

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement et de la Recherche Scientifique
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene
Faculté de Génie Mécanique et Génie des Procédés



Thèse Présentée pour l'obtention du grade de Docteur en sciences

Spécialité : Génie des Procédés
Option : Technologie Pharmaceutique

Présentée par

M^{lle} BOUHANNACHE Bouchra

Sujet

Etude des systèmes à structure complexe à base de protéines et de polysaccharides

Soutenue publiquement le 04/02/2018 devant le jury composé de :

Pr. DAOUD Kamel	USTHB, FGMGP	Président
Pr. AIT AMAR Hamid	USTHB, FGMGP	Examinateur
Pr. HADJ ZIANE Amel	Université de Blida 1	Examinatrice
Pr. BOUTEKEDJIRET Chahrazed	ENP	Examinatrice
Pr. NASSERELLAH Noureddine	USTHB. FGMGP	Invité
Pr. TOUABET Abdelkrim	USTHB, FCH	Directeur de thèse
Dr. HADJSADOK Abdelkader	Université de Blida 1	Co-Directeur de thèse

Sommaire

Remerciement	
Sommaire.....	
Liste des figures.....	4
Liste des tableaux.....	6
Liste des abréviations	7
Introduction générale	8
Chapitre I	
Revue de littérature	11
I. Emulsions multiples.....	12
I.1.1. Définitions	12
I.1.2. Applications des émulsions multiples	13
I.1.3. Instabilité des émulsions multiples	14
I.1.3.1. Mécanismes d'instabilité communs aux émulsions simples	14
I.1.3.2. Mécanismes d'instabilité relatifs aux émulsions multiples.....	16
I.1.3.3. Nouvelles approches de stabilisation des émulsions multiple.....	19
I.1.4. Fabrication des émulsions multiples	19
I.1.4.1. Méthodes de préparation des émulsions multiples	19
I.1.4.2. Procédés de fabrication des émulsions multiples	21
I.2. Stabilisation des émulsions multiples par des complexes biopolymériques.....	23
I.2.1. Mécanismes de stabilisation des émulsions par les polymères amphiphiles.....	23
I.2.2. Biopolymères comme stabilisants des émulsions multiples (Combinaisons protéine/polysaccharide)	24
I.2.1. Techniques de stabilisation des émulsions par un complexe protéine-polysaccharide	25
I.2.2. Solutions mixtes protéines-polysaccharides.....	26
<i>Nature des interactions impliquant la formation des complexes</i>	28
<i>Facteurs influençant les interactions protéine / polysaccharide</i>	29
I.3. Biopolymères de l'étude.....	31
I.3.1. Présentation des biopolymères de l'étude.....	31
I.3.1.1. Le caséinate de sodium.....	31
I.3.1.2. Xanthane	32
I.3.2. Etat bibliographique sur les émulsions stabilisées par le caséinate de sodium et / ou xanthane	34
I.3.2.1. Emulsions stabilisées par le caséinate de sodium.....	34
I.3.2.2. Emulsions multiples stabilisées par le caséinate de sodium	39
I.3.2.3. Emulsions multiples stabilisées par des complexes protéines polysaccharides.....	39
I.V. Caractérisation des émulsions multiples	41
Références.....	42

Chapitre II	
Etude de la formation des complexes solubles de caseinate de sodium et de xanthane en solution	55
Résumé.....	56
II.1. Introduction.....	56
II.2. Matériels et méthodes.....	58
II.2.1. Matériels.....	58
II.2.2. Méthodes	58
Préparation des mélanges de NaCN et du XTH.....	58
Propriétés rhéologiques.....	59
Planification expérimentale.....	60
Diffusion dynamique de lumière (DLS)	60
Spectroscopie Infra-rouge FTIR – ATR.....	61
II.3. Résultats et discussion.....	62
II.3.1. Modélisation en surface de réponses.....	62
II.3.2. Effets de C_{NaCN} et de C_{XTH} sur σ_0 à diverses C_{NaCl}	62
II.3.3. Optimisation de la formule.....	65
II.3.4. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	65
II.3.5. Spectres infra-rouges FTIR.....	67
II.4. Conclusion	67
Références	70
Chapitre III	
Optimisation de la formulation des émulsions multiples stabilisées par le complexe soluble caséinate de sodium - xanthane	73
Résumé.....	74
III.1. Introduction.....	74
III.2. Matériels et méthodes.....	75
III.2.1. Matériels.....	75
III.2.2. méthodes	75
a. Préparation de l'émulsion double.....	75
b. Caractérisation.....	76
c. Plan d'expériences.....	77
III.3. Résultats et discussions.....	78
III.3.1. Modélisation mathématique en surface de réponse.....	78
III.3.2. Effet des facteurs de formulation sur la taille des globules huileux (D32)..	79
III.3.3. Stabilité au crémage.....	82
III.3.4. Microstructure des émulsions multiples.....	83
III.3.5. Efficacité d'encapsulation (EE) de l'acide ascorbique dans les émulsions multiples	85
III.4. Conclusion.....	88
Références	89

Chapitre IV	90
Effet du pH sur les propriétés et la stabilité des émulsions multiples stabilisées par le complexe soluble caséinate de sodium – xanthane	
Résumé.....	91
IV.1. Introduction.....	91
IV.2. Matériels et méthodes.....	93
IV.2.1. Matériels.....	93
a. Préparation des émulsions doubles.....	93
b. Caractérisation.....	93
IV.3. Résultats et discussions.....	94
IV.3.1. Observation microscopique.....	94
IV.3.2. Granulométrie des globules huileux.....	98
IV.3.3. Efficacité d'encapsulation.....	98
IV.4. Conclusion.....	100
Références.....	101
Chapitre V	
Evaluation in vitro de l'émulsion multiple comme système de la libération contrôlée de plusieurs substances incompatibles	103
Résumé.....	104
V.1. Introduction.....	104
V.2. Matériels et méthodes	105
V.2.1. Matériels.....	105
V.2.2. Méthodes.....	106
a. Préparation des émulsions multiples.....	106
b. Etude de libération In vitro de l'ascorbate de sodium.....	106
Digestion in vitro de l'émulsion double.....	106
- Simulation de la digestion gastrique.....	106
- Simulation de la digestion intestinale.....	107
c. Détermination de la quantité d'ascorbate de sodium libéré.....	107
Dosage du sélénium réduit	107
V. 3. Résultats et discussion	107
V.4. Conclusion.....	109
Références	110
Conclusion générale	111

Liste des figures

Figure I.1. Représentation schématique des émulsions simples

Figure I.2. Schéma représentatif d'une émulsion multiple

Figure I.3. Principaux mécanismes d'instabilité des émulsions simples

Figure I.4. Représentation de la floculation par pontage (figure de gauche) et de la floculation par déplétion (figure de droite)

Figure I.5: Représentation schématique des mécanismes principaux d'instabilité d'une émulsion multiple de type e/h/E

Figure I.6. Représentation schématique des quelques mécanismes de libération sans rupture de film, dans les émulsions doubles e/h/E.

Figure I.7: représentation schématique du mécanisme d'instabilité d'une émulsion multiple par flux d'eau

Figure I.7 : Illustration schématique de la formation d'une émulsion multiple comme étape transitoire d'une inversion de phase

Figure I.8. Illustration schématique du processus de préparation d'une émulsion multiples par deux étapes

Figure I.9. Axe de l'Ultra-Turax® constitué du rotor et du stator (a), et le principe de dispersion de goutte dans l'Ultra-Turax (b).

Figure I.10. Schéma représentant la préparation d'émulsions multiples par une membrane d'émulsification (image de haut) et par un appareil microfluidique (image de bas)

Figure I.11. Représentation schématique de gouttes stabilisées par un polymère par répulsion stérique (Figure de haut), répulsion électrostatique (figure du milieu) et par déplétion (figure du milieu)

Figure I.12: Représentation schématique des différents modes d'introduction de la protéine et du polysaccharide pour la stabilisation des émulsions (Pr : protéine, Ps : Polysaccharide)

Figure I. 13. Schéma représentatif des différents types d'interactions protéine / polysaccharide dans un milieu aqueux

Figure I.14. Structure primaire du xanthane.

Figure I.15. Représentation schématique des interactions pH-dépendantes entre le Caséinate-Na et la gomme xanthane selon Kobori et al. (2009).

Figure I.16. Images microscopiques des émulsions multiples stabilisées par WPI/pectine (4/0.5), à différentes valeurs de pH, après préparation (images du haut) et après un mois (images du bas), (Lutz et al., 2009).

Figure II.1 : Courbe d'écoulement expérimentale typique ajustée par le modèle de Casson (Essai N°16)

Figure II.2: Contours iso- σ_0 des mélanges en solution, en fonction de la variation simultanée de X_1 (C_{NaCN}) et de X_2 (C_{XTH}). $C_{NaCl} = 1\text{mM}$ et $T=20^\circ\text{C}$

Figure II.3: Contours iso- σ_0 des mélanges en solution, en fonction de la variation simultanée de X_1 (C_{NaCN}) et de X_2 (C_{XTH}). $C_{NaCl} = 40\text{ mM}$ et $T=20^\circ\text{C}$

Figure II.4: Contours iso- σ_0 des mélanges en solution, en fonction de la variation simultanée de X_1 (C_{NaCN}) et de X_2 (C_{XTH}). $C_{NaCl} = 100\text{ mM}$ et $T=20^\circ\text{C}$

Figure II.5 : Distribution granulométrique des solutions diluées au 1/100, de NaCN à 1%, de XTH à 0,5% et du mélange ($C_{NaCN} = 1\%$, $C_{XTH} = 0,5\%$, 100mM NaCl). $T=20^\circ\text{C}$

Figure II.6 : spectres infrarouges de : (A) NaCN, (B) mélange optimal, (C) Xanthan.

Figure II.7 : soustraction du spectre infrarouge du CNNa de celui du complexe (Substract).

Figure III. 1. Contours d'iso-D32 des émulsions multiples juste après fabrication en fonction de la variation simultanée de [NaCN] et [PGPR] à différentes fractions E1/E2

Figure III.2. Histogramme représentatif des diamètres des globules des émulsions multiples à t_0 (juste après fabrication) et après trois mois d'entreposage

Figure III.3. Aspect macroscopiques des émulsions multiples après trois mois d'entreposage à température ambiante

Figure III.4. Photo microscopique de l'émulsion de l'essai n° 16 après la préparation (image du haut) et après trois mois (image du bas).

Figure III.5. Contours iso-EE des émulsions multiples en fonction de [PGPR], [NaCN] à différentes fractions E1/E2

Figure IV. 1- a. Micrographes des émulsions multiples à différents pH des phases aqueuses externes juste après la fabrication (t_0).

Figure IV. 1. b. Micrographes des émulsions multiples à différents pH des phases aqueuses externes après 90 d'entreposage.

Figure IV. 1. c. Micrographes des émulsions multiples finales soumises à différents pH juste après préparation.

Figure IV. 1. d. Micrographes des émulsions multiples finales soumises à différents pH après 90 jours d'entreposage.

Figure IV. 2. Aspect macroscopique de l'émulsion multiple préparée avec le complexe à $\text{pH}=2$

Figure V.1. Profil de libération in vitro de l'ascorbate de sodium de l'émulsion multiple

Liste des tableaux

Tableau II.1 : Matrice d'expériences (niveaux des facteurs associée aux réponses)

Tableau II.2 : principales bandes dans les spectres de XTH, NaCN et du mélange optimal.

Tableau III. 1 : matrice d'expériences associée aux réponses

Tableau IV.1. Distribution de taille des émulsions multiples soumises aux différents pH juste après fabrication et après trois mois d'entreposage

Tableau IV.2. Efficacité d'encapsulation de l'acide ascorbique dans les émulsions multiples juste après préparation, et après 08 jours d'entreposage à température ambiante

Liste des abréviations

Introduction générale

L'apport à doses pharmacologiques des substances nutritives et des oligoéléments, appelé pharmaco-nutrition ou nutrition artificielle, aide à rétablir les équilibres physiologiques perturbés et de corriger voire prévenir les carences. Leur emploi est d'autant plus préconisé chez des personnes vulnérables telles que des patients agressés comme les polytraumatiques, les post-opérés, les brûlés, les septiques...etc. Chez ces sujets, notamment en réanimation, la pharmaco-nutrition apparaît comme une arme thérapeutique à part entière. Il s'agit d'administrer d'une part, des molécules nutritives, communément appelées les macronutriments, qui interviennent essentiellement dans les voies métaboliques, incluant les glucides, les lipides et les protéines, et des micronutriments, essentiellement des immunomodulateurs, d'autre part. Ces derniers sont des substances qui se situent en première ligne de défense contre le stress oxydant, premier responsable de l'altération des fonctions immunitaires dans l'organisme. Parmi ces substances à effet antioxydant, les vitamines A, C, E et certains éléments-traces comme le zinc et le sélénium sont primordiaux et souvent recommandés en associations. Ces substrats sont de natures chimiques et physiques différentes, qui laissent présager des interactions négatives en termes de biodisponibilité, lorsqu'ils sont présents dans le même milieu.

L'administration simultanée de ces molécules dans une préparation entérale, fortement recommandée en réanimation, nécessite des systèmes complexes, voire multi-compartimentés, susceptibles de préserver la bioactivité de tous les nutriments tout en contournant les limites, liées essentiellement à des phénomènes et des réactions d'incompatibilité. En effet, dans une formulation contenant les vitamines A,C,E et le sélénium, les vitamines A et E sont liposolubles tandis que la vitamine C est hydrophile, en outre, le sélénium en présence de vitamine C se réduit en forme élémentaire insoluble et peu biodisponible.

Les émulsions multiples sont des systèmes de délivrance qui agissent comme microréservoirs permettant l'administration de plusieurs types de substances à la fois, grâce à leur structure triphasique. Ce sont des dispersions liquides métastables, de microstructure complexe nécessitant l'emploi d'agents stabilisants, principalement des tensioactifs et des viscosifiants, les protéines et les polysaccharides respectivement apparaissent comme des candidats de choix pour remplir ces rôles.

Le Caseinate de sodium est une protéine de lait à propriétés tensioactive reconnue, et le xanthane est un polysaccharide exo-bactérien à pouvoir viscosifiant puissant, qui s'inscrivent

dans une tendance actuelle bien fondée vers les produits d'issue naturel. Ces derniers, auxquels on attribut souvent des vertus bénéfiques pour la santé, apparaissent en remplacement progressif des substances d'origine synthétique dont la nocivité a été prouvée.

L'incorporation de telles substances (protéines et polysaccharides) dans des émulsions est attrayante bien que problématique en raison de la sensibilité de ces molécules aux conditions environnementales, et de la multitude des comportements qui peuvent avoir lieu, menant soit une amélioration des propriétés technico-fonctionnelles des émulsions ou à leur déstabilisation voire leur destruction. La complexation de la protéine au polysaccharide s'avère souvent une approche efficace afin de contrôler leurs comportements au sein des émulsions.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse portent sur l'élaboration des émulsions multiples et le suivi de leur comportement sous différentes conditions, en exploitant des mixtures de protéine de lait (caséinate de sodium, NaCN) et de polysaccharide (gomme xanthane, XTH). Ainsi, cette thèse s'articule sur :

- 1) d'abord, la détermination des combinaisons (NaCN et XTH) ainsi que les conditions menant à la formation des gels constitués par des complexes solubles, en vue de leur utilisation comme stabilisant des surfaces externes des globules de l'émulsion multiple ;
- 2) puis, l'étude des effets des facteurs de formulation sur la structure des émulsions et leur stabilité, en l'occurrence les tensioactifs constituant l'interface interne, et de mettre en évidence les mécanismes résultant en une déstabilisation ou une altération éventuelles;
- 3) étude de l'impact des différentes conditions environnementales sur la structure et la stabilité physique et chimique des émulsions multiples formulées par le complexe ;
- 4) évaluation in vitro de la cinétique de relargage des substances bioactives piégées, et de l'utilisation de l'émulsion multiple au tant que système potentiel de libération contrôlée, en pharmaco-nutrition pour l'administration simultanée des antioxydants, les vitamines A, C, E et le Sélénium.

Chapitre I

Revue de littérature

I.1. Emulsions multiples

I. 1.1. Définitions

Une émulsion est un système colloïdal constitué de deux phases liquides non miscibles, l'une est dispersée (phase interne) dans l'autre phase continue sous formes de petites gouttelettes. Une des phases est hydrophile (polaire), communément appelée aqueuse, et l'autre est hydrophobe, apolaire (huileuse).

Conventionnellement, on attribue les termes e/h (eau dans l'huile) aux émulsions ayant une phase continue huileuse, et émulsions h/e, pour celles constituées de phases continues aqueuses.

