composants intervenant dans la formulation

L'alginate est un des polymères naturels les plus étudiés pour la formation de microcapsules. Sa biocompatibilité, sa capacité à gélifier rapidement et en conditions physiologiques ainsi qu'à complexer avec d'autres polymères le rendent très adapté à l'encapsulation d'éléments destinés au vivant, que ce soit dans le milieu pharmaceutique ou alimentaire. De plus, des études ont également prouvé que ces gels peuvent maintenir leur intégrité et montrent de la résistance durant des traitements humides à chaud tels que l'ébullition ou la cuisson à la vapeur [13].

L'alginate (fig.6, à gauche) est un polysaccharide d'acide α -L-gulonique (unité G) et d'acide β -D-mannuronique (unité M). Il peut être décrit comme un copolymère linéaire binaire d'unités G et M liées en 1-4 en un motif de blocs avec certaines régions homopolymériques contenant l'un des deux polymères (blocs G ou blocs M) entrecoupées de régions alternant les deux monomères (blocs MG). Un modèle, dit de la « boîte à œufs », a été proposé pour expliquer la capacité de l'alginate à se gélifier. Selon ce modèle, deux sections de blocs G se faisant face immobilisent un cation divalent. Chaque ion Ca^{2+} interagit avec deux résidus G d'une chaîne ainsi qu'avec deux résidus de la chaîne opposée, créant ainsi des zones de jonction conférant sa structure au gel (fig.6, à droite).

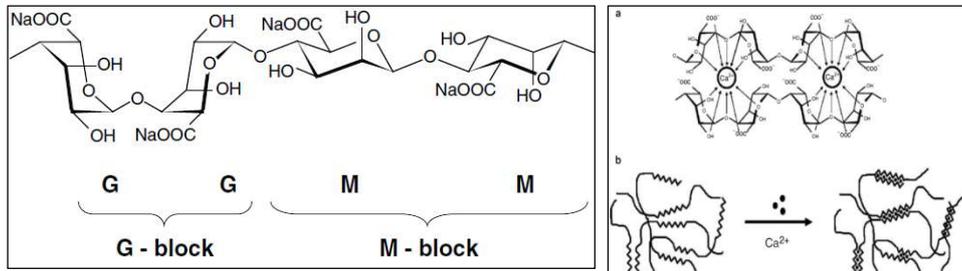


Figure 6 - Structure chimique d'alginate de sodium à gauche et liaison entre les cations divalents Ca^{2+} et l'alginate selon le modèle de la "boîte à œufs" (a Chélation d'ions divalents, b Formations de jonctions inter-chaînes) à droite [14].

Un composé d'encapsulation supplémentaire utilisé dans le cadre de ce projet est le chitosan. Il s'agit d'un polysaccharide dérivé de la chitine, le biopolymère le plus rencontré dans la nature après la cellulose. Il peut être utilisé dans de nombreuses applications biologiques et alimentaires étant donné qu'il n'est pas toxique, qu'il est biocompatible et biodégradable. Le chitosan peut de plus interagir avec l'alginate étant donné que ces deux polymères ont des charges opposées. L'association du chitosan et de l'alginate (fig.7, à droite) permet en effet de conférer une stabilité supplémentaire aux microcapsules, sous la forme d'une couche de revêtement. La chitine est un polysaccharide constitué d'unités de N-acétyl-D-glucosamine connectées par des liaisons β 1-4. On parle de chitosan lorsque les unités acétyl-D-glucosamine perdent leurs groupements acétyles (fig.7, à gauche).

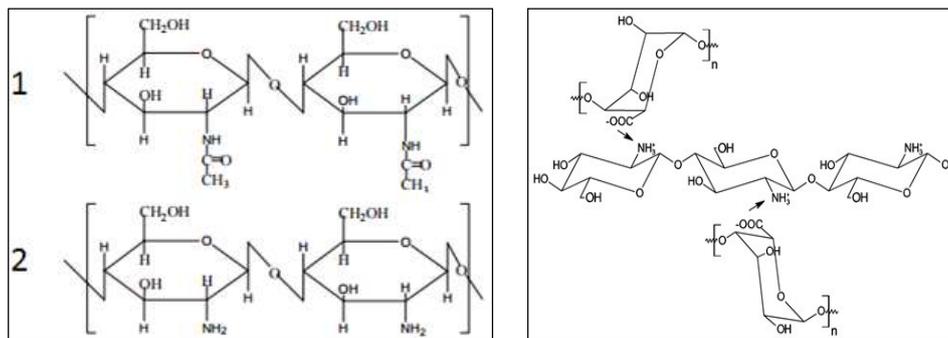


Figure 7 - Structure (1 Chitine et 2 Chitosan) à gauche [15] et interactions ioniques entre les groupements aminés du chitosan et les groupements carboxyliques de l'alginate à droite [16].

Le dernier composant intervenant dans la structure de microbilles est l'amidon. Il s'agit d'un polysaccharide constitué d'unités de glucose liées ensemble par des liaisons glycosidiques en deux types de macromolécules, l'amylose et l'amylopectine. Son rôle dans la formulation des microbilles est simple : c'est un agent stabilisant qui leur permet de garder leur forme sphérique lors du séchage. Sans

lui, le maillage de l'hydrogel s'écraserait et entraînerait une déformation complète des microbilles. Sa présence diminue aussi la porosité du gel et limite ainsi la diffusion des composés encapsulés dans le milieu environnant.

