

## Effet des traitements thermiques sur la mise en disponibilité de la vitamine B<sub>12</sub> dans le lait

M Fie<sup>1</sup>, JA Zee<sup>1\*</sup>, J Amiot<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Département de nutrition humaine et de consommation, groupe de recherche en nutrition humaine;

<sup>2</sup> Centre de recherche en sciences et technologie du lait, Université Laval,  
Sainte-Foy (Québec), Canada G1K 7P4

(Reçu le 22 juillet 1993 ; accepté le 7 juillet 1994)

**Résumé** — La combinaison d'une méthode de séparation par HPLC et d'une méthode de dosage par radio-essai a permis de montrer que les quantités d'adénosylcobalamine et de méthylcobalamine diminuent dans les laits pasteurisés, stérilisés et séchés, tandis que celle de la cyanocobalamine augmente dans ces trois laits. Quant à l'hydroxocobalamine, sa quantité est diminuée dans le lait pasteurisé ainsi que dans le lait stérilisé mais augmente dans le lait séché par rapport au lait cru. Une méthode *in vitro* de digestion gastrique et intestinale, mettant en jeu la pepsine, la pancréatine et les facteurs «R» et intrinsèque, combinée aux 2 premières méthodes de dosage, a permis d'évaluer la mise en disponibilité des cobalamines dans du lait soumis à différents traitements thermiques. Ainsi, la vitamine B<sub>12</sub> serait plus disponible dans le lait pasteurisé (1,91 pmol/ml) que dans le lait cru (1,54 pmol/ml), le lait stérilisé (1,25 pmol/ml) et le lait en poudre (1,27 pmol/ml), indiquant une influence possible des traitements thermiques sur la biodisponibilité de la vitamine B<sub>12</sub> dans ces produits, ainsi que des interconversions des isomères de la vitamine B<sub>12</sub> au cours du processus de la digestion *in vitro*.

**traitement thermique / vitamine B<sub>12</sub> / disponibilité / lait**

**Summary** — **Effect of heat treatment on the vitamin B<sub>12</sub> availability in the milks.** *In this work, a combined HPLC-radioassay method allowed to show that adenosylcobalamin and methylcobalamin are decreased in pasteurized and sterilized milks, as well as in dry milk powder while cyanocobalamin increased in these three milks. So, hydroxocobalamin amount decreases in the pasteurized and sterilized milk but increases in the dry milk powder compared with fresh milk. By further using an in vitro gastro-intestinal method, using pepsin and pancreatin as well as 'R' and intrinsic factors, it was possible to evaluate cobalamin availability in some heated milks. Vitamin B<sub>12</sub> was relatively more available in the pasteurized milk (1.91 pmol/ml) than in fresh milk (1.54 pmol/ml), sterilized milk (1.25 pmol/ml) and dry milk powder (1.27 pmol/ml), indicating a possible influence of heat treatment on the vitamin B<sub>12</sub> availability in these products and the conversion between vitamers during in vitro digestion.*

**heat treatment / vitamin B<sub>12</sub> / availability / milk**

\* Correspondance et tirés à part

## INTRODUCTION

La vitamine B<sub>12</sub> appelée cobalamine est une grosse molécule complexe au centre de laquelle se trouve un atome de cobalt. Elle est formée de plusieurs formes chimiques (cobalamines ou isomères de la vitamine B<sub>12</sub>) dont les principales sont la cyanocobalamine (CNCbl), l'hydroxocobalamine (OHCbl), la méthylcobalamine (MeCbl) et l'adénosylcobalamine (AdoCbl). Ces cobalamines sont généralement liées aux protéines dans les aliments et les tissus (Kapel *et al*, 1983).

Des rapports récents sur la présence des analogues des cobalamines dans les tissus humains (Kolhouse *et al*, 1978) et animaux (Kondo *et al*, 1980) ont nécessité le développement d'une méthode rapide et sensible : la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pour le dosage de la vitamine B<sub>12</sub> et la séparation de ses isomères. Mais, compte tenu de la faible quantité de certaines cobalamines dans les tissus et le plasma, Frenkel *et al* (1980), de même que Kapel *et al* (1983), ont combiné le système de gradient de HPLC avec la méthode de dilution isotopique pour mesurer les cobalamines respectivement dans les tissus et dans le plasma. Cette méthode de radiodilution repose sur le principe d'une inhibition compétitive de la vitamine B<sub>12</sub> non marquée et de la vitamine B<sub>12</sub> radiomarkée dans une solution titrée de facteur intrinsèque. La méthode est simple, rapide et détecte des quantités de vitamine B<sub>12</sub> de l'ordre de 50 à 100 pg (Gutcho et Manbach, 1977) comparativement à la méthode de HPLC dont la limite de détection est de 1 µg (Frenkel *et al*, 1979).

L'acide chlorhydrique et la pepsine de l'estomac libèrent des protéines alimentaires, les cobalamines, qui se lient préférentiellement aux glycoprotéines «R» d'origine salivaire et gastrique (Schade et Schilling, 1967). Les cobalamines sont par la suite libérées du facteur «R» dans la partie proximale de

l'intestin grêle, au niveau du duodénum, par les protéases pancréatiques, principalement la trypsine et la chymotrypsine (Reizenstein, 1959 ; Carmet *et al*, 1983). Les cobalamines libres se lient ensuite au facteur intrinsèque, une glycoprotéine d'origine gastrique (Ellenbogen et Copper, 1991). Les complexes cobalamines-facteur intrinsèque se fixent par leurs parties protéiques à des récepteurs spécifiques de l'iléon terminal. Les complexes y sont dissociés et les cobalamines libres pénètrent dans la cellule intestinale. Certaines des cobalamines sont néanmoins absorbées lorsqu'elles sont liées à des protéines délivrantes (transcobalamines II), puis transportées rapidement au foie et à d'autres cellules proliférantes. D'autres cobalamines, en revanche, sont absorbées et s'attachent, d'une part, aux cobalophilines du sérum appelées facteur «R» et, d'autre part, aux transcobalamines I et III. Ces dernières protéines transportent les cobalamines seulement au foie et permettent d'éliminer les analogues indésirables de la vitamine B<sub>12</sub> via la bile (Munnich *et al*, 1987).