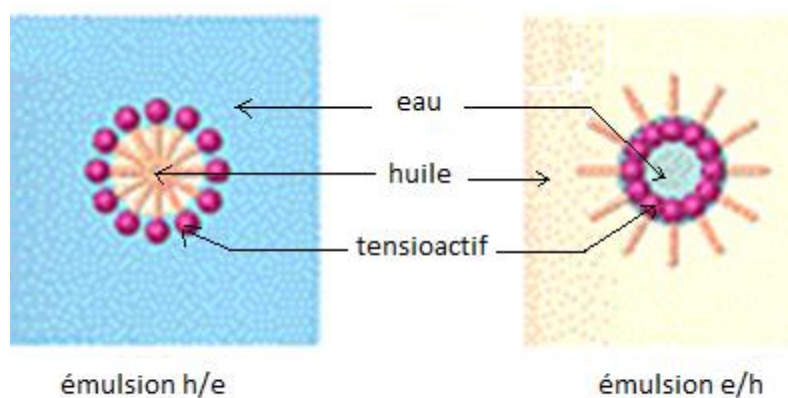
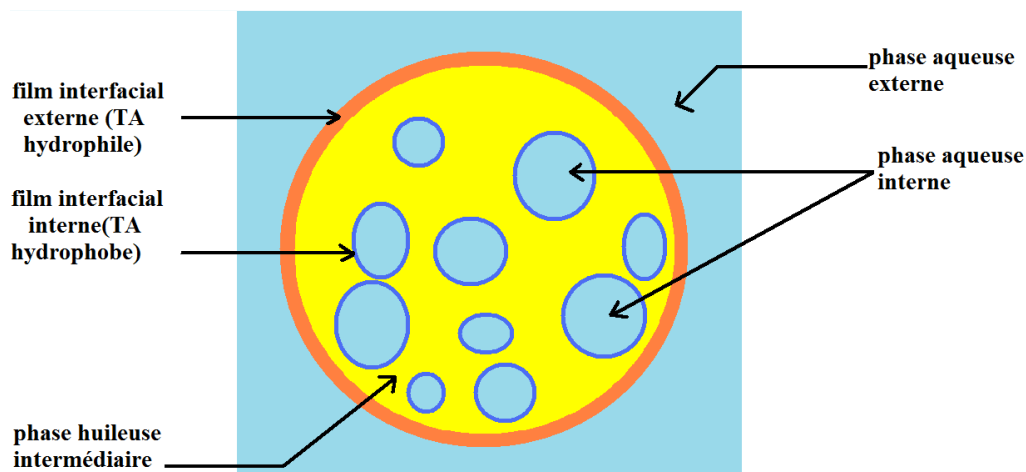


Figure I.1. Représentation schématique des émulsions simples

La différence de polarité et des densités entre les deux phases constitue des émulsions un système métastable. Le maintien de la structure nécessite l'emploi des agents stabilisants, tels que des agents de surface et des viscosifiants. Les agents de surface souvent appelés surfactifs, tensioactifs (TA) ou émulsifiants, sont des substances amphiphiles qui s'adsorbent sur les interfaces et assurent leur intégrité. La tête hydrophile s'immerge dans la phase aqueuse, tandis que la queue hydrophobe se trouve confinée dans la phase apolaire. Les agents viscosifiants, souvent des polymères ayant une grande affinité pour l'eau, occupent la phase continue.

L'émulsion peut être plus complexe, les gouttelettes dispersées peuvent être elles-mêmes des émulsions, contenant une autre phase dispersée sous forme de fines gouttelettes. Ce sont les “**émulsions multiples**” ou “**doubles**” (Aserin, 2007). Trois phases sont donc présentes : deux phases, interne et externe, qui peuvent être hydrophiles séparées par une phase intermédiaire huileuse (cas des émulsions e1/h/e2), ou bien deux phases huileuses séparées par une phase aqueuse (émulsions h1/e/h2). Des agents de surfaces de natures et de polarités différentes doivent être utilisés pour stabiliser les deux interfaces.

Une représentation schématique d'une émulsion double de type e1/h/e2 est montrée dans la figure I.2.



TA : tensioactif

Figure I.2. Schéma représentatif d'une émulsion multiple

Cette structure multi-compartimentée des émulsions multiples, leur offre une propriété très attrayante dans le domaine de la microencapsulation, où elles servent de microréservoirs d'encapsulation et de libération contrôlée des substances piégées dans la phase interne.

I.1. 2. Applications des émulsions multiples

Les émulsions multiples sont des excellents systèmes potentiels pour la libération contrôlée ou retardée des substances actives encapsulées (Desai et al., 2005 ; Jiménez-Colmenero, 2013).

Dans la phase aqueuse interne des émulsions e1/h/e2, des substances hydrosolubles, peuvent être confinées. La phase huileuse intermédiaire et les films interfaciaux composés d'agents émulsifiants et tensioactifs, constituent une "membrane liquide" modulant la libération des substances encapsulées.

De ce fait, les émulsions multiples ont des usages prometteurs en beaucoup de technologies, en particulier dans le domaine pharmaceutique (Ferreira et al., 1994 ; Onuki et al., 2004), cosmétique, alimentaire (Bou et al., 2013 ; Cofrades et al., 2013) et les sciences de séparation. Leurs applications potentielles pharmaceutiques, incluent des utilisations telles que des adjuvants des vaccins (auxiliaires) (Leclercq et al., 2011 ; Aserin, 2007), systèmes de délivrance prolongée des médicaments (Laugelet et al., 1996 ; Laugelet et al., 1998), réservoirs absorbants pour des traitements de surdosage, pour le masquage du goût, l'immobilisation des enzymes et surtout des systèmes de microencapsulation des substances labiles (Benjamin et al., 2012 ; Bou et al., 2014 ; Carlotti et al., 2008 ; Frank et al., 2011 ; Owusu et al., 1992 ; Yoshida et al., 1999 ; Aditya et al., 2015 ; Akhtar et al., 2014)

I.1.3. Instabilité des émulsions multiples

En dépit du nombre croissant des travaux effectués sur les émulsions multiples, rares sont les produits commercialisés sous cette forme. En effet, les émulsions multiples sont des systèmes métastables du point de vue thermodynamique, qui finissent par se détruire, après des intervalles de temps plus ou moins longs, donnant lieu à deux phases séparées macroscopiquement. Ceci est attribué essentiellement à l'énergie libre emmagasinée dans les gouttelettes dispersées. Cette énergie se trouve dépensée par la réduction de leur surface totale. Ceci se produit par plusieurs mécanismes qui seront décrits dans ce qui suit (Garti, 1997).

I.1.3. 1. Mécanismes d'instabilité communs aux émulsions simples

La déstabilisation d'une émulsion peut survenir via des phénomènes uniquement ségrégatifs (i.e. sans altérer les interfaces entre les deux phases) ou via des phénomènes destructeurs (i.e. avec réduction d'interface).

La floculation et le crémage entraînent une répartition non homogène des gouttes de la phase dispersée sans modification des interfaces entre les deux phases. Ce sont des agrégats qui peuvent être redispersés par une simple agitation. La floculation est due principalement à des

interactions attractives entre les gouttelettes dispersées, non compensées par des répulsions, électrostatiques ou stériques. Le crémage quant à lui est dû à la différence de densité entre les deux phases.

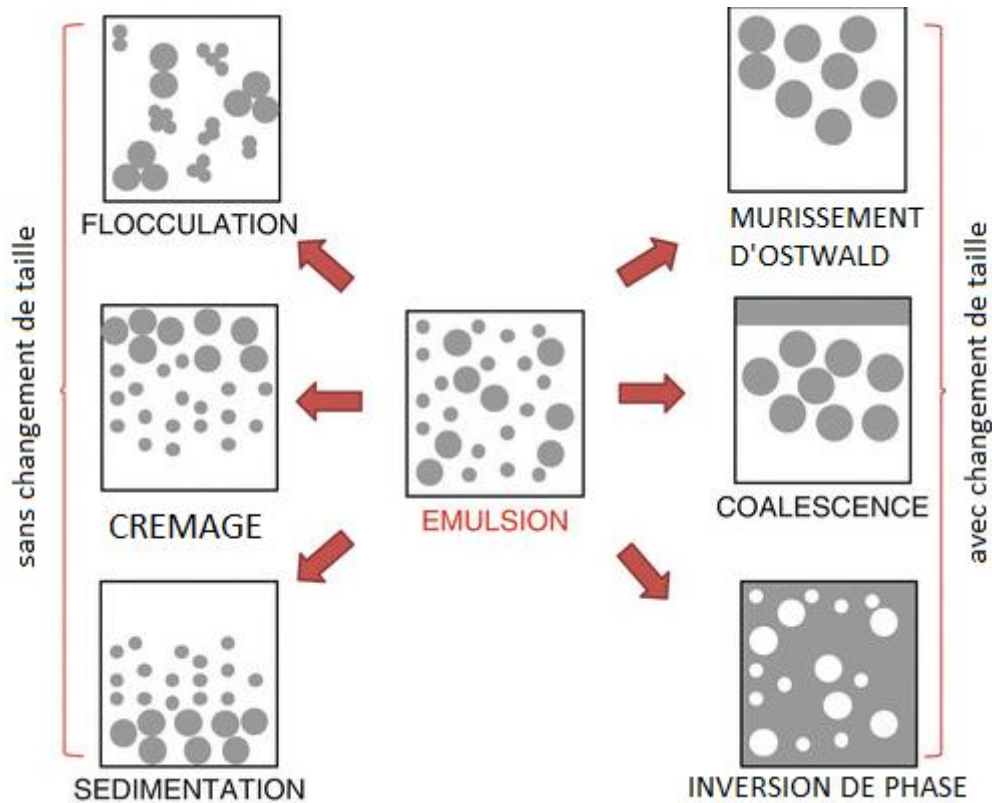


Figure I.3. Principaux mécanismes d'instabilité des émulsions simples

La destruction de l'émulsion est quant à elle attribuée principalement au mécanisme de *coalescence*, traduit par la fusion de plusieurs gouttes pour former d'autres plus grandes. Ainsi, la surface totale des gouttes se trouve diminuée, réduisant l'énergie libre due aux tensions interfaciales. La coalescence conduit à la fin à une destruction complète du système et sa transformation en deux phases non miscibles séparées macroscopiquement.

Le *mûrissement d'Ostwald* peut survenir en cas de solubilité partielle de la phase dispersée dans la phase continue. Il est conditionné par une grande distribution de taille. Il se manifeste par une absorption des petites gouttes par les grandes, suite à des mécanismes de diffusion moléculaire. Ceci résulte en une augmentation de la taille moyenne.

L'*inversion de phase* est un mécanisme d'instabilité conditionné par une forte teneur en phase dispersée et/ou des tensioactifs favorisant cette transformation.

L'emploi des substances polymériques au sein des émulsions est générateur d'autres mécanismes de déstabilisation (Liang et al., 2014 ; Aserin et al., 2007):

- *Floculation par pontage* rencontré pour de faibles teneurs en polymère adsorbant qui, ayant une longue chaîne, s'adsorbe sur plusieurs globules.
- *Floculation par déplétion*(Jang et al., 2004) : quand la concentration du polymère non adsorbé dépasse une certaine valeur critique, il se développe une différence de pression osmotique entre l'espace interstitiel entre globules et la phase continue, et provoque un drainage du liquide à cette zone et donc l'agrégation (Figure I.4).

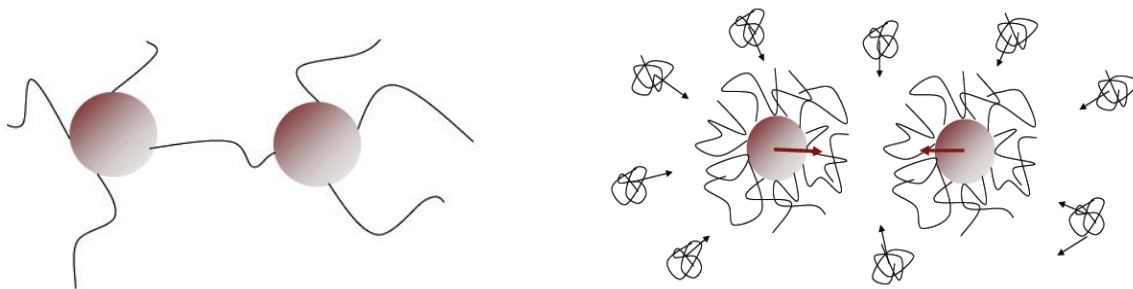


Figure I.4. Représentation de la floculation par pontage (figure de gauche) et de la floculation par déplétion (figure de droite)

I.1. 3. 2. Mécanismes d'instabilité relatifs aux émulsions multiples

Aux mécanismes d'instabilité des émulsions simples, s'ajoute d'autres mécanismes associés à la structure complexe des émulsions multiples, ce qui rend leur intégrité beaucoup plus difficiles à maintenir (Garti et al., 1996). Ceci entraîne à des échelles de temps plus ou moins longues, soit une transformation de l'émulsion multiple en une émulsion simple, soit une destruction complète de l'émulsion en deux phases séparées.

On distingue deux types de mécanismes d'instabilité relatifs aux émulsions multiples :

- *Mécanismes accompagnée de rupture de films*

La rupture de film, qui conduit soit à la transformation de l'émulsion double en émulsion simple, ou à la destruction complète menant à une séparation de phase, est la conséquence de la coalescence qui peut se produire à différents niveaux :

- Les globules huileux peuvent coalescer (cas des émulsions e/h/E) ;
- Les gouttelettes aqueuses internes peuvent également coalescer ;
- Les gouttelettes aqueuses internes peuvent être expulsées dans la phase aqueuse externe (coalescence gouttes / globule);
- L'eau de la phase externe peut pénétrer dans la phase aqueuse interne.

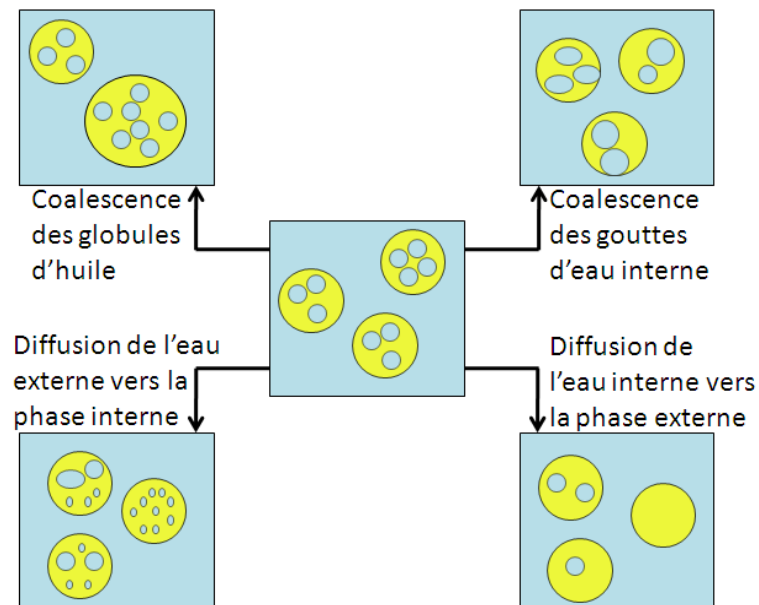


Figure I.5: Représentation schématique des mécanismes principaux d'instabilité d'une émulsion multiple de type e/h/E

- Mécanismes d'instabilités sans rupture de films

La membrane huileuse dans les émulsions multiples (e/h/E), séparant deux compartiments aqueux, est souvent le lieu privilégié de la formation des *micelles inverses* constituées de tensioactifs et refermant des substances hydrophiles, en les transportant d'une phase à l'autre. Ceci est souvent rencontré avec des tensioactifs de faible poids moléculaires et présents en excès. Une solubilité partielle est un autre mécanisme probable de relargage de ses substances, généralement encapsulées dans la phase interne.

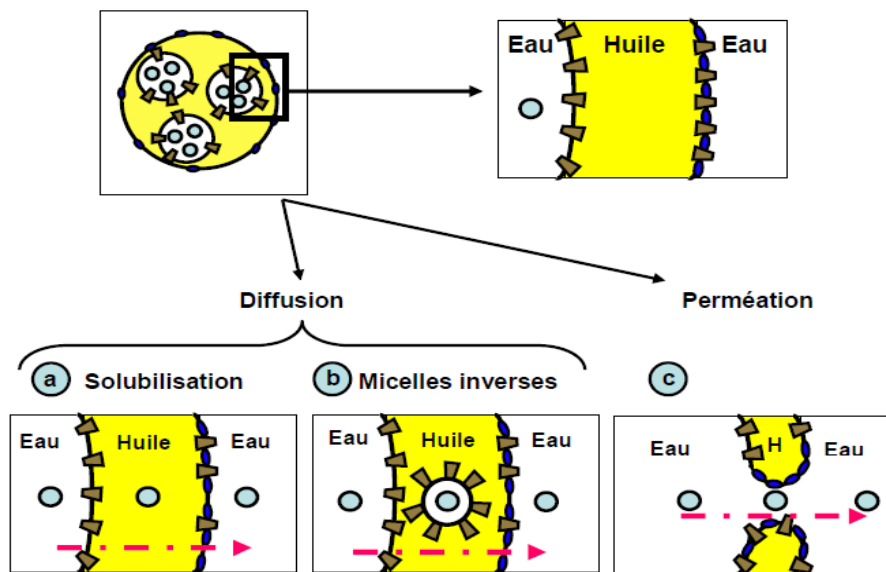


Figure I.6. Représentation schématique des quelques mécanismes de libération sans rupture de film, dans les émulsions doubles e/h/E.

○ représente l'espèce encapsulée, ▲ le tensioactif lipophile et ● le tensioactif hydrophile.

- Flux d'eau par gradient de pression osmotique

La présence de substances dissoutes dans la phase aqueuse interne crée un déséquilibre osmotique par rapport à la phase aqueuse externe, dû à la différence du potentiel chimique engendrée par ces solutés. La compensation de ce gradient osmotique s'accompagne par un flux d'eau de la phase externe vers la phase interne, à travers la membrane huileuse. Ceci provoque le gonflement des gouttelettes et par la suite des globules, et enfin l'amincissement du film intermédiaire et sa rupture, ce qui donne lieu à la libération de substances encapsulées (Cárdenas et al., 2003 ; Wen et al., 2001 ; Yan et al., 2001).