2. Manipulations et résultats

Le déroulement du projet peut être divisé en quatre grandes parties : la formulation des microbilles, la réalisation d'une unité pilote pour la production des microbilles, la caractérisation des microbilles et, finalement, leur utilisation dans des préparations alimentaires.

2.1. Formulation des microbilles

Cette partie des manipulations a consisté en divers tests de formulations des microbilles afin de déterminer le rapport optimal entre les différents éléments intervenant dans la gélification : l'alginate, le chitosan, l'amidon et l'extrait de houblon, ainsi que le calcium pour la solution gélifiante.

2.1.1. Echelle de laboratoire

Deux types d'alginate de sodium ont été testés : l'alginate haute viscosité de VWR BDH Prolabo et l'alginate basse viscosité d'Alfa Aesar. Est ensuite venue l'incorporation de l'extrait de houblon. Celle-ci doit se faire sous agitation très importante afin d'obtenir une émulsion des extraits la plus fine et homogène possible. Une fois l'alginate correctement dissout et le mélange bien homogène, la gélification en microcapsules peut se faire. La technique employée pour la préparation des microbilles à petite échelle consiste à réaliser un goutte-à-goutte de la solution à gélifier, qui contient l'alginate, l'amidon et l'extrait, au-dessus d'un bain agité de solution gélifiante, préparée à partir de chlorure de calcium dihydraté (fig.8). Les microbilles sont ensuite rincées plusieurs fois à l'eau et séchées à l'air libre sur papier filtre jusqu'à atteindre un poids constant.

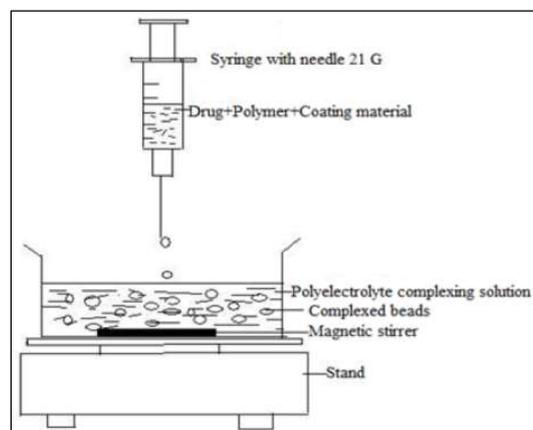


Figure 8 - Schéma de préparation des microbilles [12].

Concentration en alginate et en amidon :

L'effet de la variation de la concentration en amidon a été étudié en premier lieu. Dans le cas de l'alginate haute viscosité de VWR, une concentration de 1% w/v a été fixée pour ces essais. Pour l'alginate à faible viscosité d'Alfa Aesar, une concentration de 2 % w/v a été fixée. Les tests de stabilité ont été réalisés avec une aiguille de diamètre interne de 686 μm . Le tableau 2 reprend les résultats en fonction des différentes proportions d'amidon, de grade alimentaire et de la marque Maizena, testées.

Alginate	%w/v	Am %w/v	Aiguille	Microbilles
VWR BDH Prolabo	1	5	G19 686 μm	Contraction >75%, forme instable
		10		Contraction >50%, forme instable
		15		Contraction <25%, forme instable
		20		Contraction <25%, forme stable
Alfa Aesar	2	5	G19 686 μm	Contraction importante, forme instable
		10		Contraction >75%, forme instable
		15		Contraction >50%, forme instable
		20		Contraction <50%, forme stable

Tableau 2 - Tests de stabilité selon la concentration en amidon.

La stabilité des microbilles séchées a été jugée selon le pourcentage de rétrécissement lors du séchage et selon la stabilité de la forme sphérique. La contraction reprend donc le pourcentage entre la taille moyenne avant et après séchage. Une forme de bille qualifiée d'instable correspond à une perte de la sphéricité ou à une surface présentant des craquelures trop importantes. Le diamètre moyen des microbilles formées dans ces conditions est de 2,3 mm avant séchage. Pour les deux types d'alginate, une concentration en amidon égale ou inférieure à

10% w/v entraîne une contraction très importante durant le séchage et une perte totale de la sphéricité des microbilles formées. Dans le cas de l'alginate VWR, à partir de 20% en amidon, les billes restent sphériques et présentent une surface régulière. Pour l'alginate Alfa, à 20% en amidon, la contraction devient tolérable et la surface des microbilles est régulière. La contraction des microbilles étant moins importante dans le cas de l'alginate haute viscosité de VWR, c'est ce type d'alginate qui a été retenu.

Amidon	Alginate	%w/v	Aiguille	Microbilles
20% w/v	VWR BDH Prolabo	0,5	G19	Contraction <25%, forme instable
		0,75	686 µm	Contraction <25%, forme instable
		1		Contraction <25%, forme stable
		1,25		Contraction <25%, forme stable
		1,5		Contraction <25%, forme stable

Tableau 3 - Tests de stabilité selon la concentration en alginate.