Les isomères de la vitamine B<sub>12</sub>, en raison de leur activité de coenzyme, jouent un rôle important dans de nombreuses voies métaboliques (Munnich *et al*, 1987). Principalement 2 d'entre eux, l'adénosylcobalamine et la méthylcobalamine, sont respectivement impliqués dans la réaction d'insomérisation qui transforme le méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA par la méthylmalonyl-CoA mutase et la réaction de transméthylation qui permet la formation de la méthionine à partir de l'homocystéine en présence de l'acide folique.

Comme pour les autres nutriments, la biodisponibilité de la vitamine B<sub>12</sub> dépend de l'efficacité avec laquelle cette vitamine sera d'abord libérée de sa matrice alimentaire par les processus de la digestion (mise en disponibilité), puis absorbée au niveau intestinal et finalement utilisée par l'organisme (Schade et Schilling, 1967 ; Munnich *et al*, 1987).

La biodisponibilité de la vitamine B<sub>12</sub> pourrait donc varier d'un aliment à l'autre. Ainsi, certains auteurs ont montré chez l'humain que l'absorption de vitamine B<sub>12</sub> marquée en combinaison avec de la viande de mouton (Heyssel *et al*, 1966) et de poulet (Doscherholmen *et al*, 1978) était équivalente à l'absorption observée avec de la vitamine B<sub>12</sub> cristalline, tandis qu'en combinaison avec des œufs, l'absorption mesurée *in vivo* et *in vitro* (Doscherholmen *et al*, 1975 ; 1976) était nettement plus faible. Levine et Doscherholmen (1983) ont d'ailleurs montré que la vitamine B<sub>12</sub> dans les œufs est présente sous forme de coenzyme B<sub>12</sub>, la forme isomérique de la vitamine B<sub>12</sub> la moins bien absorbée par l'organisme, selon Adams *et al*, 1971. De même, Dagnelie *et al* (1991) ainsi que Van Den Berg *et al* (1991) ont montré que la vitamine B<sub>12</sub> n'est pas biodisponible dans certaines algues comme la spiruline et la noria qui sont pourtant reconnues pour avoir un contenu élevé en vitamine B<sub>12</sub>. En effet, la spiruline contient 16,9% de cobalamine et 82,8% d'analogues de cobalamine (Herbert et Drivas, 1982). Or, selon Kshistish *et al* (1991), les analogues des cobalamines ne seraient pas biodisponibles.

Le lait et les produits laitiers sont reconnus pour jouer un rôle appréciable dans le ravitaillement de l'organisme en vitamine B<sub>12</sub>. En effet, le lait de vache contient entre 0,27 et 0,65 µg/100 ml de vitamine B<sub>12</sub> (Heyssel *et al*, 1966 ; Adams *et al*, 1973 ; Rauch *et al*, 1985 ; Gimsing et Beck, 1987) qui à cette concentration serait absorbée à un taux de 70 à 80% (Heyssel *et al*, 1966 ; Herbert, 1988). Le lait et les produits laitiers pourraient donc contribuer à fournir plus de 30% des apports journaliers en cette vitamine, selon les recommandations des guides alimentaires canadiens (*Santé et Bien-être social Canada*, 1992).

La vitamine B<sub>12</sub> dans le lait frais est liée à 95% aux protéines lactières (Gizis *et al*, 1965 ; Gimsing et Beck, 1987). Mais cette

liaison de la vitamine B<sub>12</sub> avec les protéines ne résiste que partiellement aux traitements thermiques, ce qui provoque la libération de la vitamine B<sub>12</sub> (Chapman *et al*, 1957 ; Ford, 1967 ; Scott et Bishop, 1986), laquelle devient alors thermosensible (Causeret et Mocquot, 1966). Ainsi, les pertes de vitamine B<sub>12</sub> totale causées par les traitements thermiques ont bien été établies par plusieurs auteurs (Chapman *et al*, 1957 ; Causeret et Mocquot, 1966 ; Gregory, 1967). Les pertes provoquées par la pasteurisation seraient, en règle générale, inférieures à 13% mais seraient plus élevées dans le lait stérilisé UHT (17 à 20%) et dans le lait écrémé en poudre (20%). En revanche, aucune information concernant l'effet des traitements thermiques sur les isomères de la vitamine B<sub>12</sub> et sur leur biodisponibilité dans le lait et les produits laitiers n'est présentement disponible.

On sait, en effet, que des enzymes digestives gastriques (pepsine) et intestinales (pancréatine) et des glycoprotéines liantes (facteur «R» et intrinsèque) sont autant d'éléments qui sont susceptibles d'intervenir sur la biodisponibilité de la vitamine B<sub>12</sub>. Dans le cas de la vitamine B<sub>12</sub>, c'est au niveau des processus de digestion gastro-intestinaux que sont susceptibles d'être mesurables les modifications entraînées par l'effet des traitements thermiques sur les isomères de la vitamine B<sub>12</sub> et leur liaison avec les protéines lactières.

Bien que l'approche *in vivo* permette de mesurer la biodisponibilité réelle de la vitamine B<sub>12</sub>, cette approche est longue et coûteuse et ne permet pas de distinguer l'effet spécifique de la mise en disponibilité de l'ensemble des phénomènes impliqués dans la biodisponibilité (Dagnelie *et al*, 1991 ; Van Den Berg *et al*, 1991).

L'approche *in vitro* a déjà été utilisée pour étudier la mise en disponibilité de plusieurs éléments tels que le fer, le calcium, les acides aminés (Rao et Prabhavathi, 1978 ; Savoie *et al*, 1989 ; Marin et Zee, 1992).

De même, Reizenstein (1959), Schade et Schilling (1967) et Carmel *et al* (1983) se sont déjà intéressés à la mesure *in vitro* de la mise en disponibilité des cobalamines. Cependant, aucune des méthodes proposées par ces auteurs ne tient compte de l'ensemble des phénomènes impliqués dans la mise en disponibilité des cobalamines et qui inclut : la libération des cobalamines des complexes cobalamines-protéines alimentaires au contact de HCl et de la pepsine, ainsi que leur liaison au facteur «R» dans l'estomac, puis leur libération de ce nouveau complexe par les enzymes protéolytiques pancréatique (trypsine et chymotrypsine) et finalement leur liaison au facteur intrinsèque intestinal, les rendant ainsi disponibles pour l'absorption.