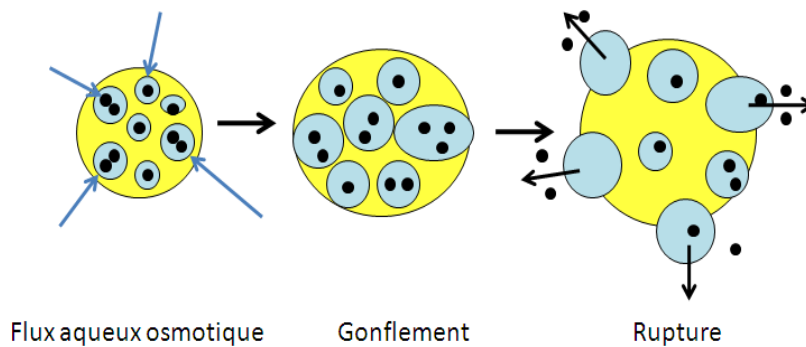


Figure I.7: représentation schématique du mécanisme d'instabilité d'une émulsion multiple par flux d'eau

I. 1.3. 3. Nouvelles approches de stabilisation des émulsions multiples

Plusieurs approches ont été établies afin d'améliorer la stabilité des émulsions multiples. Certaines sont indispensables quel que soit la nature de l'émulsion formulée :

- Stabilisation de l'émulsion interne (primaire) en réduisant la taille des gouttelettes, et/ou par augmentation de la viscosité de la phase aqueuse interne par addition à cette dernière d'agents gélifiants (Delampléet al., 2014 ; Iqbal et al., 2013).
- Utilisation de deux solutés afin d'équilibrer les pressions osmotiques entre la phase aqueuse interne et la phase aqueuse externe, limitant ainsi la migration d'eau.
- Stabilisation des interfaces interne et externe par des macromolécules amphiphiles (tensioactifs polymériques, protéines, polysaccharides...), ayant une diffusion limitée à cause de leur volume très important (Aserin, 2007).
- L'emploi des huiles cristallisables à température ambiante et de surfactifs particuliers colloïdales «pickering emulsions», qui constituent de fortes barrières mécaniques entravant l'échange d'eau (Chevalier et al., 2013 ; Dickinson, 2012 ; Matos et al., 2013 ; Lee et al., 2013).

Le procédé de préparation des émulsions constitue un facteur clé gouvernant leur stabilité, des paramètres tels que le temps d'homogénéisation et le type du matériel utilisé déterminent la qualité de l'émulsion et sa stabilité.

I.1.4. Fabrication des émulsions multiples

I. 1.4. 1. Méthodes de préparation des émulsions multiples

Il existe deux modes principaux de préparation des émulsions multiples :
Émulsification en une seule étape et émulsification en deux étapes.

Méthode de préparation par une seule étape (par inversion de phase)

Le procédé d'émulsification par inversion de phase (Dluska et al., 2009) consiste à préparer une émulsion simple en utilisant des tensioactifs dans les deux phases, puis à inverser cette émulsion par une forte agitation mécanique ou par un traitement à la chaleur.

A un stade intermédiaire, avant d'arriver à l'inversion de phase, l'émulsion multiple se forme, à température et quantités de tensioactifs bien définies.

Le manque de reproductibilité dû à la nature « accidentelle » de ce type de procédés limite son

emploi.

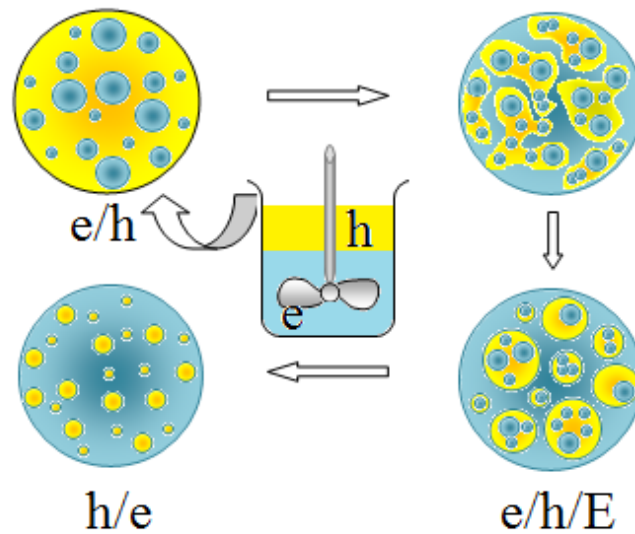


Figure I.7. Illustration schématique de la formation d'une émulsion multiple comme étape transitoire d'une inversion de phase

Méthode de préparation par deux étapes

C'est le procédé le plus couramment utilisé. Il s'agit de préparer une émulsion primaire, en utilisant un tensioactif (primaire) incorporé dans la phase dispersée. Puis de disperser cette émulsion dans une autre phase continue contenant un tensioactif « secondaire ». On obtient à la fin l'émulsion multiple finale.

Le choix du tensioactif se fait selon la règle de Bancroft : si l'émulsion multiple est de type (e/h/E), l'émulsion primaire est une émulsion e/h, le tensioactif doit être plutôt hydrophobe et incorporé dans la phase huileuse, tandis que l'émulsifiant secondaire est hydrophile et introduit dans la phase aqueuse externe. Le type de tensioactifs est inversé dans le cas des émulsions (h/e/H).

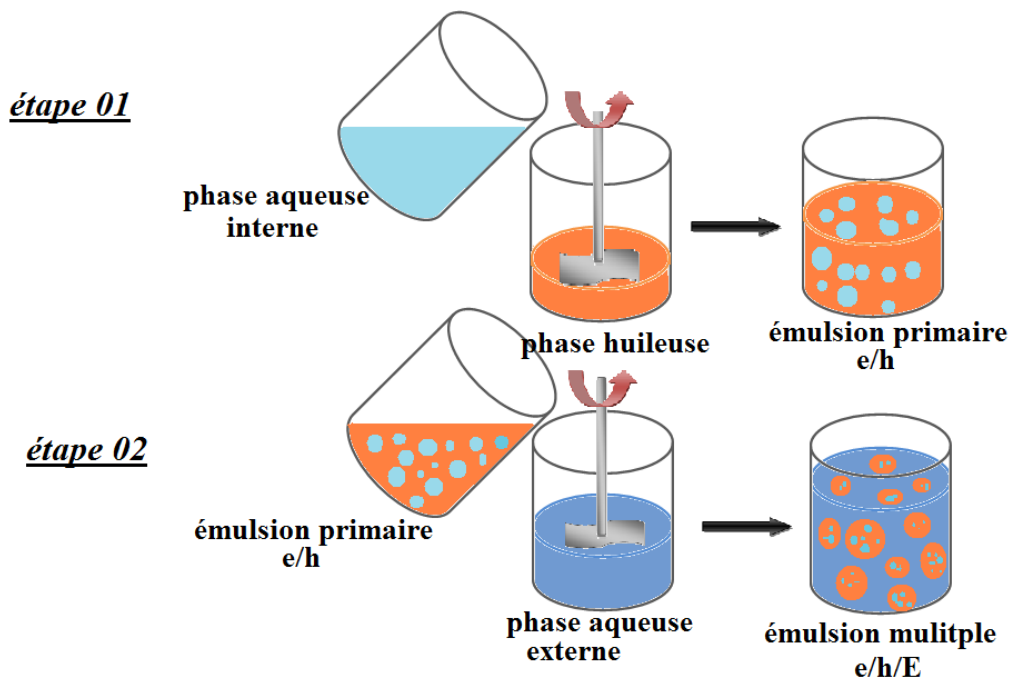


Figure I.8. Illustration schématique du processus de préparation d’une émulsion multiples par deux étapes

Quel que soit la méthode suivie pour la préparation des émulsions multiples, des étapes d’homogénéisation s’avèrent nécessaires afin de garantir leur stabilité. En effet, cette étape est indispensable à différents stades de fabrication, i.e. l’émulsion primaire et l’émulsion finale, et permet non seulement de réduire la taille des gouttelettes mais aussi leurs distributions granulométriques et améliore l’absorption des tensioactifs au sein des interfaces.

I.1.4.2. Procédés de fabrication des émulsions multiples

Plusieurs méthodes d’homogénéisation peuvent être proposées pour fabriquer des émulsions multiples. Les méthodes classiques employant des équipements tels que les homogénéisateurs Ultra-Turax, à hautes pressions ou ultra-soniques sont d’usage facile et très courants. Cependant, la grande dispersion de taille et la réduction d’efficacité d’encapsulation sont deux limitations principales de ces techniques. Des méthodes plus innovantes s’avèrent très efficaces pour pallier à ces problèmes, en utilisant des techniques membranaires (Berendsen et al, 2013, Berendsen et al., 2014) ou micro-fluidiques, mais qui présentent l’inconvénient majeur de la faible rentabilité.

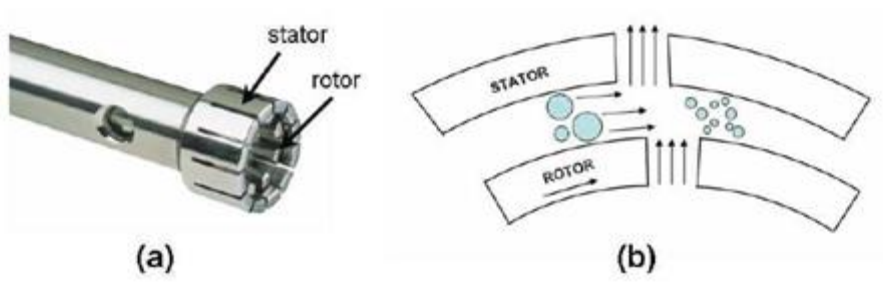


Figure I.9. Axe de l'Ultra-Turax® constitué du rotor et du stator (a), et le principe de dispersion de goutte dans l'Ultra-Turax (b).

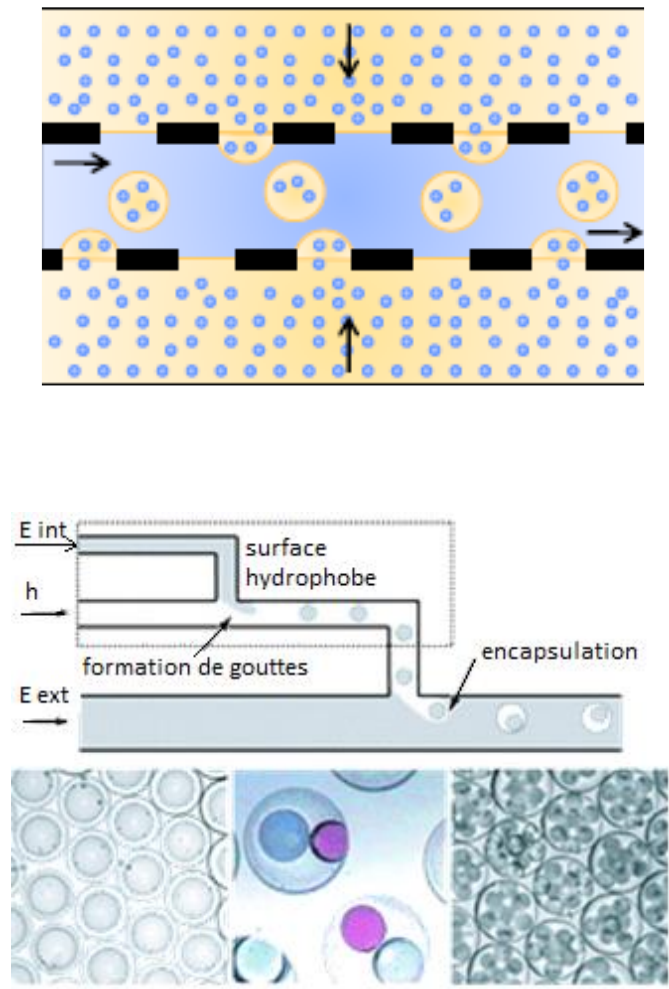


Figure I.10. Schéma représentant la préparation d'émulsions multiples par une membrane d'émulsification (image de haut) et par un appareil microfluidique (image de bas)

I.2. Stabilisation des émulsions multiples par des complexes biopolymériques

L'emploi des tensioactifs monomériques, c.à.d. de faible poids moléculaire, pour la stabilisation des émulsions multiples, est à l'origine de plusieurs mécanismes déstabilisants. En effet, leur faible volume leur permet de migrer d'une interface à l'autre, engendrant un relargage non souhaité des substances encapsulées, ou pire encore une destruction des interfaces. Une alternative qui a été longtemps adoptée est l'utilisation des polymères amphiphiles (macromolécules) qui s'adsorbent irréversiblement aux interfaces et assurent une meilleure stabilité (Hattrem et al., 2014, Dickinson et al., 2009). Le Polysorbate, le Span et les esters d'acides gras sont parmi les tensioactifs polymériques synthétiques les plus utilisés.

Cependant, les exigences de santé imposent beaucoup de restrictions à l'égard de ces substances qui, pas trop bien perçues par les consommateurs, tendent à être progressivement remplacées par des biopolymères (McClements et al., 2016 ; Benichou et al., 2002 ; Dickinson et al., 2001a). Ces derniers, d'origine naturelle, sont avantagés par leurs effets bénéfiques pour la santé mais aussi par leur caractère biodégradable. Parmi ces macromolécules stabilisantes, on distingue les protéines et les polysaccharides, très souvent employés dans le domaine alimentaire, mais qui viennent d'être introduits dans le domaine pharmaceutique. Ces deux types de biopolymères, sous des conditions spécifiques, vont interagir mutuellement en émulsions donnant lieu à diverses fonctions et défis.

I.2.1. Mécanismes de stabilisation des émulsions par les polymères amphiphiles

Différents mécanismes de stabilisation des émulsions sont attribués aux macromolécules amphiphiles, qu'elles soient d'origine synthétique ou naturelle (Aserin et al., 2007) :

La **stabilisation stérique** assurée par les chaînes hydrophobes des molécules du polymère adsorbées aux interfaces ;

La **stabilisation électrostatique** due à la répulsion électrostatique entre deux gouttelettes portant la même charge électrique, quand le polymère adsorbé est de nature ionique ;

La **stabilisation par déplétion** par les macromolécules non adsorbées qui permet de prévenir la collision entre gouttelettes et donne une élasticité au système ;

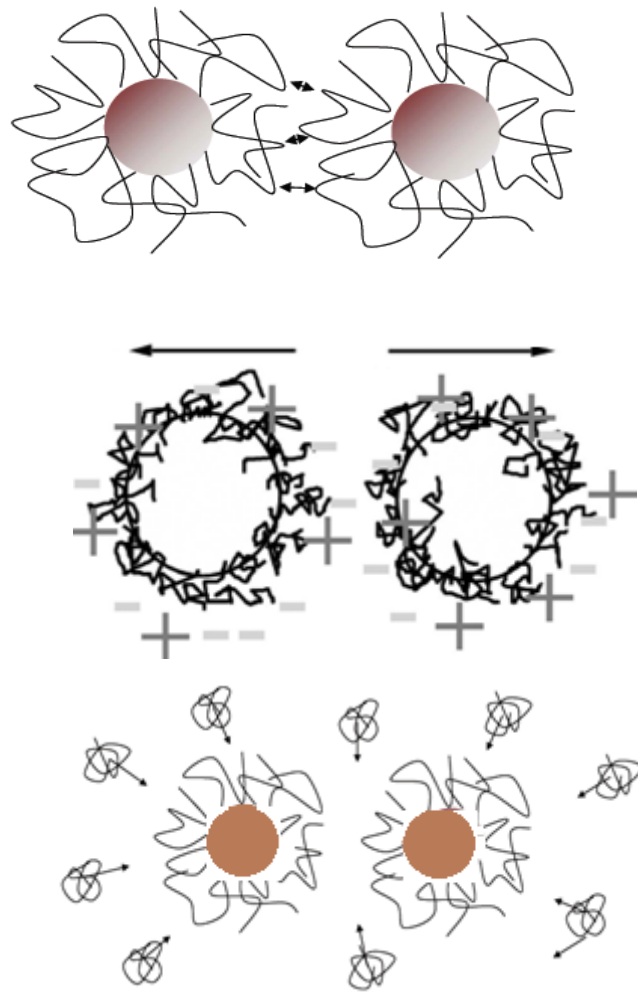


Figure I.11. Représentation schématique de gouttes stabilisées par un polymère par répulsion stérique (Figure de haut), répulsion électrostatique (figure du milieu) et par déplétion (figure du milieu)

I.2.2. Biopolymères comme stabilisants des émulsions multiples (Combinaisons protéine/polysaccharide)

Les agents de surface utilisés pour la stabilisation des émulsions multiples furent de plus en plus remplacés par des agents stabilisants naturels tels que les protéines et les polysaccharides.

Les **protéines** sont des émulsifiants qui s'adsorbent à l'interface h/e et agissent par réduction de la tension interfaciale (Lam et al., 2013 ; Singh et al., 2011). Ce sont des macromolécules

qui attribuent un effet de stabilisation stérique, renforcée par une répulsion électrostatique due à leur ionisation à des conditions de pH favorables.

Les **polysaccharides** sont principalement hydrophiles, possédant plutôt des propriétés viscosifiantes (épaississants). Ils modifient le comportement rhéologique des phases aqueuses où ils sont incorporés, ce qui entrave le mouvement des gouttelettes dispersées et limite leur collision et de ce fait inhibe la déstabilisation.

L'ionisation des protéines est un paramètre clé gouvernant leur comportement aux interfaces. En effet, les protéines, connues par leur caractère amphotère sont très sensibles aux conditions de pH. Leur charge électrique est perdue quand le pH approche le pHi, le point isoélectrique, ou par un effet d'écrantage quand la concentration ionique est élevée. Il en résulte alors une forte floculation conduisant à une perte de stabilité souvent dramatique (Combrinck et al., 2012 ; Neiryneck et al., 2007 ; Surh et al., 2006).

Une des meilleures approches pour améliorer la stabilisation des émulsions par des protéines, aux conditions aqueuses défavorables, est leur combinaison (complexation) aux polysaccharides « polyélectrolytes », tout en évitant leurs interactions négatives (Salminen et al., 2014 ; Zhao et al., 2015 ; Zinoviadou et al., 2012).

I. 2. 2. 1. Techniques de stabilisation des émulsions par un complexe protéine-polysaccharide

Il y a deux manières alternatives de stabilisation des émulsions par un complexe de protéine et polysaccharide, selon le mode d'introduction du polysaccharide (Aserin, 2007).

La première méthode est une méthode séquentielle d'adsorption, appelée méthode « de déposition couche par couche » ou « layer by layer deposition technique », consiste à préparer une émulsion avec la protéine comme surfactif unique, constituant la première couche adsorbée sur l'interface des gouttelettes. La deuxième couche se forme alors après l'interaction avec le polysaccharide incorporé, dans une seconde étape, en phase aqueuse.