Des tests ont ensuite été réalisés en variant la concentration en alginate choisi. Ils sont présentés dans le tableau 3. Les concentrations en alginate de 0,5 et 0,75% w/v présentaient une forme instable. Au plus la concentration en alginate augmentait, au plus la gélification était stable et rapide. La concentration en alginate de 1,5% w/v a donc été choisie pour la suite.

Concentration en extrait de houblon :

Outre leur taille, leur sphéricité et l'uniformité de leur surface, les billes formées doivent également être capables de piéger l'extrait. Cet extrait de houblon ne doit pas être relâché dans le milieu dans lequel les microbilles sont insérées, au risque de lui transmettre l'amertume indésirable. L'extrait de houblon a été introduit en diverses concentrations au mélange d'alginate et d'amidon. Les concentrations testées ont commencé à 5% w/v en extrait et ont progressé par pas de 5% jusqu'à 20%. Les concentrations de 15 et 20% entraînaient des microbilles à la surface collante, même une fois séchée. A 5 et à 10% en extrait, la seule différence par rapport aux billes non chargées qui sont blanches est la couleur légèrement jaune-orangée. La concentration en extrait a donc été fixée à 10%.

Solution gélifiante :

Deux types de solution gélifiante ont été envisagées : l'une contenant uniquement des ions calcium, et l'autre contenant à la fois des ions calcium et du chitosan (fourni par la société Handary). L'utilisation de l'une ou l'autre solution gélifiante ne change en rien la méthode de production des microbilles, que ce soit à petite échelle ou à l'aide de l'unité pilote. Des productions de microbilles ont été réalisées pour obtenir deux types de matrices. Les deux solutions gélifiantes préparées pour ce faire étaient :

- CaCl₂ 2% w/v,

- CaCl₂ 2% et chitosan 2% w/v en milieu acide afin de dissoudre le chitosan (1% v/v d'acide acétique).

Formulation optimale :

Pour la synthèse à petite échelle selon la technique expliquée ci-dessus, la formulation optimale du mélange à gélifier est donc la suivante :

- 1,5% w/v alginate haute viscosité (VWR BDH Prolabo),
- 20% w/v amidon (Maizena),
- 10% w/v en extrait de houblon (Yakima Chief - CO₂ Hop Extract/IKE).

2.1.2. Echelle de l'unité pilote

Lors du passage à la synthèse de microbilles à l'aide de l'unité pilote, il a été possible de réduire drastiquement la taille des billes produites et d'affiner leur distribution en taille, tout en augmentant considérablement la capacité de production. Cependant, les contraintes opérationnelles liées à son utilisation ont nécessité une modification de la formulation afin d'améliorer l'homogénéité du mélange à gélifier.

Au cours des premières tentatives de production de microbilles chargées en extrait avec l'unité pilote, l'utilisation de la formulation optimale du mélange à gélifier déterminée à petite échelle entraînait le colmatage de la douille d'injection, aléatoire ou systématique selon le diamètre de sortie de cette dernière. La solution qui a porté ses fruits a été de modifier la formulation du mélange à gélifier en tant que tel dans le but d'améliorer l'émulsification de l'extrait de houblon. Ce n'est pas la viscosité du mélange précédent qui est à l'origine du colmatage mais bien la mauvaise émulsification de l'extrait dans le mélange à gélifier, ou tout au moins son manque de stabilité même à très court terme sous les contraintes de pression et d'écoulement rencontrées au niveau de la douille d'injection.

La nouvelle formulation optimale qui a été retenue est la suivante :

- 1% w/v alginate haute viscosité (VWR BDH Prolabo),
- 15% w/v amidon (Maizena),
- 5% w/v en extrait de houblon (YC - CO₂ Hop Extract/IKE).

2.1.3. Ajout de couche(s) protectrice(s)

Enfin, l'évaluation organoleptique des microbilles a révélé qu'il était nécessaire d'améliorer la rétention de l'extrait encapsulé en leur sein. Pour ce faire, la formulation des microbilles en tant que telle n'a pas été altérée, mais il a été choisi d'ajouter des couches de protections autour de celles-ci.

Le dépôt d'une couche de protection autour des microbilles se fait de manière simple. Les microbilles séchées sont trempées dans une solution contenant l'agent protecteur. Celui-ci se dépose à la surface des microbilles qui, une fois séchées, possède une couche de protection supplémentaire. Ce processus peut être répété

plusieurs fois. Il faut cependant garder à l'esprit que chaque couche de protection supplémentaire rajoute des coûts conséquents en matières premières et surtout en temps. Les solutions utilisées pour l'application d'une couche protectrice sont les suivantes :

- Alginate haute viscosité 0,5% w/v,
- Chitosan 0,5% w/v.

Dans le cas de la matrice composée d'alginate, ce sera de préférence une couche de chitosan qui sera appliquée, et inversement pour la matrice alginate/chitosan. L'adhésion de la couche protectrice sera en effet renforcée par les interactions entre les groupements de charges opposées présents sur les deux polymères. Il est également possible de déposer plusieurs couches de protection identiques ou non.