Dans la première étape d'une étude portant sur la biodisponibilité de la vitamine B<sub>12</sub> et de ses isomères dans le lait, ce travail vise spécifiquement à étudier l'influence des traitements thermiques généralement utilisés en industrie sur la vitamine B<sub>12</sub> et ses principaux isomères, ainsi que sur l'ensemble des processus impliqués dans leur mise en disponibilité par une évaluation à l'aide d'une méthode *in vitro* adaptée à cette fin.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Produits

#### Laits

Différents types de lait traité thermiquement (Ferme SMA, Beauport, Québec), ont été préparés à partir de lait cru au laboratoire pilote du département de sciences et technologie des aliments, université Laval (Sainte-Foy, Québec), à l'aide de systèmes de pasteurisation à plaques (75°C, 16 s), de stérilisation UHT (135°C, 4 s) et de séchage par atomisation (95% solides totaux). Le lait cru et les produits laitiers ont ensuite été lyophilisés et entreposés à -30°C.

### Cobalamines

Une solution mixte de standards de cobalamines a été préparée en dissolvant 50 mg de chacun des isomères de la vitamine B<sub>12</sub> suivants : hydroxocobalamine (OHcbl), cyanocobalamine (CNCbl), adénosylcobalamine (AdoCbl) et méthylcobalamine (MeCbl) (Sigma Chemical Co, St-Louis, MO) dans 100 ml d'eau distillée. Une aliquote de cette solution a été diluée au besoin.

### Procédure

#### Extraction des cobalamines par la chaleur

La méthode d'extraction des cobalamines a été celle de Gregory (1954). À 25 ml de lait ou de produits laitiers (lait pasteurisé, lait stérilisé et lait en poudre reconstitué), on ajoute de l'acide chlorhydrique 0,1N (2 à 4 ml) pour amener la solution à pH 4,6. Les échantillons sont chauffés à l'autoclave à 120°C pendant 10 min et filtrés sur papier Whatman no 42. Le pH du filtrat est ensuite ajusté avec NaOH 0,1 N et le volume est complété à 50 ml avec de l'eau distillée. Les fractions du filtrat sont alors concentrées par Sep-Pak C<sub>18</sub> (Waters, Mississauga, Ont) avant la séparation par HPLC. Selon Fie *et al* (1994), la séquence suivie dans le mode d'emploi du Sep-Pak C<sub>18</sub> est la suivante : 1) activer le Sep-Pak C<sub>18</sub> avec 2 ml d'acétonitrile ; 2) le laver avec 6 ml d'eau ; 3) filtrer l'échantillon à travers le Sep-Pak ; 4) relaver le Sep-Pak C<sub>18</sub> avec 2 ml d'eau et le rincer avec 12 ml d'eau ; 5) éluer les cobalamines avec 8 ml d'acétonitrile : eau (1:1 v:v).

#### Extraction des cobalamines par la digestion gastro-intestinale *in vitro* (Fie *et al*, 1993)

Des échantillons de 100 ml de lait et de produits laitiers reconstitués dans de l'eau distillée ont été répartis dans des Erlenmeyers de 500 ml et incubés à 37°C pendant 120 min à pH 2 avec 0,16 mg/ml de pepsine (Sigma Chemical Co, St-Louis, MO ; activité spécifique de 3152 unités Anson/mg de protéine) et 21,6 unités/ml de facteur «R» (Sigma Chemical Co, St-Louis, MO). Par la suite, 0,12 mg de pancréatine (ICN Biochemical Inc, Cleveland, OH) ont été ajoutés au mélange ajusté



à pH 7,5. L'activité de la trypsine (EC 3.4.21.4) et de la chymotrypsine contenues dans la pancréatine étaient respectivement de 5,5 TAME (ester de méthyl  $\alpha$ -*p*-tosyl-L-arginine) unités/mg de protéine (Hummel, 1959) et 4,57 ATEE (ester d'éthyl N-acetyl-L-tyrosine) unités/mg de protéine (Schwert et Takenaka, 1955), respectivement. La trypsine et la chymotrypsine de la pancréatine ont été inhibées après 30 min, par l'ajout d'inhibiteur Borwman-Birk (0,5 mg/ml) (Sigma Chemical Co, St-Louis, MO). Les échantillons ainsi obtenus ont été refroidis à 4°C et centrifugés à 3000 g à 25°C à l'aide du dispositif Centriprep-10 (Amicon Division, WR Grace et Co, Beverley, MA), afin de récupérer dans les filtrats les quantités de cobalamines libérées et potentiellement absorbables. Celles-ci ont été séparées par HPLC (Jacobsen *et al*, 1982) avant d'être quantifiées par radio-essai.

### Chromatographie par HPLC

Un chromatographe en phase liquide (Waters, Mississauga, Ont) équipé d'un spectrophotomètre Waters 440 réglé à 254 nm (Frenkel *et al*, 1979 ; Jacobsen *et al*, 1982), d'un injecteur U6-K et de 2 pompes Waters 6000 délivrant les solvants dans une colonne Lichrosphère Rp8 (BDH Inc, Toronto, Ont) à une vitesse de 1 ml/min (sous une pression d'environ 1000 PSI) a été utilisé afin de séparer les cobalamines.

Le gradient utilisé (Jacobsen *et al*, 1982) était constitué d'acide phosphorique ajusté à pH 3,0 avec de l'hydroxyde d'ammonium concentré et d'acétonitrile (BDH Inc, Toronto, Ont) (pompe B). Les 2 solvants ont été filtrés avec des filtres 0,45  $\mu$ m (Micron Separations Inc). La colonne a été éluée par une augmentation de concentration d'acétonitrile de 5 à 30% au cours d'une période de 16 min.

Les fractions recueillies par HPLC, à différents temps de rétention, ont été lyophilisées (Lyophilisateur modèle TD/FD, FTS systems, Inc, Stone Ridge, NY) et leur contenu en isomères de la vitamine B<sub>12</sub> a été dosé par une méthode radio-essai (Bio-Rad Clinical Division, Mississauga, Ont).

### Dosage par radio-essai

Les trousseaux de radioactivité (Bio-Rad Clinical Division, Mississauga, Ont) utilisant le facteur intrinsèque comme protéine liante ont permis de

déterminer des concentrations de vitamine et des différents isomères de la vitamine B<sub>12</sub> comprises entre 100 et 2000 pg/ml. La même méthode a été utilisée pour mesurer la liaison des cobalamines du lait et des produits laitiers avec le facteur intrinsèque.