La deuxième méthode, qui permet d'éviter les inconvénients associés à la première méthode, en particulier liés à une incompatibilité ou/et une sensibilité aux conditions environnantes, consiste à former d'abord le complexe protéine-polysaccharide en solution aqueuse, puis l'utiliser comme un nouveau agent tensioactif lors de l'étape d'émulsification.

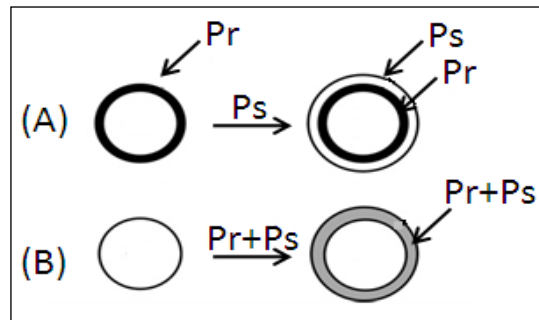


Figure I.12. Représentation schématique des différents modes d'introduction de la protéine et du polysaccharide pour la stabilisation des émulsions (Pr : protéine, Ps : Polysaccharide)

La complexation de ces deux biopolymères permet dans des conditions bien définies d'améliorer leurs propriétés fonctionnelles et de maîtriser leurs interactions au sein des émulsions. Cependant, la détermination des conditions de complexation des protéines aux polysaccharides reste une étape très délicate, à cause de la multitude des comportements et de types d'interactions de ces deux biopolymères quand ils sont en présence concomitante (Carrillo-navas et al., 2012 ; Dickinson et al., 2011b ; Evans et al., 2013 ; Dickinson et al., 2008 ; Dickinson et al., 2013).

I.2. 2. 2. Solutions mixtes protéines-polysaccharides

Plusieurs modèles et théories ont été développés ces dernières années afin de décrire les interactions qui se produisent en mélangeant deux biopolymères en solutions (Cooper et al., 2005 ; Corredig et al., 2011 ; De Kruif et al., 2004 ; Doublier et al., 2000).

Le comportement de ces deux types de biopolymères est gouverné par leurs propriétés intrinsèques mais aussi par les conditions du milieu. Il en résulte alors une diversification de leur propriétés texturales et fonctionnelles en solutions et notamment aux interfaces (Berg et al., 2009 ; Fischer et al., 2013 ; Ghosh et al., 2012 ; Laneuville et al., 2000 ; Li et al., 2012 ; Salminen et al., 2014). Les structures qui peuvent avoir lieu en solutions sont schématisées dans ce qui suit.

- **Co-solubilité**

La co-solubilité, qui correspond à une présence simultanée des biopolymères au sein de la même solution sans interagir, formant un système monophasique et homogène, est un cas

rarement observé, conditionné par de très faibles concentrations en biopolymères, qui par leur grand volume et la variété de leurs groupements fonctionnels, tendent plutôt à s'interagir.

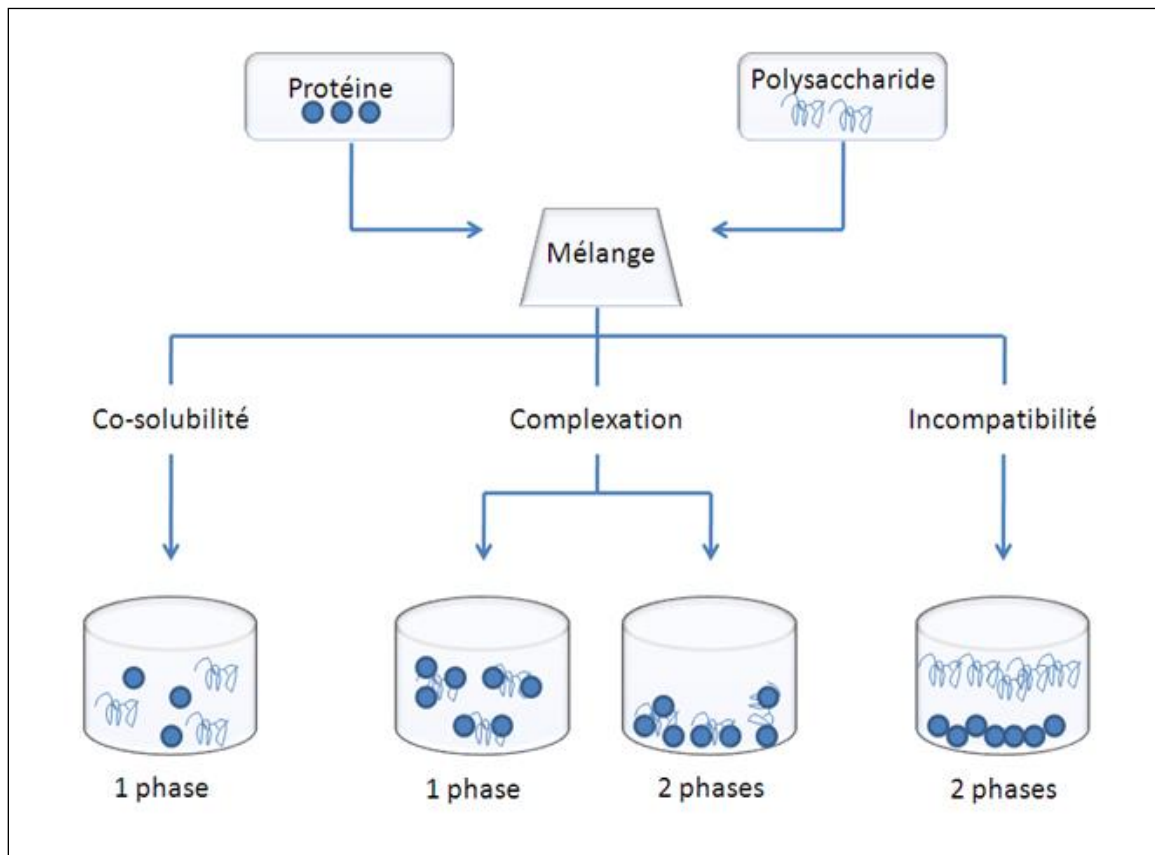


Figure I. 13. Schéma représentatif des différents types d'interactions protéine / polysaccharide dans un milieu aqueux

- **Incompatibilité thermodynamique**

L'incompatibilité thermodynamique est l'état le plus fréquent des mélanges des biopolymères, il se manifeste par une séparation de phase ségrégative, traduite par la présence de deux phases une enrichie en protéine et l'autre en polysaccharide. Ceci est dû principalement à la domination des forces répulsives entre ces deux derniers quand les interactions protéine/protéine ou polysaccharide/polysaccharide sont favorisées au détriment des interactions polymères – solvant. Cet état survient en général aux conditions ioniques défavorables telles qu'un excès d'électrolytes, ou un pH dépassant le point isoélectrique de la protéine (pHi) qui portera alors la même charge électrique que le polysaccharide, ou à des teneurs élevées en biopolymères, notamment la protéine.

▪ **La complexation**

La complexation prend naissance suite aux interactions attractives inter-biopolymères qui mènent à une compatibilité complète entre ces derniers. Il s'agit généralement d'une complexation d'origine électrostatique entre les molécules portant des charges opposées, souvent un polysaccharide anionique et une protéine positivement ionisée au pH au-dessous de son point isoélectrique (Schmitt, C et al., 2011 ; Turgeon et al., 2007 ; Rodriguez Patino et al., 2011 ; Benichou et al., 2007c ; Fioramonti et al., 2014 ; Li et al., 2012 ; Milanović et al., 2014).

Les complexes ainsi formés diffèrent par leurs propriétés, notamment par leur solubilité, un paramètre clé qui détermine beaucoup de leurs fonctions au sein des différents systèmes. Ceci dépend principalement de la nature des molécules, du pH et de la force ionique de la solution.

En fait, on distingue deux types de complexes : les complexes solubles, qui se produisent lorsqu'il y a des charges électriques qui demeurent sur la surface des macromolécules. Ils constituent alors une phase homogène contenant les deux biopolymères en solution. Les complexes insolubles quant à eux se caractérisent par une neutralisation des charges et font référence à une séparation de phase associative, le solvant se trouve exempt de biopolymères qui se précipitent dans la phase inférieure.

Nature des interactions impliquant la formation des complexes

Les mécanismes impliqués dans la formation des complexes protéine/polysaccharide font intervenir plusieurs types d'interactions (Schmitt et al., 2011; Tolstoguzov, 1991) :

- Les ***interactions électrostatiques*** : sont des interactions attractives entre macromolécules portant des charges globales opposées, un polysaccharide anionique et une protéine au pH au-dessous de son point isoélectrique, ou entre deux types de macromolécules portant la même charge nette (au $\text{pH} > \text{pHi}$), mais une charge opposée est portée par des « patches » sur la protéine. Selon le rapport de charges en est en présence de complexes solubles ou insolubles (Schmitt et al., 1998).
- Les ***liaisons hydrogènes*** : contribuent à la formation de complexes au-dessus du pHi de la protéine, se distinguent par leur action à température basse (Tolstoguzov, 1991 ; Schmitt et al., 1998).

- Les *interactions hydrophobes* favorisées par l'augmentation de température, renforcent les complexes suite à une dénaturation thermique par exposition des sites réactifs de la protéine.

Facteurs influençant les interactions protéine (Pr) / polysaccharide (Ps)

- Les interactions au sein des mélanges Pr/Ps sont affectées directement ou indirectement par une multitude des facteurs, certains sont inhérents aux macromolécules (facteurs intrinsèques) et incluent principalement le poids moléculaire, la charge et sa distribution, la conformation et la flexibilité. Les autres facteurs environnementaux sont associés notamment au pH et à la force ionique, au ratio Pr/Ps et leurs concentrations, à la température et à la force de cisaillement. Chaque système mixte répond différemment à ces combinaisons de facteurs.

Facteurs intrinsèques : Sont des facteurs inhérents aux macromolécules et orientent leurs interactions :

- *Charge et densité de charge*

La complexation Pr/Ps est fortement liée aux charges électriques et à la distribution des sites réactifs des deux macromolécules, qui doivent être suffisantes pour engendrer des liaisons inter-polymériques, mais pas trop importantes afin d'éviter une éventuelle gélification ou précipitation.

- *Conformation et poids moléculaires*

Le volume important de certains biopolymères (i.e. à haut poids moléculaire) favorise la séparation de phase ségrégative, induite principalement par des effets stériques et de volume exclu élevé. Cette incompatibilité est d'autant plus prononcée que le polymère est flexible.

Facteurs environnementaux

Qui peuvent être contrôlés lors du processus de préparation des mixtures, et incluent :

- **pH**

Le comportement des solutions mixtes Pr/Ps est principalement gouverné par le pH, étant donné qu'il contrôle le degré d'ionisation des biopolymères et leurs charges nettes, les

facteurs les plus influents de la complexation. Cette dernière requiert un pH situé entre le pHi de la protéine et le pKa du polysaccharide, qui permet l'apparition de charges de signes opposées générant des interactions attractives.

- **Force ionique**

Les molécules de sel en solution agissent par un effet d'écrantage des charges électriques des macromolécules et affectent de ce fait les interactions intra- et inter-polymériques. Elles ont un impact direct sur la conformation des protéines et des polysaccharides, favorisant la complexation à faibles concentrations et l'incompatibilité à des teneurs relativement élevées.

- **Ratio protéine-polysaccharide**

Le ratio Pr/Ps détermine le type d'interaction privilégié (Pr/Pr, Ps/Ps ou Pr/Ps) ainsi que le rapport des charges nettes des biopolymères. Un ratio Pr/Ps élevé favorise l'agrégation des protéines et donc l'incompatibilité thermodynamique. La formation de complexes et leur solubilité sont dictées par des ratios bien définis.

- **Concentration en solides totaux**

La concentration totale en biopolymères commande le comportement des solutions mixtes. Un diagramme de phases peut être établi pour chaque système Pr/Ps, comportant des états de co-solubilité à très faibles teneurs, de complexation puis des séparations de phases en augmentant leurs concentrations.

- **Température**

L'effet de la température sur les mélanges Pr/Ps se manifeste de plusieurs façons : l'augmentation de la température favorise les interactions hydrophobes qui induisent un dépilement de la protéine et l'exposition des sites réactifs, et à faibles températures les liens hydrogènes s'établissent. Ces deux types d'interaction sont avantageux pour la stabilisation des complexes Pr/Ps.

I.3. Biopolymères de l'étude

I.3.1. Présentation des biopolymères de l'étude

Une connaissance approfondie des comportements des protéines et des polysaccharides est indispensable pour deviner leurs comportements au sein des interfaces mais reste une tâche très difficile. L'abondance des données bibliographiques concernant ces substances individuellement est accompagnée d'une méconnaissance de leurs mélanges.

Dans ce qui suit, sera présenté un état bibliographique sur les deux biopolymères dont notre choix s'est porté :

- Le caséinate de sodium qui est la protéine majeure du lait, à laquelle on attribue en plus des qualités nutritionnelles et de biodégradation, son excellente propriété tensioactive (Doxastakis et al., 1986 ; Giroux et al., 2013 ; Huck-Iriart et al., 2011 ; Huck-Iriart et al. 2013 ; Liu et al., 2007 ; Long et al., 2012).
- La gomme xanthane : un polysaccharide très utilisé dans de nombreuses industries notamment l'industrie alimentaire, pétrolière et pharmaceutique pour ces attributs rhéologiques (Vázquez-Solorio et al., 2011).

I.3. 1. 1. Caséinate de sodium

Caséines

Les caséines représentent la protéine majeure du lait. C'est une protéine à caractère acide associée aux unités constituantes principales, les acides glutamique et aspartique. La proline se trouve répartie le long de la chaîne peptidique et confère aux caséines peu de structure et donc une très grande flexibilité. Les caséines possèdent une hydrophobicité moyenne qui leur permet de s'associer facilement pour former des micelles. Elles contiennent du phosphore et se divisent en quatre fractions principales soit α_{s1} , α_{s2} , β et κ . Les caséines ont un poids moléculaire allant de 19005 à 25228 Daltons et leur point isoélectrique est autour de 4,6 (Mulvihill et al., 1987).

Propriétés

Les caséines en solutions aqueuses (et dans le lait) s'associent en micelles, sont très stables à la chaleur, mais en revanche, très sensibles au pH et aux électrolytes.

La surface des micelles est riche en caséine- κ , hydrophiles, qui leur confère de bonnes propriétés d'hydratation qui s'ajoutent à leur aptitude à la fixation aux globules gras du lait. Les groupements glycosylés très polaires situés en surface se perdent par dégradation enzymatique par la chymosine donnant lieu à la coagulation suite à l'augmentation de l'hydrophobicité.

Les caséines à leur état natif sont insolubles dans l'eau. Ceci réduit leur pouvoir émulsifiant à cause de leur diffusivité limitée aux interfaces des globules. Une solution très efficace à ce niveau est le procédé d'alcalinisation des caséines aboutissant à la formation des caséinates, beaucoup plus solubles. Sous cette forme, sans la présence de cations divalents, les monomères de caséine α_{s1} , α_{s2} , β et κ , s'associent en pseudo-micelles volumineuses. Les caséines α_{s1} et β ont une structure très flexible, qui se traduit par des propriétés de surface exceptionnelles, mais qui restent très sensibles au pH et à la présence de sels divalents (Panouille et al., 2004).

Des investigations par diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS) (Nash et al., 2002) ont démontré que les solutions de caséinate de sodium se présentent sous forme de submicelles ayant un rayon hydrodynamique de 8.89 ± 1 nm et des assemblages supra moléculaires de 74 ± 4 nm. Cette taille reste toujours débattue par plusieurs auteurs (Lucey et al., 2000 ; Chu et al., 1995). Une étude réalisée par Hadjsadok et al. (2008) a mis en évidence la présence de la matière lipidique au sein de ces assemblages.

I.3.1.2. Xanthane

Le xanthane est un polysaccharide bactérien utilisé dans plusieurs sphères de fabrication industrielle. En alimentaire ainsi qu'en pharmaceutique, ses nombreuses propriétés en font un ingrédient de choix pour la stabilisation des émulsions, des suspensions et comme agent épaississant (Krstonošić et al., 2009 ; Qiu et al., 2009 ; Zhao et al., 2009). Ses propriétés ainsi que sa solubilité sont garanties à différentes conditions de pH et de température.

Structure

Le xanthane est un exopolysaccharide produit par l'espèce bactérienne *Xanthomonas campestris*. Sa structure primaire est un assemblage de penta-saccharides. La chaîne principale relie en (1→4) des unités de β -D-glucose sur laquelle une chaîne latérale (D-mannose, D-acide glucuronique, D-mannose) apparaît aux deux unités de glucose (Fig. 1.14). Environ la moitié des mannoses terminaux portent des groupements pyruvate alors que les mannoses reliés à la chaîne principale incluent un groupement acétyle. Les chaînes latérales s'alignent près de la chaîne de glucose. La structure secondaire du xanthane est toujours débattue, en l'occurrence les conformations d'hélice simple ou double (Camesano & Wilkinson, 2001).

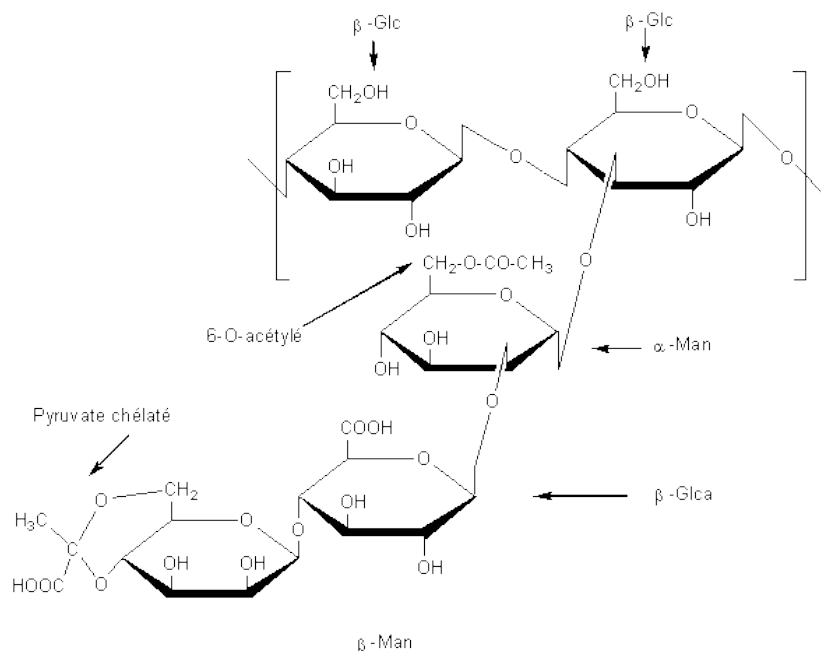


Figure I.14. Structure primaire du xanthane.