2.2. Conception de l'unité pilote

Pour la production de microbilles à l'aide de l'unité pilote, le liquide à gélifier est pressé à haute vitesse à travers une douille d'injection sous forme de jet continu. Directement en dessous de cette douille, le jet est coupé en segments cylindriques par un objet de coupe rotatif portant sur sa circonférence de très fins fils de coupe. Sous l'effet de la tension de surface, les segments cylindriques coupés prennent la forme de microbilles sphériques qui continuent leur chute et qui sont gélifiées au contact du médium adéquat. Cette technique de formation de microgouttelettes est appelée JetCutting (fig.9). En plus d'avoir l'avantage de produire des billes de tailles homogènes, cette technique permet, contrairement aux techniques communément employées, une production élevée de billes de petite taille (inférieure à 1 mm) même à partir de fluides hautement visqueux.

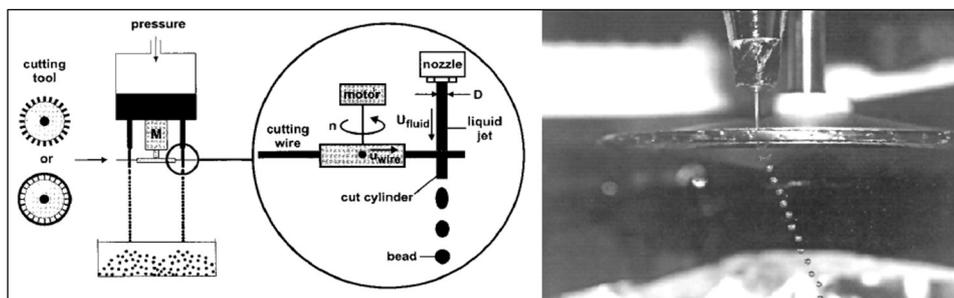


Figure 9 - Représentation schématique du fonctionnement du JetCutter (à gauche) et photo (à droite) d'un JetCutter en fonctionnement [17].

Les différents éléments de l'unité pilote sont les suivants :

- Le **tank pressurisé** accueille le mélange à gélifier et le délivre à travers la **douille d'injection** à un débit ajustable.

- Le **moteur d'entraînement** de l'outil de coupe doit pouvoir tourner à une vitesse élevée, ajustable précisément et stable dans le temps.
- L'**outil de coupe** a été développé sur base de ceux utilisés sur les JetCutters rencontrés dans les industries. Il doit pouvoir supporter des vitesses supérieures à 10000 tours par minute et donc être correctement équilibré. Des fils de coupe doivent être positionnés à égale distance les uns des autres sur tout son pourtour. Ces fils de coupe doivent être fixés de façon à ce qu'ils conservent leur position lorsque l'outil de coupe est en rotation. Dans le cadre de ce projet, deux outils de coupe ont été conçus. Le premier était muni de 24 fils de coupe de 100 μm de diamètre en acier inoxydable. Le second en comportait le double.
- Le **cadre support** permet la fixation des éléments et les réglages opérationnels. Des bras de fixation, pour la douille d'injection et pour le moteur, inclinables l'un par rapport à l'autre, ont été conçus afin de pouvoir régler l'angle de coupe du jet de fluide.

2.3. Caractérisation des microbilles

Dans un premier temps, une analyse HPLC permet de quantifier dans un échantillon liquide les composés majoritaires dans les extraits de houblon. Ensuite, la méthode de dosage de l'extrait de houblon encapsulé lors de la production de microbilles et la méthode d'évaluation du taux de relargage des composés encapsulés lors de la mise en contact des microbilles avec un milieu modèle seront détaillées. Enfin, des comparaisons entre les microbilles possédant des matrices différentes seront réalisées et les conclusions présentées.

2.3.1. Dosage par RP-HPLC-UV des composés majoritaires des extraits de houblon

Cette méthode est inspirée de la méthode la plus couramment utilisée pour doser les acides α et β dans l'industrie brassicole [18]. Les extraits de houblon sont dissous dans du méthanol pour leur dosage direct. Pour déterminer le taux d'encapsulation ou la capacité de rétention des extraits dans les microbilles, les extraits liquides obtenus dans ces deux cas seront directement analysés. Les acides α , α isomérisés et β sont séparés par HPLC sur une colonne en phase inverse (Sherisorb ODS2, RP18 5 μm , 150*4,6 mm) et mesurés par spectrophotométrie à des longueurs d'onde de 314 nm pour les acides α et β et de 270 nm pour les acides α isomérisés. La phase mobile utilisée est constituée d'un mélange 71/28,05/0,95 %v/v/v méthanol/eau/acide phosphorique 85% à un débit de 1 ml/min et à une température de 40°C. Les concentrations de chaque espèce sont estimées en comparant les aires des pics avec celles des pics issus de l'analyse d'une solution de standards externes (exemples de spectres à la figure 10). Ces standards (ICE-3 et ICS-I3, Labor Veritas, Suisse) contiennent des quantités précisément connues d'acides α (co-, n-, ad-humulone), d'acides β (co-, n-, ad-lupulone) et d'acides α isomérisés.