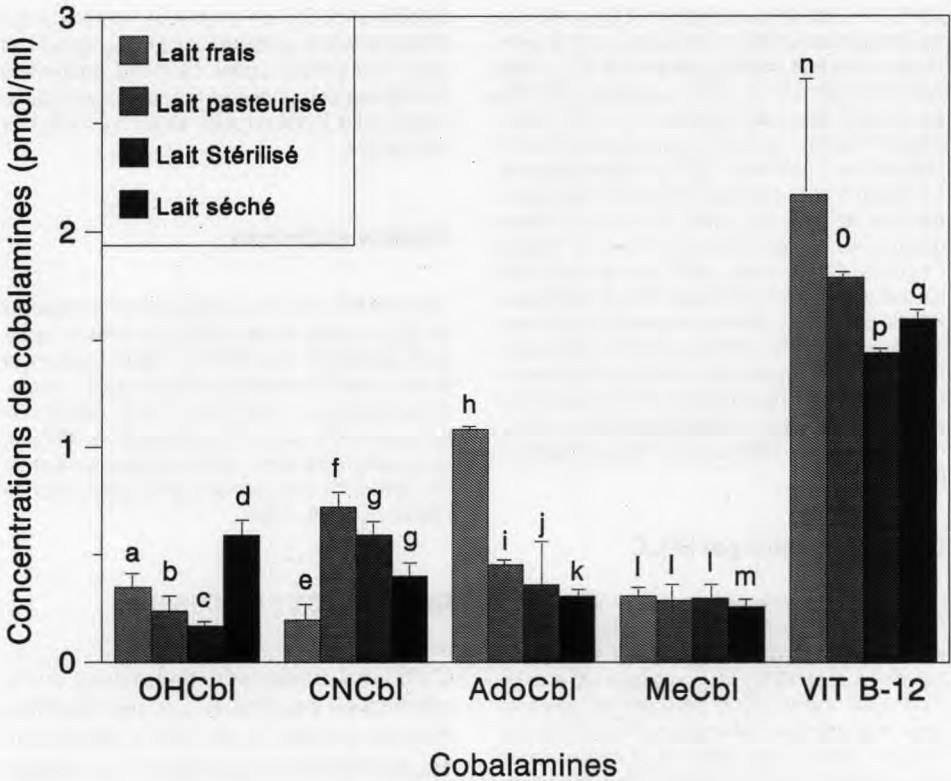
### Analyse statistique

Les données ont été analysées selon un dispositif en bloc complet en factoriel 2 x 4 avec 6 répétitions (Snedecor et Cochran, 1989). Le premier facteur était la méthode utilisée (HPLC-radio-essai, digestion *in vitro*-HPLC, radio-essai) et le second était le lait (cru, pasteurisé vs stérilisé, en poudre reconstitué). Des comparaisons entre les différents laits ont été effectuées avec le LSMeans (SAS, 1988).

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'effet des traitements thermiques sur le contenu en vitamine B<sub>12</sub> et ses isomères dans les produits laitiers par rapport au lait cru est présenté sur la figure 1. Le dosage de la vitamine B<sub>12</sub> totale montre qu'il y a une perte de 18% dans le lait pasteurisé provenant principalement des formes hydroxocobalamine (31%) et adénosylcobalamine (58%). Pour le lait stérilisé, les pertes de vitamine B<sub>12</sub> (36%) seraient principalement reliées aux formes hydroxocobalamine (51%) et surtout adénosylcobalamine (66,6%). Pour le lait en poudre, la perte de vitamine B<sub>12</sub> (21%) serait surtout associée à l'adénosylcobalamine (71%). Cependant, on trouve une augmentation de 69% d'hydroxocobalamine dans le lait en poudre. Quant à la cyanocobalamine, elle subit une augmentation de 260% dans le lait pasteurisé, de 195% dans le lait stérilisé et de 100% dans le lait en poudre.

Les pertes de la vitamine B<sub>12</sub> totale observées pour chacun des produits laitiers par rapport au lait cru semblent augmenter avec l'intensité du traitement thermique. Les pertes



**Fig 1.** Effet des traitements thermiques sur la vitamine B<sub>12</sub> totale et ses isomères dans le lait et certains produits laitiers. Chaque barre correspond à la moyenne des cobalamines du lait ou des produits laitiers  $\pm$  SEM de 6 répétitions. Les moyennes qui portent les mêmes lettres pour chaque cobalamin (OHCbl, CNCbl, AdoCbl, MeCbl ou VIT B<sub>12</sub>) ne sont pas significativement différentes ( $P < 0,01$ ).

*Effect of heat treatment of vitamin B<sub>12</sub> and vitamin B<sub>12</sub> vitamers in milk and dairy products. Each bar corresponds to the mean of cobalamins of milk or dairy products  $\pm$  SEM of 6 repetitions. Means having the same letters for each cobalamin (OHCbl, CNCbl, AdoCbl, MeCbl or vit B<sub>12</sub>) are not significantly different ( $P < 0.01$ ).*

ainsi enregistrées sont supérieures à celles déjà rapportées (10 à 28%) (Chapman *et al*, 1957 ; Causeret et Mocquot, 1966) à l'exception du lait en poudre. Cette différence s'expliquerait surtout par les méthodes analytiques utilisées. En effet, les valeurs rapportées antérieurement ont été obtenues à l'aide de méthodes microbiologiques pour doser cette vitamine. Cependant, selon Richardson *et al* (1978), les mesures de

contenu en vitamine B<sub>12</sub> dans les produits alimentaires obtenues par les méthodes microbiologiques sont complètement différentes et souvent surestimées par rapport à celles trouvées à l'aide des méthodes radio-essai. Ces dernières pouvant séparer les cobalamines des autres corrinoides (Kolhouse *et al*, 1978 ; Herbert et Drivas, 1982), ce qui ne peut pas être fait adéquatement par les essais microbiologiques (Anderson, 1964).

Les résultats du taux de libération des isomères de la vitamine B<sub>12</sub> par digestion *in vitro* et de dosage par HPLC-radio-essai sont présentés aux tableaux I et II. Pour le lait cru, les quantités libérées de l'hydroxocobalamine (0,65 pmol/ml) et de l'adénosylcobalamine (0,64 pmol/ml), sont les plus élevées. Par ailleurs, pour le lait pasteurisé,

ces mêmes isomères sont libérées en plus fortes quantités (47 et 42%) par rapport à la cyanocobalamine (5%) pourtant en concentrations supérieures à l'adénosylcobalamine et l'hydroxocobalamine respectivement dans le produit (tableau II). Aussi, la quantité totale des isomères libérés (1,90) est plus élevée que la concentration totale

**Tableau I.** Les quantités de cobalamines (pmol/ml) mises en disponibilité (*in vitro*) dans le lait et certains produits laitiers.