Caractéristiques physicochimiques

Le xanthane possède un caractère anionique et un poids moléculaire allant de 2 à 20 x 10⁶ Da. La conformation adoptée par la molécule de xanthane dicte ses propriétés physico-chimiques. La transition que subit sa conformation de la forme d'hélice (ordonnée) à pelote (désordonnée), dépend de la température, de la concentration et de la force ionique (Katzbauer, 1998).

A l'état natif (en absence de traitement thermique ou chimique), le xanthane adopte une conformation d'hélice. Lors du passage à la conformation pelote, la température de transition

dépend de la concentration ionique du milieu. La relation du Rinaudo et al. (1999) a été établie pour le NaCl :

$$T_m^{-1} \text{ (K)} = 2,16 \times 10^{-3} - 0,5 \times 10^{-3} \log C_t$$

Où :

T_m : la température de changement de conformation ;

C_t : la concentration ionique totale de la solution (charge équivalente/litre).

T_m est de l'ordre de 45°C pour une solution concentrée de xanthane (10 g/l, $M_w = 3,6 \cdot 10^6$ g/mol) sans addition de sel c'est-à-dire pour $I = 0,01$ M. Elle vaut 78°C à $I = 0,05$ M.

La concentration de xanthane contribue à la force ionique totale de la solution due à son caractère anionique. Son augmentation accroît la T_m (Lee & Brant, 2002).

La réversibilité de la dénaturation du xanthane reste toujours débattue (Camesano & Wilkinson, 2001).

Caractéristiques rhéologiques

La conformation adoptée par le xanthane en solution affecte ses propriétés rhéologiques. Le xanthane forme des solutions très visqueuses même à faible concentration, mais sa gélification est tributaire de la présence d'autres polysaccharides ou d'ions métalliques (Stokke et al., 1998).

I.3.2. Etat bibliographique sur les émulsions stabilisées par le caséinate de sodium et / ou xanthane

I.3.2.1. Emulsions stabilisées par le caséinate de sodium

Le caséinate de sodium est un ingrédient largement utilisé dans l'agroalimentaire. Les molécules de caséinate s'adsorbent rapidement sur les interfaces huile/eau durant l'émulsification, et assurent la stabilité à long terme aux émulsions grâce à une combinaison des mécanismes de stabilisation stérique et électrostatique.

Plusieurs travaux (Doxastakis et al., 1986 ; Ghorbani Gorji et al., 2015 ; Long et al., 2012 ; Long et al., ; 2013 ; Moschakis et al., 2005 ; Neiryneck et al., 2007 ; Perrechil et al., 2010 ;

Perrechil et al., 2012 ; Zhao et al., 2015 ; Zinoviadou et al., 2012) ont été consacrés à l'étude des comportements et des propriétés des émulsions stabilisées par le caséinate de sodium et les facteurs influençant.

Parmi ces facteurs, on cite : la concentration en protéines, le pH, la force ionique, la présence de polyols, les surfactants monomériques...etc.

Effet de la concentration protéique et du pH

D'après Dickinson et al., (1998), en absence de surfactants, pour des émulsions à fractions volumique et taille des globules données, il existe un intervalle très étroit de concentration en caséinate de sodium pour lequel le système trouve sa stabilité optimale. En effet, des quantités réduites de caséinate de sodium conduisent à une floculation par pontage, en revanche, en présence d'un excès de caséinate de sodium l'émulsion devient instable à cause de la floculation par déplétion. Cependant, il a été rapporté que l'incorporation de quantités modérées d'ions de calcium (5 – 8 mM) peut inhiber ce phénomène.

Un autre facteur important est le pH. La diminution progressive du pH de 7.0 à 5.8 change le comportement des émulsions préparées à base de caséinate de sodium d'un comportement rhéofluidifiant associé à la floculation à un comportement newtonien stable.

Effet du sel

L'effet du sel sur la stabilité des émulsions à base de caséinate de sodium a été largement discuté ces dernières années.

Une étude a été réalisée par Srinivasan et al. (2000) sur des émulsions à base d'huile végétale, l'effet de la concentration du caséinate de sodium et de de NaCl a été investigué. L'impact du NaCl sur les propriétés émulsifiantes du caséinate a été reporté pour des concentrations de [0 – 200 mM]. Les constats suivant ont été établis :

- ***L'addition de NaCl améliore le recouvrement de surface par les protéines***, ceci est dû à l'amélioration de l'absorption des caséinate (notamment la α_{s1} -caséin) :
 - L'association (auto-assemblage) des α_{s1} -caséin s'accroît avec l'augmentation de la force ionique, ce qui augmente leur concentration à la surface et favorise par la suite leur absorption ;

- L'augmentation de la force ionique diminue les forces de répulsion entre les films adsorbés et les molécules qui arrivent en surface, ce qui augmente la vitesse d'absorption et donc la quantité des molécules protéiniques adsorbées aux surfaces des globules ;
 - Le compact entre les molécules de caséinate adsorbées peut être facilité par les fortes forces ioniques.
- ***La présence du NaCl provoque des changements de la composition de surface (absorption sélective) :*** ces changements sont plus marqués pour des concentrations de NaCl inférieures à 40 mM, les paliers s'enregistrent à 200mM.

L'absorption préférentielle des différentes unités constituant le caséinate de sodium (α , β et κ) est tributaire de la quantité totale de caséinate mise en jeu :

- Pour de faibles concentrations (1%), une augmentation d'absorption des α_{s1} -caséin est associée à l'augmentation de la teneur en sel, inversement aux caséins β et κ qui sont peu influencés par la force ionique. Ces résultats sont en accord avec ceux de Dickinson (1998), qui énonce que les émulsions stabilisées par α -caséin sont plus susceptibles à la floculation que celles préparées par du β -caséin, par addition de sel.
- *Pour des taux élevés :* L'ajout de 200 mM du NaCl améliore la stabilité à la floculation par déplétion des émulsions. Ceci peut être attribué à l'amélioration de l'absorption interfaciale des protéines donc à la réduction de la quantité des protéines non adsorbées. La concentration critique requise pour induire la déplétion augmente. En outre, l'ajout de NaCl fait augmenter la taille des protéines non adsorbées ce qui diminue l'attraction de déplétion et stabilise l'émulsion.

Effet du xanthane sur des émulsions stabilisées par le caséinate de sodium

Hemar et al.(2001c) ont étudié l'effet du xanthane sur la taille des globules, la composition des interfaces et la stabilité vis-à-vis du crémage, des émulsions d'huiles de soja stabilisées par le caséinate de sodium à deux niveaux de concentration (1%, concentration requise pour un recouvrement total des interfaces par la protéine ; et 2%, concentration nécessaire pour induire la floculation par déplétion des émulsions).

Ces auteurs ont constaté que le caséinate est le seule responsable de la propriété tensioactive, à l'inverse du xanthane qui ne s'adsorbe pas aux interfaces, à l'exception du cas de fortes teneurs des deux entités simultanément (3% de caséinate et 0.15 - 0.2 % de xanthane), où une présence de xanthane à la surface des globules est observée, probablement à cause des interactions attractives entre les deux biopolymères. En outre, l'émulsion n'est stable qu'à un intervalle étroit de concentrations de xanthane, des faibles concentrations (0.05%) induisent la floculation par pontage, et les plus fortes (>0.2%) provoquent la floculation par déplétion.

Zhao et al. (2009) ont étudié l'effet du xanthane sur les propriétés physiques et texturales des émulsions stabilisées par du caséinate de sodium (à 1 %), ils ont constaté des interactions négatives avec le xanthane pour des teneurs de 0.025 – 0.125%, se traduisant par une augmentation de taille des dispersions et donc par une déstabilisation des émulsions.

Dans l'étude de Ruis (2007), focalisée sur les relations structure– rhéologie des systèmes contenant le caséinate de sodium, il a été démontré l'existence d'une concentration critique de caséinate de sodium, pour laquelle l'émulsion est stable à la floculation grâce à des répulsions stériques et présente un comportement newtonien. Pour des concentrations plus faibles la floculation par pontage et la coalescence prennent lieu, cependant, il a été reporté un comportement rhéofluidifiant associé à la floculation par déplétion, provoquée par des molécules de protéine non adsorbées.

Les interactions caséinate de sodium et xanthane ont fait aussi l'objet d'étude en solutions mixtes, afin de révéler les mécanismes impliqués dans les différents processus de déstabilisation des émulsions (leurs comportements aux interfaces)

Dans ce contexte une étude a été réalisée par M. Rebiha et al.,(2010), basée essentiellement sur une étude rhéologique de ces systèmes. D'après cette étude, les propriétés des mélanges aqueux caséinate de sodium/xanthane, en l'occurrence le module d'élasticité G'_0 qui traduit la rigidité du système, révèlent des interactions négatives entre le caséinate de sodium et le xanthane, s'établissant aux fortes concentrations simultanées de ces deux biopolymères, et

résultent en un relâchement de la structure suite à la séparation de phase ségrégative. En outre, les mesures du potentiel Zéta ont permis de confirmer l'incompatibilité thermodynamique entre ces deux biopolymères au-dessus d'une concentration critique de caséinate de sodium (autour de 3 %).

On ce qui concerne les émulsions, l'analyse de l'évolution des paramètres rhéologiques a permis de discerner l'absorption compétitive de caséinate de sodium et d'un tensioactif de faible poids moléculaire (le Tween 20), qui a conduit à la désorption de caséinate de sodium des surfaces des globules huileux, et par la suite à la floculation par déplétion de ces derniers, ou à une incompatibilité thermodynamique des molécules de caséinate de sodium déplacées avec les molécules de xanthane se trouvant dans la phase aqueuse.

Nash et al., (2002), ont réalisé une étude par DLS des mélanges caséinate de sodium et xanthane en solution aqueuse, à des concentrations de caséinate de sodium de 0.02 à 0.1 %, et de xanthane de 0.02 à 0.15 %, et ils n'ont pas constaté de séparation de phase.

Cependant, la formation de complexes a été évoquée par Kobori et al. (2009), qui ont mis en évidence les structures adoptées par ces complexes aux différentes valeurs de pH. Les concentrations étudiées sont relativement faibles et sont de l'ordre de 1mg/ml pour les deux substances.

A pH neutre (6.6), le caséinate de sodium négativement chargé est faiblement associé au xanthane par des interactions hydrophobes. Le caséinate de sodium se lie aussi au xanthane à pH 4.2 (point isoélectrique) mais, à cause de la perte de charge, ceci se fait par une agrégation site-par-site de caséinate sur le xanthane et des interactions intra-fibres. Le caséinate de sodium est partiellement dénaturé au-dessous de son point isoélectrique (pH 2.7), il devient positivement chargé et s'associe fortement au xanthane par des attractions électrostatiques. La taille du caséinate associé dénaturé est significativement réduite.

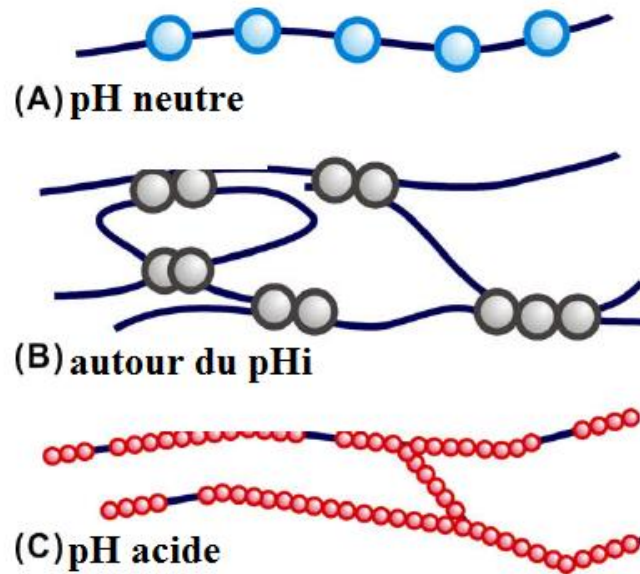


Figure I.15. Représentation schématique des interactions pH-dépendantes entre le Caséinate-Na et la gomme xanthane selon Kobori et al. (2009).

I.3.2.2. Emulsions multiples stabilisées par le caséinate de sodium

Dans une étude de Su et al. (2006), réalisée sur des émulsions multiples d'une huile végétale stabilisées par du caséinate de sodium comme agent surfactant de la phase externe, il a été reporté un effet synergique entre le caséinate de sodium et le PGPR (polyglycérol polyricinoleate, un émulsifiant hydrophobe polymérique) dans la stabilisation des émulsions primaires. Ce qui a permis de réduire la quantité de PGPR pour le même taux d'encapsulation et de stabilité. L'hypothèse qui peut expliquer cet effet est la formation d'une couche élastique absorbée sur la surface des gouttelettes internes.

Des émulsions stabilisées par des conjuguats (complexes formés via des interactions covalentes), de caséinate associé au dextran (Fichner et al., 2009); et au maltodextran (O'regan et al., 2010) ont montré une meilleure stabilité aux hautes températures et au pH acide comparées aux caséinate comme seul émulsifiant secondaire.

I.3.2.3. Emulsions multiples stabilisées par des complexes protéines–polysaccharides

Parmi les premiers travaux portant sur des émulsions multiples stabilisées par des complexes protéine-polysaccharide, ceux réalisés par Benichou et al. (2007b). Ce dernier a réussi à obtenir des émulsions multiples stables pendant 28 jours, basées sur des complexes d'isolats de protéine de lactosérum (WPI) et de xanthane comme émulsifiant de l'interface externe, et il a rapporté une meilleure stabilité du système obtenue à un pH au-dessous du point isoélectrique du mélange, ceci a été attribué aux fortes interactions de nature électrostatique entre les molécules de protéine et de polysaccharide à ce rang de pH.

De même, des complexes chargés pectine modifiée – WPI ont été utilisés pour stabiliser des émulsions multiples (Lutz et al., 2009). Il a été trouvé que les facteurs influençant la formation des complexes sont ceux impliqués dans la stabilité des émulsions. Ainsi, le pH qui définit la taille des complexes formés, est un paramètre déterminant de la stabilité des émulsions formées, et il a été constaté qu'une valeur de pH = 6, permet d'obtenir un complexe soluble qui mis en jeu des sites chargés positivement sur les molécules de protéine et les fractions chargées négativement de la pectine. Ce dernier fournit les émulsions multiples les plus stables avec la plus petite taille des globules (15 μ m) et le meilleur rendement d'encapsulation, pour des concentrations de protéine / pectine de l'ordre 0.5 % / 4 %. Pour les autres valeurs de pH ou pour des concentrations plus faibles de biopolymères, la formation des complexes a été inachevée et la stabilité de l'émulsion très réduite. La figure ci-après montre des images des émulsions obtenues.

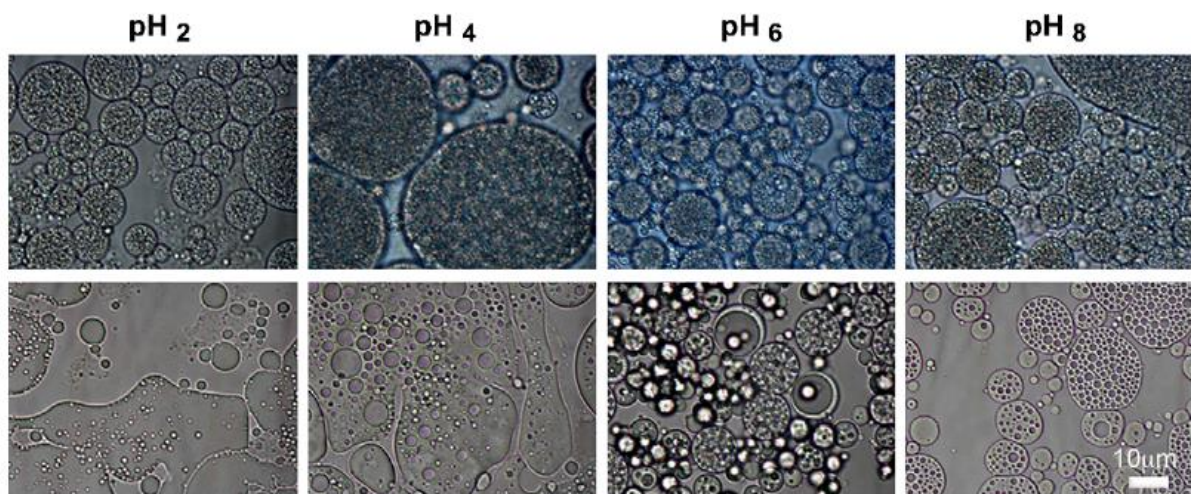


Figure I.16. Images microscopiques des émulsions multiples stabilisées par WPI/pectine (4/0.5), à différentes valeurs de pH, après préparation (images du haut) et après un mois (images du bas), (Lutz et al., 2009).

D'autres travaux ont été réalisés sur des émulsions multiples stabilisées par des complexes électrostatiques (Benichou et al., 2007a ; Esfanjani et al., 2015 ; Hernández-Marín et al., 2013 ; Hernández-Marín et al., 2016 ; Murillo-martínez et al., 2011 ;

I.4. Caractérisation et analyse des émulsions multiples

L'évaluation appropriée de la qualité d'une émulsion multiple exige la caractérisation de ces propriétés physico-chimiques ainsi que leur évolution au cours du temps.