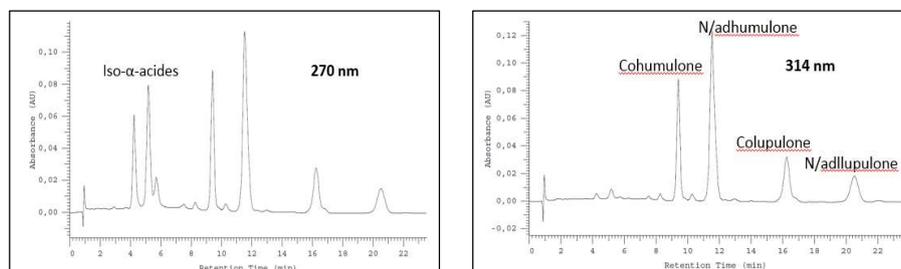


Figure 10 – Spectres d'analyse à 270 nm à gauche et à 314 nm à droite d'une solution de standards de calibration.

2.3.2. Dosage de la quantité d'extrait de houblon encapsulé dans des microbilles

Cette méthode repose sur une extraction solide-liquide totale des composés encapsulés dans les microbilles. Les acides α , β et α isomérisés présents dans les microbilles sont extraits par un mélange d'éther diéthylique, de méthanol et d'acide chlorhydrique (recommandé par l'EBC Analytica). Les acides α , β et α isomérisés contenus dans la phase éther sont séparés par RP-HPLC et mesurés par spectrophotométrie à 270 et 314 nm par la méthode mentionnée précédemment. Les concentrations des composés du houblon mesurées dans la phase éther sont à mettre en lien avec leurs concentrations dans les microbilles broyées finement à partir desquelles ils ont été extraits, et dont la masse est précisément connue.

2.3.3. Evaluation du taux de relargage de l'extrait de houblon dans un milieu modèle

Une quantité précisément connue de microbilles dont l'intégrité physique n'a cette fois pas été altérée est mise en contact avec un milieu modèle (eau purifiée). Les composés encapsulés qui sont libérés dans ce milieu au cours du temps sont mesurés par la méthode HPLC mentionnée précédemment.

2.3.4. Comparaison des différentes microbilles produites

Extrait IKE :

La composition de l'extrait IKE utilisé pour la production de microbilles avait déjà été déterminée par Yakima Chief en novembre 2013 lors de la libération du lot en question. Un nouveau dosage a été fait en interne afin de confirmer que la composition de l'extrait n'avait pas évolué en un an, même stocké dans des conditions adéquates. Ces analyses ont été réalisées en double et trois fois à deux mois d'intervalle afin de s'assurer que l'extrait ne se dégradait pas significativement lors du stockage après ouverture du pot. Les solutions de standards ont à chaque fois été préparées dans les deux semaines précédant l'analyse. A chaque fois, la concentration en acides α était inférieure à 1% et les pics correspondants étaient trop petits pour qu'une valeur plus précise soit significative. La concentration des acides α isomérisés et des acides β a pu être réalisée avec précision et n'a pas témoigné

d'évolution significative au cours du temps, même par rapport à la concentration mentionnée sur le certificat d'analyse du fournisseur.

Encapsulation dans les matrices alginate et alginate/chitosan :

Deux types de microbilles ont été analysées : de matrice alginate obtenues par gélification des microgouttes dans une solution de calcium et de matrice alginate-chitosan obtenues par gélification dans une solution acidifiée de calcium et de chitosan.

Après séchage des microbilles, il est admis que l'eau résiduelle est négligeable une fois que les microbilles ont atteint un poids constant. La composition des microbilles ne tient donc plus compte que des trois composés présents en majorité dans le mélange à gélifier : l'alginate haute viscosité, l'amidon et l'extrait de houblon. Les proportions relatives de ces trois composés dans les microbilles sèches sont identiques à celles du mélange à gélifier. La composition exacte de l'extrait IKE a été déterminée précédemment et, à partir de celle-ci, il est possible d'estimer la concentration théorique que chaque composé devrait avoir dans les microbilles. Ainsi, les acides α isomérisés, présents en majorité dans l'extrait IKE à raison de 54,2 %w/w, devraient se retrouver à une concentration de 12,9 %w/w dans les microbilles (54,2 % des 23,8 % d'extrait IKE présents dans les microbilles). La figure 11 présente ainsi la composition théorique en acides α , β , et α isomérisés qui devrait se retrouver dans des microbilles idéales. Cette même figure présente aussi les résultats des analyses réalisées sur les deux types de microbilles. Dans le cas de la matrice alginate, elles correspondent presque parfaitement aux valeurs attendues. Pour la matrice alginate-chitosan, elles sont légèrement inférieures. Cette légère diminution s'explique par deux facteurs. Le premier est que le bain de gélification pour cette matrice est légèrement acide afin de permettre une dissolution facilitée du chitosan. Cette acidité favorise également le transfert des composés de l'extrait du mélange à gélifier vers le bain de gélification lorsque les microbilles y tombent pour être stabilisées. Le second facteur dont il faut tenir compte est la présence de chitosan dans la matrice de ces microbilles. Celui-ci est une macromolécule de poids non négligeable. Or, ce dernier n'a pas été pris en compte dans l'estimation des concentrations théoriques des composés dans des microbilles idéales. Il n'est pas possible de différencier ces deux matrices uniquement sur base de l'encapsulation des extraits de houblon qui est similaire, pour ne pas dire identique, dans les deux cas. Pour ce faire, il est nécessaire d'évaluer leur capacité à retenir les composés encapsulés.