*Amount of available cobalamins (pmol/ml) in milk and dairy products.*

Lait	OHCbl	CNCbl	AdoCbl	MeCbl	Total
Cru	0,65 ± 0,03 <sup>be</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>bf</sup>	0,64 ± 0,01 <sup>be</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>bf</sup>	1,54 ± 0,07 <sup>b</sup>
Pasteurisé	0,90 ± 0,10 <sup>ae</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>ch</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>af</sup>	0,104 ± 0,01 <sup>cg</sup>	1,91 ± 0,11 <sup>a</sup>
Stérilisé	0,67 ± 0,02 <sup>be</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>bh</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>cf</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>dh</sup>	1,25 ± 0,06 <sup>c</sup>
En poudre	0,91 ± 0,07 <sup>ae</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>af</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>dg</sup>	0,074 ± 0,01 <sup>dh</sup>	1,27 ± 0,07 <sup>c</sup>

Les valeurs présentées sont les moyennes ± SEM de 6 répétitions. Les différentes lettres correspondent à une différence significative dans chacune des colonnes (a-d) et dans chacune des rangées (e-h) ( $P < 0,01$ ).

*The values showed are the means ± SEM of 6 repetitions. The different letters indicate significant ( $P < 0,01$ ) differences in columns (a-d) and rows (e-h).*

**Tableau II.** Comparaison des concentrations des cobalamines (pmol/ml) et des quantités des cobalamines mises en disponibilité dans le lait et certains produits laitiers.

*Comparison of cobalamin concentrations (pmol/ml) and of amounts of available cobalamins in milk and dairy products.*

Lait	Cobalamines							
	OHCbl		CNCbl		AdoCbl		MeCbl	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
Cru	0,35 <sup>b</sup>	0,65 <sup>a</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0,12 <sup>b</sup>	1,08 <sup>a</sup>	0,64 <sup>b</sup>	0,31 <sup>a</sup>	0,13 <sup>b</sup>
Pasteurisé	0,24 <sup>b</sup>	0,90 <sup>a</sup>	0,72 <sup>a</sup>	0,09 <sup>b</sup>	0,45 <sup>b</sup>	0,80 <sup>a</sup>	0,29 <sup>a</sup>	0,10 <sup>b</sup>
Stérilisé	0,17 <sup>b</sup>	0,67 <sup>a</sup>	0,59 <sup>a</sup>	0,11 <sup>b</sup>	0,36 <sup>a</sup>	0,23 <sup>b</sup>	0,30 <sup>a</sup>	0,24 <sup>b</sup>
En poudre	0,59 <sup>b</sup>	0,91 <sup>a</sup>	0,40 <sup>a</sup>	0,19 <sup>b</sup>	0,31 <sup>a</sup>	0,10 <sup>b</sup>	0,26 <sup>a</sup>	0,07 <sup>b</sup>

Les différentes lettres correspondent à une différence significative dans chacune des rangées (a-b) ( $P < 0,01$ ). M1 : combinaison des méthodes de HPLC et de radio-essai ; M2 : combinaison des méthodes de digestion *in vitro* et HPLC-radio-essai.

*The different letters indicate significant differences in rows (a-b) ( $P < 0,01$ ). M1: HPLC and radio-assay; M2: in vitro method and HPLC and radio-assay.*

de ces isomères (1,70) dans 1 ml de lait pasteurisé ; cette différence serait attribuable aux méthodes d'extraction (extraction par la chaleur vs extraction par méthode *in vitro*) totalement différentes dans les 2 cas. Quant au lait en poudre, seulement l'hydroxocobalamine est libérée en quantité plus élevée (72%) ( $P < 0,01$ ) que les autres isomères, dont les taux de libération sont généralement proportionnels à leurs concentrations dans le produit. De même, pour le lait stérilisé, l'hydroxocobalamine (53%) est libérée à des taux supérieurs aux autres isomères ( $P < 0,01$ ) ; cependant, contrairement au lait en poudre, la forme hydroxocobalamine est la moins abondante dans le lait stérilisé.

Les quantités des isomères de la vitamine B<sub>12</sub> libérées par la méthode de digestion *in vitro* sont donc significativement différentes de celles contenues dans les différents produits. Plus particulièrement, la quantité d'hydroxocobalamine libérée *in vitro* est plus élevée dans tous les laits ( $P < 0,01$ ), ainsi que l'adénosylcobalamine dans le lait pasteurisé ( $P < 0,01$ ). Cela peut être imputable à des interconversions possibles des isomères de la vitamine B<sub>12</sub> au cours du processus de la digestion *in vitro* (Wokes et Picard, 1955). En effet, bien que peu d'information soit disponible en ce qui concerne les changements chimiques que peuvent subir les cobalamines durant la digestion, plusieurs auteurs ont souligné l'interconversion des isomères de la vitamine B<sub>12</sub> durant l'absorption (Okuda *et al*, 1973).

En effet, la mise en disponibilité plus élevée de l'adénosylcobalamine serait due à la conversion de la cyanocobalamine en adénosylcobalamine au cours de la digestion intestinale. La cyanocobalamine serait instable en milieu alcalin ou neutre, alors que l'adénosylcobalamine y serait stable (Gregory, 1954 ; Schrauzer et Sibert, 1970). Ces observations corroborent celles de Peters et Hoffman (1970) et Peters *et al*