Les propriétés indispensables à connaître des émulsions multiples englobent principalement son type ($e_1/h/e_2$ ou $h_2/e/h_2$), sa microstructure, la taille des dispersions ainsi que leurs propriétés rhéologiques et électrocinétiques. L'efficacité d'encapsulation et la vitesse de libération d'une émulsion multiple constituent les paramètres les plus importants pour une évaluation concrète de son potentiel comme système de délivrance (McClements, 2007).

La détermination de la *distribution de taille* des émulsions multiples, grâce aux techniques microscopiques et de diffusion/diffraction de lumière, permettent de prédire leur stabilité et des mécanismes d'altération potentiels. En effet, une émulsion multiple est d'autant plus stable que la taille des gouttes et sa distribution sont réduites.

Les techniques *microscopiques* permettent non seulement une évaluation qualitative de la structure d'une émulsion, en l'occurrence la taille et sa distribution, mais aussi de décerner certains mécanismes de déstabilisation tels que la coalescence et la floculation.

Les mesures électrocinétiques (potentiel Zéta) fournissent des informations sur la charge des gouttes dispersées, qui détermine les interactions régissant ces systèmes, et permettent d'anticiper un mécanisme déstabilisant par un contrôle des conditions environnantes.

La stabilité physique des émulsions multiples peut être caractérisée par le suivi de l'évolution des paramètres caractéristiques : la taille des gouttes et sa distribution, la microstructure, les paramètres rhéologiques et cinétiques.

Les propriétés cinétiques se traduisent en terme de taux du crémage (ou de sédimentation pour des émulsions inverses), qui résulte du mouvement des gouttelettes au sein de la phase continue conduisant à leur agrégation en haut de l'émulsion, et peuvent par la suite mener à la coalescence et à la rupture de phase.

L'efficacité d'encapsulation est le paramètre le plus important pour décrire les caractéristiques

d'une émulsion multiple. Il traduit sa capacité d'enfermer des substances d'intérêt, pour les délivrer au site d'action et au moment appropriés. Le suivi de l'efficacité d'encapsulation au cours du temps, contribue à la mise en évidence des mécanismes de libération des actifs et permet donc de suivre la stabilité de l'émulsion multiple.

Références

- Aditya, N. P., Aditya, S., Yang, H. J., Kim, H. W., Park, S. O., Lee, J., & Ko, S. (2015). Curcumin and catechin co-loaded water-in-oil-in-water emulsion and its beverage application. *Journal of Functional Foods*, 15. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.013>
- Akhtar, M., Murray, B. S., Afeisume, E. I., & Khew, S. H. (2014). Encapsulation of flavonoid in multiple emulsion using spinning disc reactor technology. *Food Hydrocolloids*, 34. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.12.025>
- Antonov, Y., Lefebvre, J., & Doublier, J. L. (2007). Phase separation in aqueous casein-guar gum systems. *Polymer Bulletin*, 58(4), 723–730. <http://doi.org/10.1007/s00289-006-0700-6>
- Aoki, T., Imamura, T., & Husbandry, A. (2014). Changes of Casein Complex during Storage of Sterilized Skim Milk, (November), 1929–1934. <http://doi.org/10.1080/00021369.1974.10861439>
- Aserin, A., multiple emulsions, technology and applications (2007). Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey
- Garti N. (1997). Progress in Stabilization and Transport Phenomena of Double Emulsions in Food Applications, *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, 30, 222–235.
- Assadpour, E., Maghsoudlou, Y., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Aalami, M. (2016). Optimization of folic acid nano-emulsification and encapsulation by maltodextrin-whey protein double emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.064>
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2002). Protein-Polysaccharide Interactions for Stabilization of Food Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23(1–3), 93–123. <http://doi.org/10.1080/01932690208984192>
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2007a). O/W/O double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide conjugates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 297(1–3), 211–220. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.10.048>
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2007b). W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 294(1–3), 20–32. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.07.056>

- Benichou, A., Aserin, A., Lutz, R., & Garti, N. (2007c). Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity. *Food Hydrocolloids*, 21(3), 379–391. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.04.013>
- Benjamin, O., Silcock, P., Leus, M., & Everett, D. W. (2012). Multilayer emulsions as delivery systems for controlled release of volatile compounds using pH and salt triggers. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 109–118. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.008>
- Berendsen, R., Güell, C., & Ferrando, M. (2015). Spray dried double emulsions containing procyanidin-rich extracts produced by premix membrane emulsification: Effect of interfacial composition. *Food Chemistry*, 178. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.093>
- Berendsen, R., Güell, C., Henry, O., & Ferrando, M. (2014). Premix membrane emulsification to produce oil-in-water emulsions stabilized with various interfacial structures of whey protein and carboxymethyl cellulose. *Food Hydrocolloids*, 38. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.005>
- Berg, L. Van Den, Rosenberg, Y., Boekel, M. A. J. S. Van, Rosenberg, M., & Velde, F. Van De. (2009). Microstructural features of composite whey protein / polysaccharide gels characterized at different length scales. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 1288–1298. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.10.013>
- Bou, R., & Cofrades, S. (2013). Properties of w 1 / o / w 2 emulsions as potential fat replacers in meat products, 59–62. 59th International Congress of Meat Science and Technology, 18-23rd August 2013, Izmir, Turkey
- Bou, R., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2014). Physicochemical properties and riboflavin encapsulation in double emulsions with different lipid sources. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2P1), 621–628. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.044>
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J. L., & Agnely, F. (2012). Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1–2), 359–378. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.052>
- Camesano, T.A., Wilkinson, K.J. (2001). Single molecule study of xanthan conformation using atomic force microscopy. *Biomacromolecules*, 2, 1184-1191.
- Cao, Y., Dickinson, E., & Wedlock, D. J. (1991). Influence of polysaccharides on the creaming of casein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, 5(5), 443–454. [http://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80103-3](http://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80103-3)
- Cárdenas, A., & Castro, E. (2003).breaking of multiple emulsions under osmotic pressure and the effect of w1 / o relation, *Interciencia*, vol. 28, núm. 9, septiembre, 2003, pp. 534-538,28, 534–538.
- Carlotti, M. E., Ugazio, E., Sapino, S., Peira, E., Battaglia, L., & Cavalli, R. (2008).Photodegradation of Caffeic Acid in W/O/W Emulsions in the Absence and in the

Presence of TiO₂. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 29(10), 1435–1444.
<http://doi.org/10.1080/01932690802313527>

Carrillo-navas, H., Cruz-olivares, J., Varela-guerrero, V., Alamilla-beltrán, L., Vernon-carter, E. J., & Pérez-alonso, C. (2012). Rheological properties of a double emulsion nutraceutical system incorporating chia essential oil and ascorbic acid stabilized by carbohydrate polymer – protein blends. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1231–1235.
<http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.005>

Che, M., Grossiord, J., Seiller, Æ. M., (2004). Improved formulation of W / O / W multiple emulsion for insulin encapsulation . Influence of the chemical structure of insulin, 562–568. <http://doi.org/10.1007/s00396-003-0960-8>

Chevalier, Y., & Bolzinger, M. A. (2013). Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 439. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.02.054>

Chu, B., Zhou, Z., Wu, G., & Farrell, H. M. J. (1995). Laser light scattering of model casein solutions: Effects of High Temperature. *Journal of Colloid and Interface Science*.170,102-112.

Cofrades, S., Antoniou, I., Solas, M. T., Herrero, A. M., & Jiménez-colmenero, F. (2013). Preparation and impact of multiple (water-in-oil-in-water) emulsions in meat systems. *Food Chemistry*, 141(1), 338–346. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.097>

Combrinck, J., Otto, A., & Plessis, J. (2014). Whey Protein / Polysaccharide-Stabilized Emulsions : Effect of Polymer Type and pH on Release and Topical Delivery of Salicylic Acid, 15(3), 588–600. <http://doi.org/10.1208/s12249-014-0081-3>

Cooper, C. L., Dubin, P. L., Kayitmazer, A. B., & Turksen, S. (2005). Polyelectrolyte-protein complexes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10(1–2), 52–78.
<http://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.05.007>

Corredig, M., Sharafbafi, N., & Kristo, E. (2011). Polysaccharide-protein interactions in dairy matrices, control and design of structures. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1833–1841.
<http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.05.014>

De Kruif, C. G., Weinbreck, F., & De Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9(5), 340–349. <http://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.006>

Delample, M., Da Silva, F., & Leal-Calderon, F. (2014). Osmotically driven gelation in double emulsions. *Food Hydrocolloids*, 38, 11–19.
<http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.009>

Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). *Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. Drying Technology* (Vol. 23). <http://doi.org/10.1081/DRT-200063478>

Dickinson E., Semenova G.M. Antipova A.S. (1998). Salt stability of caseine emulsions. *Food hydrocolloids*, 12, 2, 227 – 235.

- Dickinson, E. (2008). Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. *Soft Matter*. <http://doi.org/10.1039/b800106e>
- Dickinson, E. (2013). Stabilising emulsion-based colloidal structures with mixed food ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <http://doi.org/10.1002/jsfa.6013>
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1473–1482. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.005>
- Dickinson, E. (2011a). Double Emulsions Stabilized by Food Biopolymers, 1–11. <http://doi.org/10.1007/s11483-010-9188-6>
- Dickinson, E. (2011b). Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1966–1983. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.001>
- Dickinson, E. (2012). Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 224–241. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.017>
- Dluska, E., & Markowska, A. (2009). Process Intensification One-step preparation method of multiple emulsions entrapping reactive agent in the liquid – liquid Couette – Taylor flow, *Chemical Engineering and Processing* 48, 438–445. <http://doi.org/10.1016/j.cep.2008.06.005>
- Doublier, J. L., Garnier, C., Renard, D., & Sanchez, C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(3–4), 202–214. [http://doi.org/10.1016/s1359-0294\(00\)00054-6](http://doi.org/10.1016/s1359-0294(00)00054-6)
- Doxastakis, G., & Sherman, P. (1986). The interaction of sodium caseinate with monoglyceride and diglyceride at the oil-water interface and its effect on interfacial rheological properties. *Colloid & Polymer Science*, 264(3), 254–259. <http://doi.org/10.1007/BF01414962>
- Eila, J., & Anton, M. (2014). Encapsulation of betalain into w / o / w double emulsion and release during in vitro intestinal lipid digestion. *LWT - Food Science and Technology*, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.016>
- Esfanjani, A. F., Jafari, S. M., Assadpoor, E., & Mohammadi, A. (2015). Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 165. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.06.022>
- Evans, M., Ratcliffe, I., & Williams, P. A. (2013). Emulsion stabilisation using polysaccharide – protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 272–282. <http://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.04.004>

- Fechner, A., Knoth, A., Scherze, I., & Muschiolik, G. (2007). Stability and release properties of double-emulsions stabilised by caseinate-dextran conjugates. *Food Hydrocolloids*, 21(5–6), 943–952. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.10.021>
- Ferreira, L. A. M., Seiller, M., & Grossiord, J. L. (1994). Vehicle influence on in vitro release of metronidazole : role of w / o / w multiple emulsion, *Journal of Pharmaceutics*, 109, 251–259.
- Fioramonti, S. A., Perez, A. A., Aríngoli, E. E., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G . (2014). Design and characterization of soluble biopolymer complexes produced by electrostatic self-assembly of a whey protein isolate and sodium alginate. *Food Hydrocolloids*, 35, 129–136. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.05.001>
- Fischer, P. (2013). Rheology of interfacial protein-polysaccharide composites, 81, 73–81. <http://doi.org/10.1140/epjst/e2013-01827-x>
- Frank, K., Kohler, K., Schuchmann, H. P., Köhler, K., & Schuchmann, H. P. (2011). Formulation of labile hydrophilic ingredients in multiple emulsions: influence of the formulation's composition on the emulsion's stability and on the stability of entrapped bioactives. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 32(12), 1753–1758. <http://doi.org/10.1080/01932691.2011.616147>
- Ghorbani Gorji, S., Ghorbani Gorji, E., & Mohammadifar, M. A. (2015). Effect of pH on turbidity, size, viscosity and the shape of sodium caseinate aggregates with light scattering and rheometry. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1820–1824. <http://doi.org/10.1007/s13197-013-1144-2>
- Ghorbani Gorji, S., Ghorbani Gorji, E., Mohammadifar, M. A., & Zargaraan, A. (2014). Complexation of sodium caseinate with gum tragacanth: Effect of various species and rheology of coacervates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 503–511. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.037>
- Ghosh, A. K., & Bandyopadhyay, P. (2012). Polysaccharide-protein interactions and their relevance in food colloids. *The Complex World of Polysaccharides*, 395–408. <http://doi.org/DOI:10.5772/50561>
- Giroux, H. J., Robitaille, G., & Britten, M. (2016). Controlled release of casein-derived peptides in the gastrointestinal environment by encapsulation in water-in-oil-in-water double emulsions. *LWT - Food Science and Technology*, 69. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.050>
- Giroux, H. J., Constantineau, S., Fustier, P., Champagne, C. P., St-gelais, D., Lacroix, M., & Britten, M. (2013). Cheese fortification using water-in-oil-in-water double emulsions as carrier for water soluble nutrients. *International Dairy Journal*, 29(2), 107–114. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.10.009>
- Gülseren, I., & Corredig, M. (2012). Interactions at the interface between hydrophobic and hydrophilic emulsifiers: Polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and milk proteins, studied by drop shape tensiometry. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 193–198. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.03.010>

- Hadjsadok, A., Moulai-mostefa, N., & Rebiha, M. (2010). Rheological Properties and Phase Separation of Xanthan-Sodium Caseinate Mixtures Analyzed by a Response Surface Method. *International Journal of Food Properties*, (919650781). <http://doi.org/10.1080/10942910802532531>
- Hadjsadok, A., Pitkowski, A., Nicolai, T., Benyahia, L., & Moulai-Mostefa, N. (2008). Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1460–1466. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.09.002>
- Hanazawa, T., & Murray, B. S. (2014). The influence of oil droplets on the phase separation of protein e polysaccharide mixtures. *Food Hydrocolloids*, 34, 128–137. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.025>
- Hattrem, M. N., Dille, M. J., Seternes, T., & Draget, K. I. (2014). Macro- vs .micromolecular stabilisation of W / O / W-emulsions. *Food Hydrocolloids*, 37, 77–85. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.024>
- Hemar, Y., Tamehana, M., Munro, P. A., & Singh, H. (2001a). Viscosity, microstructure and phase behavior of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 565–574. [http://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00077-7](http://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00077-7)
- Hemar, Y., Tamehana, M., Munro, P. A., & Singh, H. (2001b). Effect of xanthan on the stability of sodium caseinate oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 55(2), 95.
- Hemar Y. Tamehana. M. Munro P.A. Singh H. (2001c). Influence of xanthan gum on the formation and stability of sodium caseinate oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 15, 4-6, 513-519. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00075-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00075-3)
- Hernández-Marín, N. Y., Lobato-Calleros, C., & Vernon-Carter, E. J. (2013). Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein-polysaccharide soluble complexes. *Journal of Food Engineering*, 119(2), 181–187. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.039>
- Hernández-Marín, N. Y., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2016). Physical properties and release behaviour of caffeine multiple emulsions stabilised by binary or ternary biopolymer soluble complexes under acid, bile and yogurt storage conditions. *Food Hydrocolloids*, 58. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.008>
- Herzi, S., Essafi, W., Bellagha, S., & Leal-Calderon, F. (2014). Influence of the inner droplet fraction on the release rate profiles from multiple W/O/W emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 441. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.09.036>
- Hosseini, S. M. H., Emam-Djomeh, Z., Sabatino, P., & Van der Meeren, P. (2015). Nanocomplexes arising from protein-polysaccharide electrostatic interaction as a promising carrier for nutraceutical compounds. *Food Hydrocolloids*, 50, 16–26. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.006>

- Huck-Iriart, C., Alvarez-Cerimedo, M. S., Candal, R. J., & Herrera, M. L. (2011). Structures and stability of lipid emulsions formulated with sodium caseinate. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 16(5), 412–420. <http://doi.org/10.1016/j.cocis.2011.06.003>
- Huck-Iriart, C., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., Candal, R. J., & Herrera, M. L. (2013). Effect of Aqueous Phase Composition on Stability of Sodium Caseinate/Sunflower oil Emulsions. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2406–2418. <http://doi.org/10.1007/s11947-012-0901-y>
- Iqbal, S., Baloch, M. K., Hameed, G., & McClements, D. J. (2013). Controlling W/O/W multiple emulsion microstructure by osmotic swelling and internal protein gelation. *Food Research International*, 54(2), 1613–1620. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.035>
- Jang, W., Nikolov, A., & Wasan, D. T. (2004). Effect of depletion force on the stability of food emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 25(6), 817–821. <http://doi.org/10.1081/DIS-200035596>
- Jiménez-Colmenero, F. (2013). Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.040>
- Katzbauer B. (1998). Properties and applications of xanthan gum, polymer degradation and stability, 59 (1-3), 81-84
- Kobori, T., Matsumoto, A., & Sugiyama, S. (2009). pH-Dependent interaction between sodium caseinate and xanthan gum. *Carbohydrate Polymers*, 75(4), 719–723. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.008>
- Krstonošić, V., Dokić, L., Dokić, P., & Dapčević, T. (2009). Effects of xanthan gum on physicochemical properties and stability of corn oil-in-water emulsions stabilized by polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2212–2218. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.05.003>
- Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Food Chemistry*, 141(2), 975–984. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.038>
- Laneuville, S. (2000). Effect of preparation conditions on the characteristics of whey protein—xanthan gum complexes. *Food Hydrocolloids*, 14(4), 305–314. [http://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00003-5](http://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00003-5)
- Laugel, C., Baillet, A., Piemi, M. P. Y., Marty, J. P., & Ferrier, D. (1998). Oil – water – oil multiple emulsions for prolonged delivery of hydrocortisone after topical application : comparison with simple emulsions, 160, 109–117.
- Laugel, C., Baillet, A., Seiller, M., & Ferrier, D. (1996). controlled release Moisturizing substances entrapped in W / O / W emulsions : analytical methodology for formulation , stability and release studies, 38, 59–67.