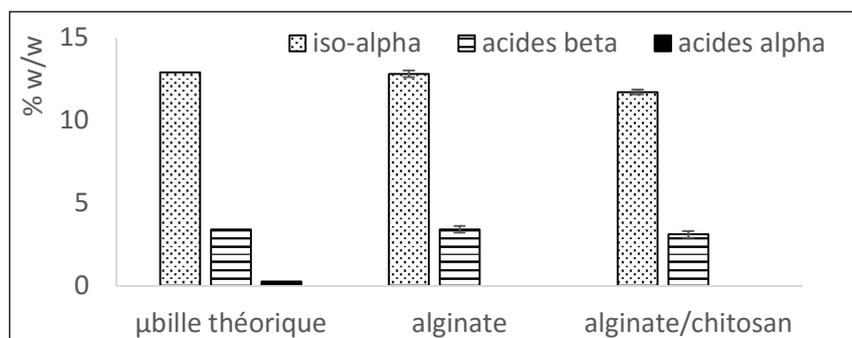


Figure 11 - Concentration des composés encapsulés dans les microbilles : théoriques, de matrices alginate et alginate-chitosan (de gauche à droite).

Mesure du taux de rétention des composés encapsulés par les matrices alginate et alginate-chitosan :

Afin de déterminer si l'une des deux matrices, alginate ou alginate-chitosan, retient mieux les composés encapsulés en son sein que l'autre, la méthode détaillée au point 2.3.3. a été utilisée et l'eau purifiée choisie comme milieu modèle. Les prélèvements de milieu modèle ont été faits jusqu'à ce que les concentrations mesurées n'évoluent plus. C'est la concentration en acides α isomérisés, majoritaires dans l'extrait IKE, qui a été suivie. Chaque évaluation du relargage des composés encapsulés a été réalisée en double et les prélèvements de milieu modèle effectués ont été analysés deux fois par HPLC. Après 4h de mise en contact avec le milieu modèle, la concentration en composés libérés dans le milieu modèle n'évolue plus, quelle que soit la matrice.

La concentration en acides α isomérisés libérés se stabilise à 1,4 %w/w pour la matrice alginate, et à 0,8 %w/w pour la matrice alginate-chitosan.

Comme évoqué précédemment, ces concentrations massiques correspondent à la concentration initialement présente dans les microbilles étudiées. Pour la matrice alginate, 1,4 %w/w d'acides α isomérisés libérés est donc à mettre en lien avec les 12,8 %w/w initialement présents : 10,9% des acides α isomérisés encapsulés dans cette matrice ont donc été libérés après 4h dans le milieu modèle. Pour la matrice alginate-chitosan, 0,8 %w/w d'acides α isomérisés libérés par rapport aux 11,2 %w/w initialement encapsulés correspond à une libération de 7,1% dans les mêmes conditions.

La différence est significative mais ces taux de libération restent du même ordre. Après les premiers tests organoleptiques avec les microbilles de matrice alginate-chitosan, il s'est avéré que cette libération dans le milieu auquel les microbilles sont incorporées était encore trop importante et se traduisait par une amertume toujours perceptible.

Comparaison du taux de rétention entre des microbilles entourées de couche(s) protectrice(s) :

Dans le but de réduire la diffusion des composés encapsulés, l'ajout de couche(s) de protection a été étudié. Différents types de microbilles recouvertes par un (ou plusieurs) agent(s) protecteur(s) ont été produits et testés, toujours de matrice alginate-chitosan qui retenait mieux les composés encapsulés : une et deux couche(s) de chitosan, une et deux couche(s) d'alginate, et une couche d'alginate suivie d'une couche de chitosan.

La première conclusion à tirer de ces analyses est que l'ajout d'une couche de polyélectrolytes de même signe que l'extérieur de la matrice ne diminue que très peu le taux de libération des composés encapsulés. Les deux taux de libération des matrices alginate-chitosan recouvertes respectivement d'une ou de deux couches de chitosan restent quasiment identiques à celui de la matrice nue. Seuls les taux de libération initiaux semblent diminuer : la libération des composés encapsulés est ralentie mais le taux de libération final est inchangé. L'ajout d'un polyélectrolyte de charge opposée (l'alginate) à celle du polyélectrolyte constituant l'extérieur de la matrice (chitosan) réduit bien plus significativement le taux de libération des composés encapsulés. La concentration des acides α isomérisés libérés dans le milieu modèle était de 0,8 %w/w pour la matrice alginate-chitosan nue. Elle passe à 0,7 %w/w avec une couche protectrice d'alginate et à 0,6 %w/w avec deux couches. Ces résultats suggèrent qu'un agent protecteur de charge opposée se dépose bien mieux qu'un agent protecteur de même charge sur la matrice.

L'addition de couches successives de charges opposées entraîne une diminution de la quantité de composés libérés qui se stabilise dans ce cas à 0,5 % w/w, confirmant ainsi que les couches se déposent mieux lorsqu'elles sont appliquées sur un substrat de charge opposée. Sur base de ces résultats, il serait également utile de tester à l'avenir l'ajout de couches protectrices de charges opposées sur la matrice alginate.