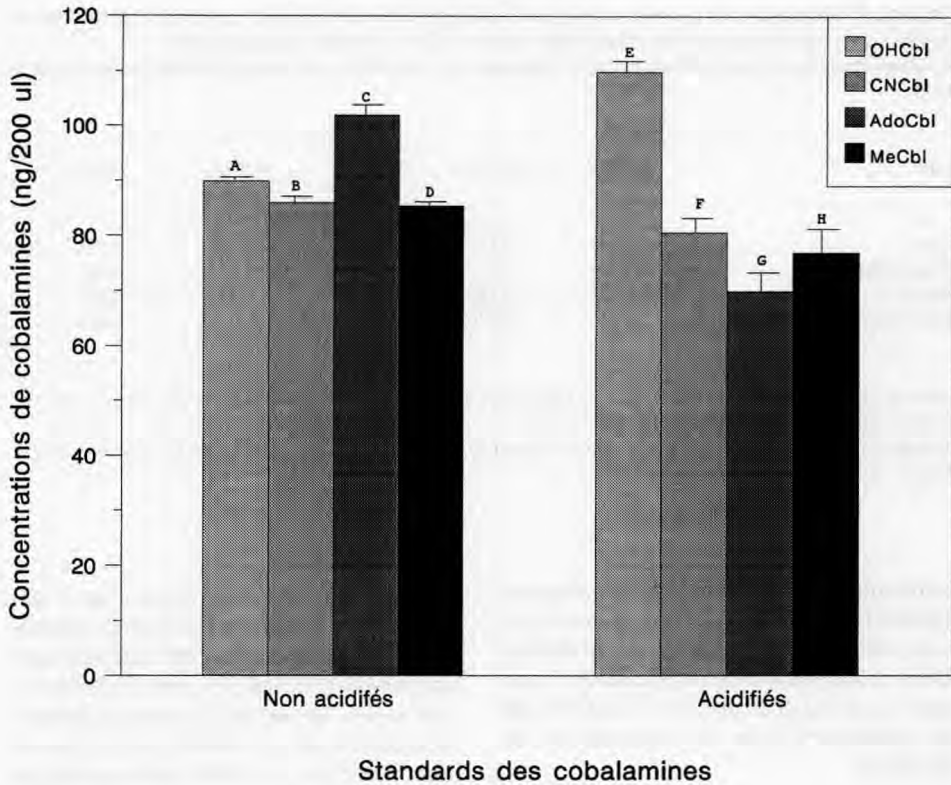
(1971a et 1971b), qui ont démontré chez le porc la conversion de la CNCbl au cours de l'absorption intestinale en adénosylcobalamine et d'autres cobalamines non identifiées, dont possiblement l'hydroxocobalamine, mais non la méthylcobalamine. Cette hypothèse pourrait être vérifiée éventuellement par l'ajout de standards internes avant de commencer la digestion gastrique et intestinale *in vitro*.

La mise en disponibilité élevée de l'hydroxocobalamine serait due à la conversion de cyanocobalamine, méthylcobalamine et adénosylcobalamine en hydroxocobalamine au cours de la digestion gastrique et intestinale. De façon parallèle, Peters *et al* (1971b) ont déjà observé une légère conversion de la méthylcobalamine en hydroxocobalamine durant l'absorption de la vitamine B<sub>12</sub> dans la mitochondrie. De même, Reizenstein (1967) a noté la conversion de cyanocobalamine sous forme cristalline en hydroxocobalamine *in vivo* chez l'humain et *in vitro*.

Les résultats présentés sur la figure 2 illustrent aussi que l'acidité stomacale peut à elle seule provoquer une conversion de l'adénosylcobalamine et de la méthylcobalamine en hydroxocobalamine. Cette constatation correspond aux observations faites par Hogenkamp *et al* (1965), qui ont démontré la fragmentation de l'adénosylcobalamine en solution acide. Hogenkamp (1961) a aussi observé qu'en solution acide la décomposition de l'adénosylcobalamine en hydroxocobalamine et adénine peut se produire.

En tenant compte, d'une part, des taux d'absorption des isomères de la vitamine B<sub>12</sub> établis chez l'humain (hydroxocobalamine : 56%, cyanocobalamine : 49%, méthylcobalamine : 44% et adénosylcobalamine : 33%) tels que rapportés par Adams *et al* (1971) et, d'autre part, du taux de libération de ces isomères rapporté dans la présente étude, plus de vitamine B<sub>12</sub> (tableau III) pourrait être absorbée à partir du lait





**Fig 2.** Influence de l'acidité sur les solutions-étalons de cobalamines. Chaque barre correspond à la moyenne  $\pm$  SEM de 6 répétitions. Les moyennes qui portent les mêmes lettres que celles des solutions-étalons de cobalamines acidifiées ne sont pas significativement différentes ( $P < 0,01$ ).  
*Effect of acidity on cobalamins standard. Each bar corresponds to the mean  $\pm$  SEM of 6 repetitions. Means having the same letters are not significantly different ( $P < 0.01$ ).*

pasteurisé (0,86 pmol/ml), comparativement au lait cru (0,7 pmol/ml), au lait en poudre (0,66 pmol/ml) et au lait stérilisé (0,62 pmol/ml), en raison de la disponibilité supérieure de la forme hydroxocobalamine dans le lait pasteurisé. De plus, Adams *et al* (1971) ont démontré que la forme hydroxocobalamine est mieux absorbée chez l'humain. D'ailleurs, selon les observations de Doscherholmen *et al* (1975), la vitamine B<sub>12</sub> a une biodisponibilité faible dans les œufs, due à l'absence d'OHCbl, et est présente surtout sous forme d'adénosylcoba-

lamine, qui est moins bien absorbée chez l'humain.

Les résultats de la présente étude montrent que la mise en disponibilité de la méthylcobalamine est nettement plus faible que celle de l'hydroxocobalamine et l'adénosylcobalamine dans tous les laits expérimentés. Par contre, celle de l'adénosylcobalamine est supérieure dans le lait pasteurisé par rapport au lait cru ainsi qu'au lait stérilisé et au lait en poudre ( $P < 0,01$ ). Si l'on tient compte de la somme des quantités potentiellement absorbables de méthyl-

**Tableau III.** Estimation des quantités des cobalamines (pmol/ml) absorbables à partir des quantités des cobalamines (pmol/ml) mises en disponibilité dans le lait et certains produits laitiers.

*Estimation of the amount of absorbable cobalamins from available cobalamins in milk and dairy products.*

Lait	OHCbl	CNCbl	AdoCbl	MeCbl	Total
Cru	0,36	0,06	0,22	0,06	0,70
Pasteurisé	0,50	0,04	0,27	0,05	0,86
Stérilisé	0,37	0,06	0,08	0,11	0,62
En poudre	0,51	0,09	0,03	0,03	0,66

Ces valeurs ont été obtenues en se basant sur l'absorption telle que définie par Adams *et al* (1971): OHCbl = 55,7%, CNCbl = 49,2%, MeCbl = 44,4% et AdoCbl = 33,7%.