- Leal-calderon, F., Homer, S., Goh, A., & Lundin, L. (2012). W / O / W emulsions with high internal droplet volume fraction. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 30–41. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.09.004>
- Leclercq, S. Y., Dos Santos, R. M. M., MacEdo, L. B., Campos, P. C., Ferreira, T. C., De Almeida, J. G., Fialho, S. L. (2011). Evaluation of water-in-oil-in-water multiple emulsion and microemulsion as potential adjuvants for immunization with rabies antigen. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(5), 378–385. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.05.008>
- Lee, M., Oh, S., Moon, S., & Bae, S. (2001). Preparation of Silica Particles Encapsulating Retinol Using O / W / O Multiple Emulsions, 89, 83–89. <http://doi.org/10.1006/jcis.2001.7699>
- Lee, H.-C., Brant, D.A. (2002). Rheology of concentrated isotropic and anisotropic xanthan solutions : 3. Temperature dependence. *Biomacromolecules*, 3, 742-735.
- Li, X. Y., Li, D., Wang, L. J., Wu, M., & Adhikari, B. (2012). The effect of addition of flaxseed gum on the rheological behavior of mixed flaxseed gum-casein gels. *Carbohydrate Polymers*, 88(4), 1214–1220. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.083>
- Liang, Y., Gillies, G., Patel, H., Matia-merino, L., Ye, A., & Golding, M. (2014). Physical stability, microstructure and rheology of sodium-caseinate- stabilized emulsions as influenced by protein concentration and non- adsorbing polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 36, 245–255. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.006>
- Liu, J., Alexander, M., Verespej, E., & Corredig, M. (2007). Real-time determination of structural changes of sodium caseinate-stabilized emulsions containing pectin using high resolution ultrasonic spectroscopy. *Food Biophysics*, 2(2–3), 67–75. <http://doi.org/10.1007/s11483-007-9032-9>
- Liu, L., Zhao, Q., Liu, T., Long, Z., Kong, J., & Zhao, M. (2012). Sodium caseinate / xanthan gum interactions in aqueous solution : Effect on protein adsorption at the oil – water interface. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 339–346. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.10.007>
- Liu, L., Zhao, Q., Liu, T., & Zhao, M. (2011). Dynamic surface pressure and dilatational viscoelasticity of sodium caseinate / xanthan gum mixtures at the oil e water interface. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 921–927. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.08.023>
- Long, Z., Zhao, Q., Liu, T., Kuang, W., Xu, J., & Zhao, M. (2012). Role and properties of guar gum in sodium caseinate solution and sodium caseinate stabilized emulsion. *Food Research International*, 49(1), 545–552. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.032>
- Long, Z., Zhao, Q., Liu, T., Kuang, W., Xu, J., & Zhao, M. (2013). Influence of xanthan gum on physical characteristics of sodium caseinate solutions and emulsions. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 123–129. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.12.017>

- Lucey JA, Srinivasan M, Singh H, Munro PA. 2000 Characterization of commercial and experimental sodium caseinates by multiangle laser light scattering and size-exclusion chromatography. *J Agric Food Chem.*;48(5),1610-1616.
- Lutz, R., Aserin, A., Wicker, L., & Garti, N. (2009a). Double emulsions stabilized by a charged complex of modified pectin and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72(1), 121–127. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.03.024>
- Lutz, R., Aserin, A., Wicker, L., & Garti, N. (2009b). Release of electrolytes from W/O/W double emulsions stabilized by a soluble complex of modified pectin and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1), 178–185. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.07.014>
- Matos, M., Gutiérrez, G., Coca, J., & Pazos, C. (2014). Preparation of water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsions containing trans-resveratrol. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 442. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.05.065>
- Matos, M., Timgren, A., Dejmek, P., & Rayner, M. (2013). Preparation and encapsulation properties of double Pickering emulsions stabilized by quinoa starch granules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 423. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.01.060>
- McClements, D. J. (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), 611–649. <http://doi.org/10.1080/10408390701289292>
- McClements, D. J., & Gumus, C. E. (2016). Natural emulsifiers ??? Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2016.03.002>
- Milanović, J., Petrović, L., Sovilj, V., & Katona, J. (2014). Complex coacervation in gelatin/sodium caseinate mixtures. *Food Hydrocolloids*, 37, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.016>
- Moschakis, T., Murray, B. S., & Dickinson, E. (2005). Microstructural evolution of viscoelastic emulsions stabilised by sodium caseinate and xanthan gum. *Journal of Colloid and Interface Science*, 284(2), 714–728. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.10.036>
- Moulai-Mostefa, N., Sabri, N., Khalladi, R., & HadjSadok, A. (2014). Investigations of the Effects of Salt and Biopolymer Ratio on Sodium Caseinate-Xanthan Interactions in Aqueous Solution and Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 35(3), 390–396. <http://doi.org/Doi 10.1080/01932691.2013.791833>
- Muguet, V., Seiller, M., Barratt, G., Ozer, O., Marty, J. P., & Grossiord, J. L. (2001). Formulation of shear rate sensitive multiple emulsions. *Journal of Controlled Release*, 70(1–2), 37–49. [http://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00314-X](http://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00314-X)

Muguet, V., Seiller, M., Barratt, G., Clause, D., Marty, J. P., & Grossiord, J. L. (1999). W/O/W Multiple Emulsions Submitted to a Linear Shear Flow: Correlation between Fragmentation and Release. *Journal of Colloid and Interface Science*, 218(1), 335–337. <http://doi.org/10.1006/jcis.1999.6374>

Mulvihill, D., & Donovan, M. (1987). Whey proteins and their thermal denaturation—a review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 11(1)(1), 43–75.

Murillo-Martínez, M. M., Pedroza-Islas, R., Lobato-Calleros, C., Martínez-Ferez, A., & Vernon-Carter, E. J. (2011). Designing W₁/O/W₂ double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 577–585. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.06.015>

Nash, W., Pinder, D., Hemar, Y., & Singh, H. (2002). Dynamic light scattering investigation of sodium caseinate and xanthan mixtures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 30(5), 269–271. [http://doi.org/10.1016/S0141-8130\(02\)00041-7](http://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00041-7)

Neiryck, N., Van lent, K., Dewettinck, K., & Van der Meeren, P. (2007). Influence of pH and biopolymer ratio on sodium caseinate-guar gum interactions in aqueous solutions and in O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, 21(5–6), 862–869. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.10.003>

Oliveira, F. C. De, Coimbra, J. S. D. R., de Oliveira, E. B., Zuñiga, A. D. G., & Rojas, E. E. G. (2014). Food Protein-Polysaccharide Conjugates obtained via the Maillard Reaction: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398(August), 37–41. <http://doi.org/10.1080/10408398.2012.755669>

Onuki, Y., Morishita, M., & Takayama, K. (2004). Formulation optimization of water-in-oil-water multiple emulsion for intestinal insulin delivery. *Journal of Controlled Release*, 97(1), 91–99. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.03.010>

O'Regan, J., & Mulvihill, D. M. (2010). Sodium caseinate-maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability. *Food Research International*, 43(1), 224–231. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.031>

Owusu, R. K., Zhu, Q., & Dickinson, E. (1992). Controlled release of L-tryptophan and Vitamin B2 from model water/oil/water multiple emulsions. *Food Hydrocolloids*, 6(5), 443–453. [http://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80030-1](http://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80030-1)

Panouillé M., Nikolai T., Benyahia L., Durand D. (2004). Aggregation and gelation of casein sub-micelles. Dans food colloids interactions, microstructure and processing, edited by Eric Dickinson, royal society of chemistry, USA.

Paquin, P. (1999). Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides, 9.

Perrechil, F. A., & Cunha, R. L. (2010). Oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate: Influence of pH, high-pressure homogenization and locust bean gum addition.

Journal of Food Engineering, 97(4), 441–448.
<http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.10.041>

Perrechil, F. A., & Cunha, R. L. (2012). Development of multiple emulsions based on the repulsive interaction between sodium caseinate and LBG. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 126–134. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.017>

Piorkowski, D. T., & McClements, D. J. (2014). Beverage emulsions : Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42, 5–41. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.009>

Pitkowski, A., Nicolai, T., & Durand, D. (2009). Stability of caseinate solutions in the presence of calcium. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1164–1168.
<http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.016>

Qiu, C., Zhao, M., & McClements, D. J. (2015). Improving the stability of wheat protein-stabilized emulsions: Effect of pectin and xanthan gum addition. *Food Hydrocolloids*, 43, 377–387. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.06.013>

Radford, S. J., & Dickinson, E. (2004). Depletion flocculation of caseinate-stabilised emulsions: What is the optimum size of the non-adsorbed protein nano-particles? *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 238(1–3), 71–81.
<http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.02.020>

Raynal, S., Grossiord, J. L., Seiller, M., & Clause, D. (1993). A topical W/O/W multiple emulsion containing several active substances: formulation, characterization and study of release. *Journal of Controlled Release*, 26(2), 129–140. [http://doi.org/10.1016/0168-3659\(93\)90112-I](http://doi.org/10.1016/0168-3659(93)90112-I)

Rebiha, M., Moulai-Mostefa, N., & HadjSadok, A. (2012). Investigations of the Effects of Xanthan and Sodium Caseinate on the Formation and Stability of an Oil-in-Water Emulsion Stabilized by a Nonionic Surfactant Using a Response Surface Method. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 33(1–3), 429–436. <http://doi.org/10.1080/01932691.2011.567860>

Rinaudo, M., Milas, M., Bresolin, T. and Ganter, J. (1999), Physical properties of xanthan, galactomannan and their mixtures in aqueous solutions. *Macromol.Symp.*, 140: 115–124.
[doi:10.1002/masy.19991400113](http://doi.org/10.1002/masy.19991400113)

Rodriguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2011). Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1925–1937.
<http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.023>

Ruis H.G.M. (2007). Structure-rheology relations in sodium caseinate containing systems. Phd thesis, wegingem university, the Netherlands 2007. ISBN:978-90-8504-64-6.

Saeidy, S., Keramat, J., & Nasirpour, A. (2014). Microencapsulation of Calcium Using Water-in-Oil-in-Water Double Emulsion Method. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 35(April), 370–379. <http://doi.org/10.1080/01932691.2013.788453>

- Salminen, H., & Weiss, J. (2014). Electrostatic adsorption and stability of whey protein-pectin complexes on emulsion interfaces. *Food Hydrocolloids*, 35, 410–419. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.020>
- Schmitt, C., Sanchez, C., Banon, S. D., & Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 38(8), 689–753. <http://doi.org/10.1080/10408699891274354>
- Schmitt, C., & Turgeon, S. L. (2011). Protein / polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1–2), 63–70. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.001>
- Singh, H. (2011). Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1938–1944. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.022>
- Singh, H., Tamehana, M., Hemar, Y., & Munro, P. A. (2003). Interfacial compositions, microstructures and properties of oil-in-water emulsions formed with mixtures of milk proteins and κ -carrageenan: 1. Sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 539–548. [http://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00026-2](http://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00026-2)
- Srinivasan M. Singh H. Munro P.A. (2000). The effect of sodium chloride on the formation and stability of sodium caseinate emulsions. *Food Hydrocolloids*, 14, 5, 497-507
- Stokke, B.T., Christensen, B.E. & Smidsrød, O. (1998). Macromolecular properties of xanthan. Dans : S. Dumitriu, Polysaccharides : Structural diversity and Functional Versatility (pp.433-472). New York : Marcel Dekker
- Su, J., Flanagan, J., Hemar, Y., & Singh, H. (2006). Synergistic effects of polyglycerol ester of polyricinoleic acid and sodium caseinate on the stabilisation of water-oil-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 20(2–3 SPEC. ISS.), 261–268. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.03.010>
- Surh, J., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2006). Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 607–618. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.07.004>
- Tolstoguzov. 1991. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, 4, 6, 429-468
- Turgeon, S. L., Schmitt, C., & Sanchez, C. (2007). Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12(4–5), 166–178. <http://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.07.007>
- Vázquez-Solorio, S. C., Vega-Méndez, D. D., Sosa-Herrera, M. G., & Martínez-Padilla, L. P. (2011). Rheological properties of emulsions containing milk proteins mixed with xanthan gum. *Procedia Food Science*, 1, 335–339. <http://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.052>

Wen, L., & Papadopoulos, K. D. (2001). Effects of osmotic pressure on water transport in W(1)/O/W(2) emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 235(2), 398–404. <http://doi.org/10.1006/jcis.2000.7384>

Yan, J., & Pal, R. (2001). Osmotic swelling behavior of globules of W/O/W emulsion liquid membranes. *Journal of Membrane Science*, 190(1), 79–91. [http://doi.org/10.1016/S0376-7388\(01\)00424-0](http://doi.org/10.1016/S0376-7388(01)00424-0)

Yoshida, K., Sekine, T., Matsuzaki, F., Yanaki, T., & Yamaguchi, M. (1999). Stability of vitamin A in oil-in-water-in-oil-type multiple emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(2), 1–6. <http://doi.org/10.1007/s11746-999-0212-2>

Zhao, Q., Long, Z., Kong, J., Liu, T., Sun-Waterhouse, D., & Zhao, M. (2015). Sodium caseinate/flaxseed gum interactions at oil-water interface: Effect on protein adsorption and functions in oil-in-water emulsion. *Food Hydrocolloids*, 43, 137–145. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.009>

Zhao, Q., Zhao, M., Yang, B., & Cui, C. (2009). Effect of xanthan gum on the physical properties and textural characteristics of whipped cream. *Food Chemistry*, 116(3), 624–628. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.079>

Zinoviadou, K. G., Scholten, E., Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2012). Properties of emulsions stabilised by sodium caseinate-chitosan complexes. *International Dairy Journal*, 26(1), 94–101. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.01.007>

Chapitre II

Etude de la formation des complexes solubles de caseinate de sodium et de xanthane en solution

Résumé

L'objectif de cette étude était de trouver les conditions optimales de formation de complexes solubles entre la protéine de caséinate de sodium et le xanthane, en solution, en présence du sel sodique et au pH neutre. La variation des concentrations simultanées des deux biopolymères et du sel (NaCl) a démontré que le sel, NaCl, est le facteur le plus influant. Il aggrave l'incompatibilité thermodynamique des deux biopolymères en solution, lorsqu'ils sont présents en excès. En revanche, il contribue à la formation des complexes solubles, lorsque la quantité de NaCN est en-deçà de 5.5%. Dans ce cas, sont obtenus des gels dotés d'excellentes propriétés rhéologiques. La spectroscopie infra-rouge (FTIR) a confirmé la formation de complexes solubles au sein des mixtures homogènes, par le biais des interactions hydrophobes. En revanche la diffusion dynamique de lumière (DLS) a révélé leur nature réversible par leur dissociation suite à des dilutions.

II.1. Introduction

Les biopolymères sont parmi les substances naturelles les plus utilisées en industrie alimentaire, pour leurs propriétés fonctionnelles (Desai et al., 2005; McClements et al., 2009; Piorkowski et al., 2014) (texturant, viscosifiant, émulsionnant, stabilisant, suspendant, etc.). Cette dernière décennie a vu un essor dans l'exploitation de la combinaison des biopolymères, particulièrement entre protéines et polysaccharides (Benichou et al., 2002; Bouyer et al., 2012; Lam et al., 2013), dans le but de conjuguer les effets, pour obtenir de nouvelles textures et surtout pour minimiser le coût, par la substitution partielle des protéines dont le prix est devenu exorbitant. Ces protéines sont spécifiquement utilisées pour stabiliser les émulsions pour leur nature amphiphile. Elles ont l'habileté de s'adsorber aux interfaces, pour réduire la tension interfaciale et offrir une résistance suffisante permettant de prolonger la durée de vie des émulsions (Singh et al., 2011; Lam et al., 2013). Les polysaccharides contribuent à la stabilisation des émulsions, par amélioration des propriétés rhéologiques des phases continues, essentiellement par l'augmentation de la viscosité (Piorkowski et al., 2014; Bouyer et al., 2012).

L'utilisation de ces deux entités simultanément au sein des émulsions conduit à un effet synergique de stabilisation, mais peut générer des mécanismes qui ne sont pas souhaités, de déstabilisation, tels que la floculation par pontage ou par déplétion (Surh et al., 2006).

Pour remédier à ces phénomènes de déstabilisation, la complexation de ces deux types de macromolécules avant leur introduction aux émulsions, apparaît comme approche intéressante pour améliorer leurs propriétés fonctionnelles (Dickinson, 2011; Rodríguez Patino et al., 2011).

Les complexes formés de protéines et de polysaccharides sont largement traités dans la littérature (Schmidt et al., 1998, Turegon et al., 2007; Doublier et al., 2000; Evans et al., 2013), ceux-ci résultent des interactions associatives entre ces deux entités, et incluent principalement les conjuguats formés par des liaisons covalentes (Oliveira et al., 2014), ou des complexes électrostatiques formés généralement par deux macromolécules ayant des charges opposées (DeKruif et al., 2004). Les complexes peuvent être insolubles dans l'eau pour former des précipités ou coacervats, ou solubles en une seule phase liquide (Fioramonti et al., 2014; Schmitt et al., 2011). La complexation apparaît sous des conditions spécifiques de pH, force ionique, ratio protéine / polysaccharide, etc..... cependant, le cas le plus fréquemment rencontré est celui de l'incompatibilité thermodynamique menant à une séparation de phase ségrégative des biopolymères dans des phases distinctes (Rodriguez Patino et al., 2011; Schmitt et al., 2011).

Le choix de notre étude s'est porté sur le caséinate de sodium, NaCN, et le xanthane, XTH.

Le caseinate de sodium est une protéine dérivée du lait, connue pour ses propriétés émulsifiantes exceptionnelles et par sa flexibilité très notable, et très largement utilisée pour stabiliser les émulsions alimentaires (Huck-Iriart et al., 2011). Cependant, cette protéine est très sensible aux conditions de pH acide (Takeuchi et al., 2008), et à la présence de certaines substances telles que les sels, (NaCl, CaCl₂,...) (Pitkowski et al., 2009), les sucres (Belyakova et al. 2003) et les polysaccharides (Ghorbani Gorji et al., 2014 ; Sosa-Herrera et al., 2008).