La figure 12 reprend les taux de libération des acides α isomérisés pour les différentes matrices et couches de protection testées. Elle montre que ce taux de libération a été diminué de plus de 60% entre les premières et dernières microbilles produites.

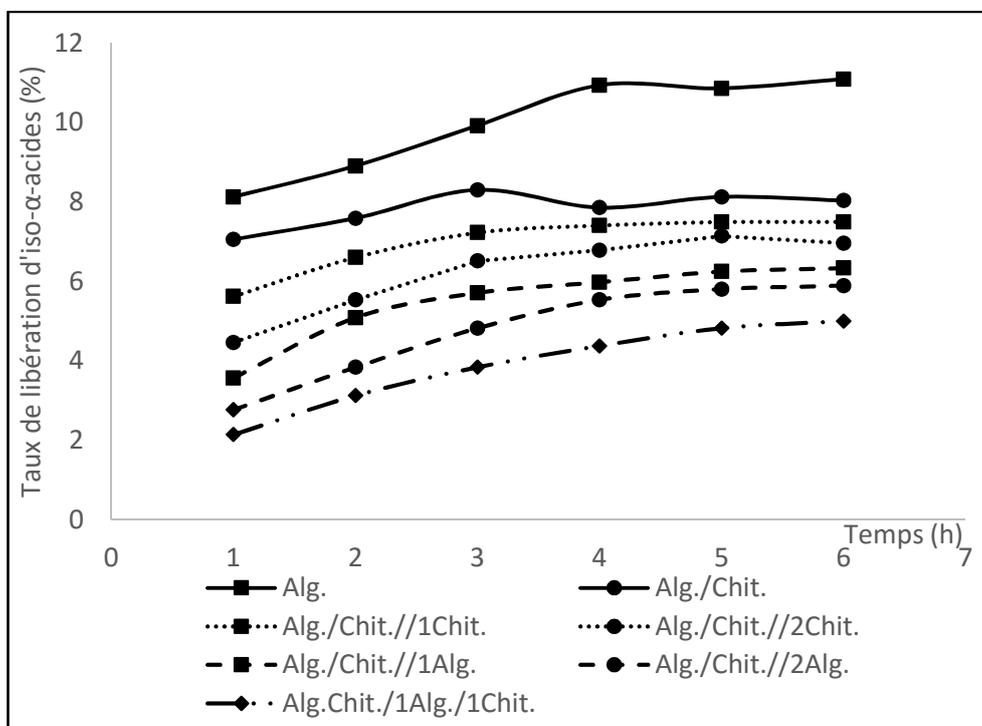


Figure 12 - Taux de libération d'acides α isomérisés en fonction du temps pour différents types de microbilles.

2.4. Utilisation des microbilles et analyse sensorielle

Les études concernant les bienfaits du houblon présentées au point 1.1. ont confirmé les allégations de santé liées à ses composés. Elles ont été menées sur des animaux de laboratoire et ont permis de déterminer les quantités minimales des composés que les animaux devaient ingérer pour que les effets positifs sur leur santé soient significatifs. Pour les acides α et α isomérisés, ces quantités sont de 10 mg/kg de masse corporelle par jour. Transposé à un être humain dont le poids moyen considéré est de 70 kg, cela correspond à une dose quotidienne de 700 mg d'acides α ou α isomérisés. C'est cette dose qui a été fixée pour les tests d'incorporation des microbilles à des préparations alimentaires. Etant donné que les microbilles de matrice alginate-chitosan utilisées pour ces tests sont chargées à raison de 11,2 %w/w en acides α isomérisés, il faudrait en consommer 6,3 g par jour. Afin de faciliter la préparation des préparations alimentaires testées, la dose incorporée a été arrondie à 5,0 g.

Les premiers tests d'incorporation des microbilles ont été réalisés avec des microbilles de matrice alginate-chitosan afin d'évaluer si leur taux de libération était assez bas pour que les composés libérés ne soient pas perceptibles lors de la

dégustation. Les microbilles ont dans un premier temps été incorporées lors de la préparation de biscuits sablés. Ce choix était justifié par le fait qu'ils pouvaient être facilement consommés et appréciés par un grand nombre de consommateurs. L'amertume n'était aucunement masquée et cette libération a été mise en lien avec l'étape de cuisson à sec durant la préparation des biscuits. Dans un deuxième temps, les mêmes microbilles ont été incorporées lors de la préparation de mousse au chocolat. L'amertume était toujours perceptible par les mêmes dégustateurs, mais bien moins que dans le cas des biscuits. C'est après cet essai que l'addition de couche(s) protectrice(s) a été envisagée afin de limiter encore plus la libération des composés encapsulés dans la matrice alimentaire à laquelle les microbilles sont incorporées.

Les microbilles utilisées ensuite étaient de matrice alginate-chitosan protégée par l'addition d'une couche protectrice d'alginate suivie d'une couche de chitosan. Elles ont été incorporées comme précédemment à de la mousse au chocolat. L'amertume était encore réduite mais toujours légèrement perceptible.