*The values shown are from absorption values obtained by Adams et al (1971): OHCbl = 55.7%, CNCbl = 49.2%, MeCbl = 44.4% and AdoCbl = 33.7%.*

cobalamine et de l'adénosylcobalamine (tableau III), la vitamine B<sub>12</sub> aurait une activité coenzymatique plus élevée et directe dans le lait pasteurisé (0,32 pmol/ml) que dans le lait cru (0,28 pmol/ml), le lait stérilisé (0,19 pmol/ml) et le lait en poudre (0,06 pmol/ml).

En effet, les 2 isomères de la vitamine B<sub>12</sub> qui ont une activité coenzymatique chez l'humain sont la méthylcobalamine et l'adénosylcobalamine (Munnich *et al*, 1987; Ellenbogen et Copper, 1991). Les formes cyanocobalamine et hydroxocobalamine peuvent néanmoins être converties dans les cellules en adénosylcobalamine et en méthylcobalamine (Dillon *et al*, 1974) et pourraient donc contribuer à l'activité coenzymatique de façon indirecte.

## CONCLUSION

La combinaison d'une méthode de digestion *in vitro* et d'une méthode de dosage par HPLC-radio-essai s'est avérée simple et rapide à utiliser et son usage pourrait être étendu à d'autres produits alimentaires pour l'évaluation de la disponibilité de la vitamine

B<sub>12</sub> dans ces produits. À cet effet, il est apparu que le dosage des formes isomériques de la vitamine B<sub>12</sub> est essentiel pour bien suivre l'effet spécifique des traitements. Néanmoins, des essais biologiques seraient nécessaires afin de vérifier que la mise en disponibilité et l'activité coenzymatique étaient supérieures dans le lait ayant subi un traitement thermique léger comme la pasteurisation.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce aux subventions du CRSNG (dépenses courantes) et de l'entente auxiliaire Canada-Québec.

Les auteurs remercient A Guihède, Ph D, Président du service financier en courtage Guihède inc, pour son support financier et intellectuel, de même que Bernard Beliveau, du département de science et technologie des aliments, pour son aide technique.

## RÉFÉRENCES

- Adams JF, Sheila K, Ross L, Mervyn KB, King P (1971) Absorption of cyanocobalamin, coenzyme B<sub>12</sub>,

- methylcobalamin and hydroxocobalamin at different dose levels. *Scand J Gastroenterol* 6, 249-252
- Adams JF, Mcemann F, Wilson A (1973) The vitamin B<sub>12</sub> content of meals and item of diet. *Br J Nutr* 29, 65-72
- Anderson BB (1964) Investigation into the Euglena method for the assay of the vitamin B<sub>12</sub> in serum. *J Clin Pathol* 17, 14-26
- Carmel R, Abranson SB, Renner IG (1983) Characterization of pure human pancreatic juice: cobalamin content, cobalamin-binding proteins and activity against human R binders of various secretion. *Clin Sci* 64, 193-205
- Causeret J, Mocquot G (1966) Effet des traitements thermiques du lait sur la valeur nutritive. *Ann Nutr Aliment* 1, 31-38
- Chapman HR, Ford JE, Kon SK, Thomson SY, Rowland SJ (1957) Further studies of the effect of processing on some vitamins of the B complex in milk. *J Dairy Res* 24, 191-197
- Dagnelie PC, Van Staveren HA, Van Den Berg H (1991) Vitamin B<sub>12</sub> from algae appears not to be bioavailable. *Am J Clin Nutr* 53, 695-697
- Dillon MJ, England JM, Compertz D *et al* (1974) Mental retardation, megaloblastic anemia, methylmalonic aciduria and abnormal homocysteine metabolism due to an error in vitamin B<sub>12</sub> metabolism. *Clin Sci Mol Med* 47, 43-61
- Doscherholmen A, McMahon J, Ripley D (1975) Vitamin B<sub>12</sub> absorption from eggs. *Proc Soc Exp Biol Med* 149, 987-990
- Doscherholmen A, McMahon J, Ripley D (1976) Inhibitory effect of eggs on vitamin B<sub>12</sub> absorption: description of a simple ovalbumin <sup>57</sup>Co-vitamin B<sub>12</sub> absorption test. *Br J Haematol* 33, 261-272
- Doscherholmen A, McMahon J, Ripley D (1978) Vitamin B<sub>12</sub> assimilation from chicken meat. *Am J Clin Nutr* 31, 825-830
- Ellenbogen L, Copper BA (1991) Vitamin B<sub>12</sub>. In: *Handbook of vitamins* (LJ Machlin, ed). Marcel Dekker Inc, NY, 491-539
- Fie M, Zee AJ, Lavigne C, Amiot J (1993) Mesure de la mise en disponibilité des isomères de la vitamine B<sub>12</sub> par digestion gastrique et intestinale *in vitro*. *Microbiol Aliment Nutr* 11, 415-424
- Fie M, Zee AJ, Amiot J (1994) Séparation et quantification des isomères de la vitamine B<sub>12</sub> dans le lait et certains produits laitiers par chromatographie liquide haute performance et par radio-essai. *Sci Aliments* (sous presse)
- Frenkel EP, Kitchens RL, Prough R (1979) High-performance liquid chromatographic separation of cobalamins. *J Chromatogr* 174, 393-400
- Frenkel EP, Kitchens RL, Prough R (1980) Measurement of tissue vitamin B<sub>12</sub> by radioisotopic competitive inhibition assay and quantitation of tissue cobalamin fractions. *Method Enzymol* 67, 31-39
- Ford JE (1967) The influence of dissolved oxygen in milk on the stability of some vitamins towards heating and during subsequent exposure to sunlight. *J Dairy Res* 34, 239-247
- Gimsing P, Beck W (1987) Determination of cobalamins in biological materials. *Method Enzymol* 123, 1-14
- Gizis E, Kim YP, Brunner JR, Schweigert BS (1965) Vitamin B<sub>12</sub> content and binding capacity of cow's proteins. *J Nutr* 87, 349-352
- Gregory EM (1954) The microbiological assay of "vitamin B<sub>12</sub>" in the milk of different animal species. *J Nutr* 8, 340-347
- Gregory EM (1967) Reviews of the progress of dairy science. Section D. Nutritive value of milk and milk products. Water-soluble vitamin in milk and milk products. *J Dairy Res* 34, 169-181
- Gutcho S, Manbach L (1977) Simultaneous radioassay of serum vitamin B<sub>12</sub> and folic acid. *Clin Chem* 23, 1609-1614
- Herbert V (1988) Vitamin B<sub>12</sub>: plant sources, requirements, and assay. *Am J Clin Nutr* 48, 852-858
- Herbert V, Drivas G (1982) Spirulina and vitamin B<sub>12</sub>. *JAMA* 248, 3096-3097
- Heyssel RM, Bozian RC, Darby WJ, Well MC (1966) Vitamin B<sub>12</sub> turnover in man: the assimilation of vitamin B<sub>12</sub> from natural foodstuffs by man and estimates of minimal daily dietary requirements. *Am J Clin Nutr* 18, 176-184
- Hogenkamp HPC (1961) Biochemistry and pathology. In: *Cobalamin* (MB Bernard, ed). New York, USA
- Hogenkamp HPC, Rush JE, Swenson CA (1965) Observations on the organometallic bond of the corrinoid coenzymes. *J Biol Chem* 240, 3641-3644
- Hummel BCW (1959) A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Can J Biochem Physiol* 37, 1393-1399
- Jacobsen DW, Green R, Quadro EV, Montejano YD (1982) Rapid analysis of cobalamin coenzymes and related corrinoid analogs by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 120, 394-403
- Kapel JV, Spukers LJM, Lindemans J, Abels J (1983) Improved distribution analysis of cobalamins and cobalamin analogues in human plasma in which the use of thiol-blocking agents is a prerequisite. *Clin Chim Acta* 131, 211-224
- Kolhouse JF, Kondo H, Allen NC, Podell RNE, Allen RH (1978) Cobalamin analogues are present in human plasma and can mask cobalamin deficiency because current radioisotope dilution assays are not specific for true cobalamin. *N Engl J Med* 299, 785-792
- Kondo H, Kolhouse JF, Allen RH (1980) Presence of cobalamin analogues in animal tissue. *Proc Natl Acad Sci* 77, 817-832
- Kshitish C, Manussellis DC, Herbert V (1991) Determination of vitamin B<sub>12</sub> (cobalamin) in serum and ery-