La production et l'utilisation de microbilles dont la matrice alginate-chitosan aurait été recouverte de plus de couches protectrices ou de microbilles de matrice différente n'a pas pu être testée dans le laps de temps imparti à ce projet.

3. Conclusion et perspectives

De nombreuses avancées ont été faites en vue du développement d'un produit alimentaire à base d'extraits de houblon encapsulés dans une matrice d'alginate-chitosan sous forme de microbilles.

L'unité pilote mise en place au laboratoire permet la production de microbilles dans une gamme de tailles relativement importante : de 200 μm à 2 mm. La taille peut être déterminée de manière précise sur base du modèle mathématique qui régit la production de microbilles via la technique de JetCutting. De plus, ces microbilles, une fois séchées, présentent une taille encore inférieure. L'utilisation de l'appareil est relativement aisée et sa conception tient compte des aspects de maintenance et de nettoyage des parties exposées au liquide à transformer et à stabiliser sous forme de microbilles.

L'encapsulation elle-même de l'extrait de houblon dans des microbilles d'alginate-chitosan est relativement bien maîtrisée. Elle présente l'avantage de transformer des extraits liquides visqueux en une poudre très facilement manipulable. Il faut cependant encore améliorer la capacité de rétention des extraits par la matrice des microbilles. Les travaux en ce sens ont déjà permis de réduire de moitié le taux de libération des composés encapsulés dans un milieu modèle aqueux.

Enfin, l'unité pilote et le processus d'encapsulation en tant que tels étant opérationnels, il est envisageable d'appliquer ces techniques à d'autres produits que des extraits de houblon. La technique de JetCutting peut être également associée à d'autres techniques de stabilisation et à d'autres champs d'application que l'agroalimentaire.

4. Sources

- [1] YAKIMA CHIEF, *Site web de Yakima Chief*, consulté le 7 février 2014.
URL : <http://yakimachief.com>
- [2] V. PREEDY, *Beer in Health and Disease Prevention*, Elsevier, 2009.
- [3] D. DE KEUKELEIRE, *Fundamentals of Beer and Hop Chemistry*, Química Nova, vol. 23, n° 11, pp. 108-112, 2000.
- [4] H. NOZAWA & K. KONDO, *Intake of beer inhibits azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in male fischer 344 rats*, International Journal of Cancer, vol. 108, pp. 401-411, 2004.
- [5] H. YAJIMA & K. KI., *Isohumulones, Bitter Acids Derived from Hops, Activate Both Peroxisome Proliferator-activated Receptor α and γ and Reduce Insulin Resistance*, Journal of Biological Chemistry, vol. 279, n° 132, p. 456-462, 2004.
- [6] H. YAJIMA & K. KI, *Prevention of diet-induced obesity by dietary isomerized hop extract containing isohumulones, in rodents*, International Journal of Obesity, vol. 29, pp. 991-997, 2005.
- [7] B. OLAS, J. KOŁODZIEJCZYK & W. OLESZEK, *The extract from hop cones in plasma protects against changes following exposure to peroxynitrite*, Central European Journal of Biology, vol. 8, n° 18, pp. 990-998, 2011.
- [8] R. ERKKOLA, S. VERVARCKE & A. HEYERICK, *A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over pilot study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts*, Phytomedicine, vol. 17, pp. 389-396, 2010.

- [9] A. EVERARD & P. CANI, *Tetrahydro iso-Alpha Acids from Hops Improve Glucose Homeostasis and Reduce Body Weight Gain and Metabolic Endotoxemia in High-Fat Diet-Fed Mice*, PLOS One, vol. 7, n° 13, pp. 1-8, 2012.
- [10] M. SUMIYOSHI ET Y. KIMURA, *Hop extract inhibits obesity in mice fed a high-fat diet over the long term*, British Journal of Nutrition, vol. 109, n° 11, pp. 162-172, 2013.
- [11] J. RICHARD & J.-P. BENOIT, *Microencapsulation*, Techniques de l'Ingénieur, 10 juin 2013.
- [12] P. PATIL, D. CHAVANKE & M. WAGH, *A Review on Iontropic Gelation Method*, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, vol. 4, n° 14, pp. 27-32, 2012.
- [13] B. S. ROOPA & S. BHATTACHARYA, *Alginate gels : stability at different processing conditions*, Journal of Food Process Engineering, vol. 33, n° 13, pp. 466-480, 2010.
- [14] B. REHM, *Alginates : Biology and Applications*, Springer, 2009, 266p..
- [15] M. RINAUDO, *Chitin and chitosan: Properties and applications*, Progress in Polymer Science, vol. 31, pp. 603-632, 2006.
- [16] L. NUAMONU, R. ATO & I. ONYIDO, *Alginate reinforced chitosan and starch beads in slow release formulation of imazaquin herbicide – Preparation and characterization*, Materials Science and Applications, vol. 3, pp. 566-574, 2012.
- [17] U. PRUESSE & K.-N. VORLOP, *Scale-Up of the JetCutter Technology*, Chemical Industries, vol. 57, n° 112, pp. 636-641, 2003.
- [18] EBC ANALYTICA, *7.7 α - and β -Acids in Hops and Hop Products by HPLC*, 2013.