- trocytes by radioassay, and of holo-transcobalamin II (holo-TC II) and holo-haptocorrin (holo-TCI and III) in serum by adsorbing holo-TC II on microfine silica. *J Nutr Biochem* 2, 455-467
- Levine AS, Doscherholmen A (1983) Vitamin B<sub>12</sub> bioavailability from egg yolk and egg white: relationship to binding proteins. *Am J Clin Nutr* 38, 436-439
- Marin J, Zee JA (1992) Influence des hydrocolloïdes sur la biodisponibilité potentielle du calcium dans des produits laitiers. *Microbiol Aliment Nutr* 10, 23-28
- Munnich A, Ogier H, Saudubray JM (1987) *Les vitamines. Aspects métaboliques, génétiques, nutritionnels et thérapeutiques*. Masson, Paris
- Okuda K, Yashuma K, Kitazaki T, Takana I (1973) Intestinal absorption and concurrent chemical of methylcobalamin. *J Lab Clin Med* 81, 557-562
- Peters TJ, Hoffman AV (1970) Absorption of vitamin B<sub>12</sub> by the guinea pig. I. Subcellular localization of vitamin B<sub>12</sub> in the ileal enterocyte during absorption. *Br J Haematol* 19, 369-382
- Peters TJ, Quainlan A, Hoffman AV (1971a) Absorption of vitamin B<sub>12</sub> by guinea-pig. II. The subcellular localization of cyano, methyl and adenosyl, and the effect of fluoroacetate on cyanocobalamin absorption. *Br J Haematol* 20, 123-129
- Peters TJ, Linnell JC, Matthews DM, Hoffbrand AV (1971b) Absorption of vitamin B<sub>12</sub> by guinea-pig. III. The forms of vitamin B<sub>12</sub> in ileal mucosa and portal plasma in the fasting state and during absorption of cyanocobalamin. *Br J Haematol* 20, 299-305
- Rao BSN, Prabhavathi T (1978) An *in vitro* method for predicting the bioavailability of iron from foods. *Am J Clin Nutr* 31, 169-175
- Rauch P, Kas J, Kubelka M (1985) Simultaneous determination of folacin and cyanocobalamin in food samples by radioassay. *Sbornik Vysoke školy chmicko-technologické V Praze* E 59, 55-63
- Reizenstein P (1959) Effect of digestive enzymes on bound vitamin B<sub>12</sub>. *Acta Med Scand* 165, 481-486
- Reizenstein P (1967) Conversion of cyanocobalamin to physiologically occurring form. *Blood* 29, 494-500
- Richardson PJ, Favell DJ, Gidley GC, Jones GH (1978) Application of a commercial radioassay test kit to the determination of vitamin B<sub>12</sub> in food. *Analyst* 103, 865-868
- Santé et Bien-être Social Canada (1992) Apports nutritionnels recommandés pour les canadiens. Santé et Bien-être Social Canada, Ottawa, Approvisionnement et Services Canada, 12 p
- SAS (1988) *SAS/STAT User's guide* (Release 6.03). SAS. Inst, Inc, Cary, NC
- Savoie L, Charbonneau R, Parent G (1989) *In vitro* amino acid digestibility of food proteins as measured by the digestion cell technique. *Plant Food Hum Nutr* 39, 93-107
- Schade SG, Schilling RF (1967) Effect of pepsin on the absorption of food vitamin B<sub>12</sub> and iron. *Am J Clin Nutr* 20, 636-640
- Schrauzer GN, Sibert JW (1970) Coenzyme B<sub>12</sub> and coenzyme B<sub>12</sub> model compounds in the catalysis of the dehydration of glycols. *J Am Chem Soc* 92, 1022-1030
- Schwert GW, Takenaka Y (1955) A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochem Biophys Acta* 16, 570-575
- Scott KJ, Bishop DR (1986) Nutrient content of milk and milk products: vitamins of the B complex and vitamin C in retail marked milk and milk products. *J Soc Dairy Technol* 39, 32-35
- Snedecor GW, Cochran WG (1989) *Statistical Methods*, Iowa State University Press, Ames, IO
- Van Den Berg H, Brandsen L, Sinkeldam BJ (1991) Vitamin B<sub>12</sub> content and bioavailability of spirulina and nori in rats. *J Nutr Biochem* 2, 314-318
- Wokes F, Picard CW (1955) The role of vitamin B<sub>12</sub> in human nutrition. *Am J Clin Nutr* 3, 383-390