La gomme xanthane est un polysaccharide largement utilisée dans les formulations alimentaires et pharmaceutiques, il est doué d'un comportement rhéologique intéressant qui lui attribue des propriétés importantes de texturation et de stabilisation.

Plusieurs chercheurs ont étudié les mélanges de NaCN et de XTH en solution et en émulsion, et différents types d'interactions ont été identifiés. Hemar et al., (2001) ont rapporté une

séparation de phase microscopique dans des systèmes aqueux contenant le caseinate de sodium et la gomme xanthane jusqu'à une concentration de 1% de cette dernière. Ces auteurs ont attribué cette incompatibilité thermodynamique aux interactions de répulsion entre les deux biopolymères chargés négativement à pH neutre.

Par approche rhéologique, Moulai Mostefa et al. (2014) et Hadjsadok et al. (2010) ont étudié les interactions entre les deux substances en milieu aqueux et en émulsion et les ont associées à des mécanismes associatifs ou ségrégatifs.

Kobori et al. (2009) ont étudié des mélanges caseinate de sodium–xanthane à différentes valeurs de pH et en absence de sel, et ont rapporté des interactions hydrophobes entre le caséinate de sodium et le xanthane à pH neutre, qui sont faiblement attractives à cause de la répulsion électrostatique entre ces polymères.

L'objectif de ce travail est d'établir les conditions optimales, par la méthode des plans d'expériences, qui permettent d'obtenir, en fonction de la quantité du sel, de complexes solubles entre NaCN et XTH. Des analyses rhéologiques sont entreprises, afin de déterminer l'impact de ces nano-objets sur la texture des mélanges. Des investigations par diffusion dynamique de lumière (DLS) est effectuée pour quantifier la taille et la polydispersité des complexes. Enfin, une exploration par spectroscopie infra-rouge (FTIR) est réalisée dans le but est de déterminer la nature, hydrophobe ou électrostatique, des interactions entre les deux substances polymériques.

II.2. Matériels et méthodes

II.2.1. Matériels

La protéine de Caseinate de Sodium a été obtenue gracieusement par ARMOR Protein, France. La gomme Xanthane a été fournie par Orkila, Algérie. Tous les autres réactifs sont de grade analytique et ont été fournis par Sigma Chemical Co., (Germany). L'eau utilisée dans toutes les expériences est doublement distillée et désionisée.

II.2.2. Méthodes

Préparation des mélanges de NaCN et du XTH

Les solutions mères de XTH (5%, w/w) et de NaCN (20 %, w/w) ont été préparées par dispersion des quantités correspondantes dans l'eau désionisée, à température ambiante, pendant 3 h. L'azoture de sodium (0.03%) a été ajouté à chacune des solutions afin d'éviter la

contamination microbienne. Les solutions mères ont été laissées au repos pendant 24 h pour assurer la dissolution.

Les mixtures NaCN-XTH en solution ont été obtenues par l'association, sous une agitation pendant 30 min, des quantités appropriées des solutions mères de NaCN et de XTH, en présence de NaCl. Le pH est ajusté à 7 par utilisation d'une solution de NaOH à 0,1M ou d'une solution de HCl à 0.1 M.

Propriétés rhéologiques

L'évaluation des propriétés rhéologiques a été réalisée en utilisant un rhéomètre Paar Physica Rheolab MC1 (Germany), associé au logiciel US200 software pour le contrôle et l'analyse des données. Les courbes d'écoulement ont été obtenues par mesure de la contrainte de cisaillement en faisant varier la vitesse de cisaillement de 1 à 1000 s⁻¹ à 20 °C. Ces courbes, exprimées en terme de $\sigma = f(\dot{\gamma})$, ont l'allure caractéristique d'un fluide non-newtonien à comportement rhéofluidifiant. Le modèle de Casson, d'écriture, $\sigma^{1/2} = \sigma_0^{1/2} + (\eta_c \dot{\gamma})^{1/2}$, permet de les ajuster, avec un coefficient de détermination, R², proche de 1 et cela pour l'ensemble des essais. Ses paramètres caractéristiques sont la contrainte seuil, σ_0 , et la viscosité limite de Casson, η_c . La figure II.1 montre un rhéogramme expérimental typique de ce comportement ajusté par la loi de Casson.

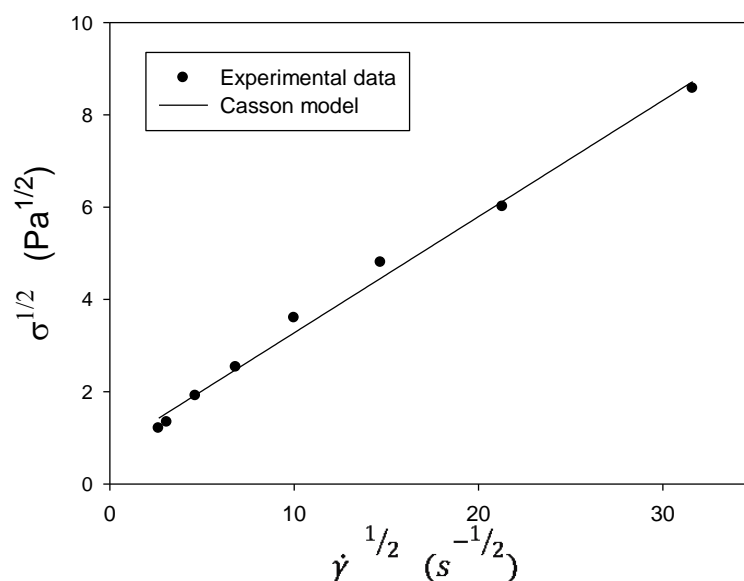


Figure II.1 : Courbe d'écoulement expérimentale typique ajustée par le modèle de Casson (Essai N°16)

Planification expérimentale

Afin d'étudier l'effet de la concentration de NaCN, C_{NaCN} , de XTH, C_{XTH} , et du sel, C_{NaCl} , sur le comportement rhéologique des mélanges en solution, la méthodologie de la modélisation en surface de réponses (RSM) a été appliquée. Il s'agit d'une étude fine de modélisation qui s'appuie sur un modèle polynomial du second ordre. Le plan d'expériences utilisé est un Composite à Face Centré, CCF, contenant 17 essais, dont trois au centre du plan, pour la répétabilité. Les variables centrées réduites du plan sont X_1, X_2, X_3 , qui sont comprises entre -1 et +1 et sont associées respectivement à C_{NaCN} : [1% – 12%, w/w], à C_{XTH} : [0% – 0.5%, w/w] et à C_{NaCl} : [1mM – 100 mM].

La réponse principale retenue, représentant les propriétés rhéologiques des mélanges en solution, est la contrainte seuil, σ_0 , du modèle de Casson. L'autre paramètre caractéristique, à savoir la viscosité limite de Casson, η_c , n'a pas été retenue, du fait de la mauvaise qualité de son fit obtenu suite à l'application de la RSM. Le tableau (II.1) représente la matrice d'expériences des essais réalisés assorti des valeurs de σ_0 .

Diffusion dynamique de lumière (DLS) :

La distribution de taille des dispersions de NaCN, de XTH et des complexes est mesurée par DLS avec un Zetasizer (Nano-ZS, malvern instruments, Worcestershire, UK). La mesure est exprimée en terme de rayon hydrodynamique apparent, R_h (nm), associé à un angle de diffusion $\theta = 90^\circ$. Le faisceau laser est polarisé verticalement, à une longueur d'onde λ de 532 nm. La fonction d'autocorrélation d'intensité du courant électrique, $g_I(t)$, est alors mesurée, à $\theta = 90^\circ$ qui permet d'accéder à la valeur du temps de relaxation (τ) par l'équation : $g_I(t) = e^{-\frac{t}{\tau}}$. Le coefficient de diffusion, D , est alors déduit par la relation : $D = 1/(\tau q^2)$ avec $q = 2.22 \cdot 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ pour $\theta = 90^\circ$. Finalement, la valeur du rayon hydrodynamique R_h est alors obtenue par utilisation de la relation de Stokes-Einstein : $D = KT/(6\pi\eta R_h)$. K est la constante de Boltzman et η est la viscosité de la phase dispersante qui représente la viscosité de l'eau à 20°C. A noter que toutes les solutions soumises à l'analyse de la DLS ont été diluées au 1/100, afin d'éliminer leur turbidité qui peut constituer un artefact pour la mesure.

Tableau II.1 : Matrice d'expériences (niveaux des facteurs associée aux réponses)

N°	C_{NaCN} (%)	C_{XTH} (%)	C_{NaCl} (%)	Contrainte seuil (σ_0, Pa)
1	1	0	1	0,278
2	12	0	1	0,736
3	1	0,5	1	0,315
4	12	0,5	1	0,029
5	1	0	100	0,609
6	12	0	100	0,455
7	1	0,5	100	3,426
8	12	0,5	100	0,241
9	1	0,25	50,5	1,224
10	12	0,25	50,5	0,308
11	6,5	0	50,5	0,341
12	6,5	0,5	50,5	1,904
13	6,5	0,25	1	0,564
14	6,5	0,25	100	0,207
15	6,5	0,25	50,5	0,645
16	6,5	0,25	50,5	0,503
17	6,5	0,25	50,5	0,675

Spectroscopie Infra-rouge FTIR - ATR

Les spectres FTIR de NaCN, de XTH, et des mélanges lyophilisés sont réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR Perkin Elmer. Les spectres à réflectance atténuée ATR sont données pour 400 – 4000 cm⁻¹.

II.3. Résultats et discussion

II.3.1. Modélisation en surface de réponses :

Les coefficients du modèle polynomial quadratique exprimant la surface de réponse σ_0 en fonction des trois variables centrée réduite, ont été calculés par utilisation de la méthode des moindres carrés partielles. La qualité de la régression, traduite par le coefficient de détermination R^2 , a été évaluée à 85%. Ainsi, on obtient:

$$\sigma_0 = 0,72 - 0,33 X_1 + 0,29 X_2 + 0,25 X_3 + 0,24 X_2^2 - 0,23 X_3^2 - 0,32 X_1 X_2 - 0,29 X_1 X_3 + 0,27 X_2 X_3$$

II.3.2. Effets de C_{NaCN} et de C_{XTH} sur σ_0 à diverses C_{NaCl} .

- Cas où $C_{NaCl} = 1mM$

La figure II.2 montre l'évolution des contours iso- σ_0 , en fonction de la variation simultanée de la concentration des deux biopolymères, associée à une quantité de sel de 1mM. On peut constater la présence de deux principaux gradients expliquant la variation de σ_0 . Le premier (couleur rouge), orienté vers le haut dans le sens positif de σ_0 , suggère que si on utilise des quantités modérées de NaCN, alors le xanthane peut avoir la fonction d'un agent texturant, du fait qu'il est quasiment responsable de la croissance de la contrainte seuil. Dans cette zone, les deux biopolymères développent des interactions synergiques en renforçant la structure des mixtures. Kobori et al.(2009) ont travaillé sur un mélange en solution au pH neutre contenant une faible concentration de caséinate de sodium, 0,1%, et 0,1% de XTH. Ces auteurs n'ont pas observé de séparation de phase et ont expliqué le renforcement de la structure, par des interactions d'hydrophobie associatives entre les deux espèces.

Le deuxième gradient (couleur bleue), orienté vers le haut dans le sens négatif de σ_0 , dévoile le risque de mise en jeu des concentrations en excès de la protéine qui ne permet au xanthane de texturer le système. Bien au contraire, σ_0 chutera par rajout de la moindre quantité de ce polysaccharide et peut même conduire à une séparation de phase. Cette situation a été déjà observée, dans le cas où le sel est quasiment absent, par Moulai Mostefa et al. (2014), HadjSadok et al.(2010) et Hemar et al. (2001). Hemar et al. (2001) ont attribué la séparation de phase observée par microscopie, à un mécanisme d'incompatibilité thermodynamique entre les macromolécules de NaCN et de XTH.

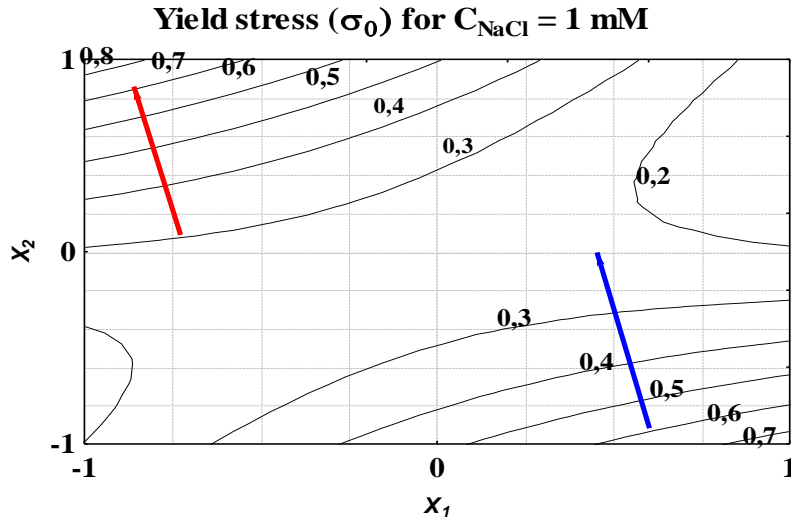


Figure II.2: Contours iso- σ_0 des mélanges en solution, en fonction de la variation simultanée de X_1 (C_{NaCN}) et de X_2 (C_{XTH}). $C_{NaCl} = 1\text{mM}$ et $T=20^\circ\text{C}$

- *Cas où $C_{NaCl} = 40\text{ mM}$*

La figure II.3 illustre l'évolution des contours iso- σ_0 , lorsque la quantité du sel est augmentée à 40mM. On peut constater la persistance du premier gradient (couleur rouge) qui reste quasiment orienté vers le haut, dans le sens positif de σ_0 et de C_{XTH} . On peut remarquer que cette zone est plus étendue, incluant des concentrations plus faibles en xanthane aux alentours de 0,18 % . Aussi, les valeurs de σ_0 , oscillant entre 0,8 Pa à 1,6 Pa, sont plus élevées par rapport au cas de 1mM de NaCl qui varient de 0,3 Pa à 0,8 Pa. Ce qui met en exergue l'effet significatif du sel sur le rehaussement des interactions attractives entre les deux biopolymères. Hadjsadok et al. (2008) ont montré, par DLS, qu'en absence de sel, les monomères de caséinate de sodium, ont une taille de 3 nm. Lorsque la quantité de sel est augmentée à 40 mM, ces monomères s'associent pour former des submicelles d'environ 7 nm. Ceci peut expliquer l'élévation des valeurs de σ_0 , par le fait que le xanthane s'associe avec des agrégats de NaCN.

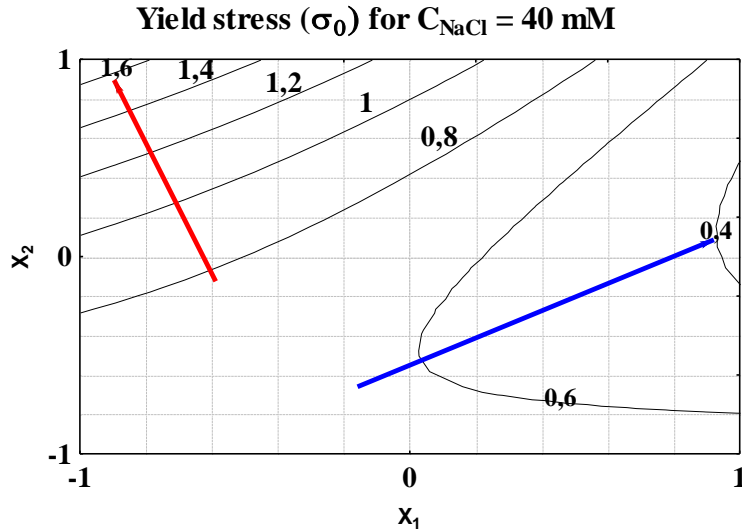


Figure II.3: Contours iso- σ_0 des mélanges en solution, en fonction de la variation simultanée de X_1 (C_{NaCN}) et de X_2 (C_{XTH}). $C_{NaCl} = 40$ mM et $T=20^\circ\text{C}$

Le deuxième gradient (couleur bleu), orienté dans le sens négatif de σ_0 semble être plus incliné vers l'axe horizontal de NaCN. Ce gradient montre que la diminution de la contrainte seuil est conditionnée, beaucoup plus, par la mise en jeu des quantités importantes de caséinate et à un degré moins la concentration du xanthane. Globalement, l'addition de 40mM de NaCl a été en faveur du rehaussement de la contrainte seuil des mélanges et a permis d'étendre le domaine de variation des deux biopolymères.

- *Cas où $C_{NaCl} = 100$ mM*

Sur la figure II.4 est représentée l'évolution des contours iso- σ_0 , lorsque la quantité de NaCl est augmentée à 100 mM. Aux fortes concentrations en protéine, $>5.5\%$, le gradient traduisant la croissance de σ_0 est pratiquement parallèle à l'axe de NaCN mais dans le sens opposé. Ceci suggère que la moindre quantité de xanthane mise en solution, en présence de cette forte concentration de NaCN va générer des interactions défavorables à la structuration du mélange et provoquera une séparation de phase. Ceci est prévisible, au vu de la taille des submicelles des caséinates qui atteint 11nm (Hadjasadok et al. 2008) qui rend les interactions ségréгатives plus significatives. A l'inverse, lorsque la quantité de la protéine en solution est en-deçà de 5.5 %, alors les deux biopolymères contribuent de façon concomitante à l'augmentation de la contrainte seuil. D'ailleurs, les valeurs de σ_0 enregistrées dans cette deuxième zone sont si importantes que nous avons obtenu des gels de xanthane et de caséinate de sodium.

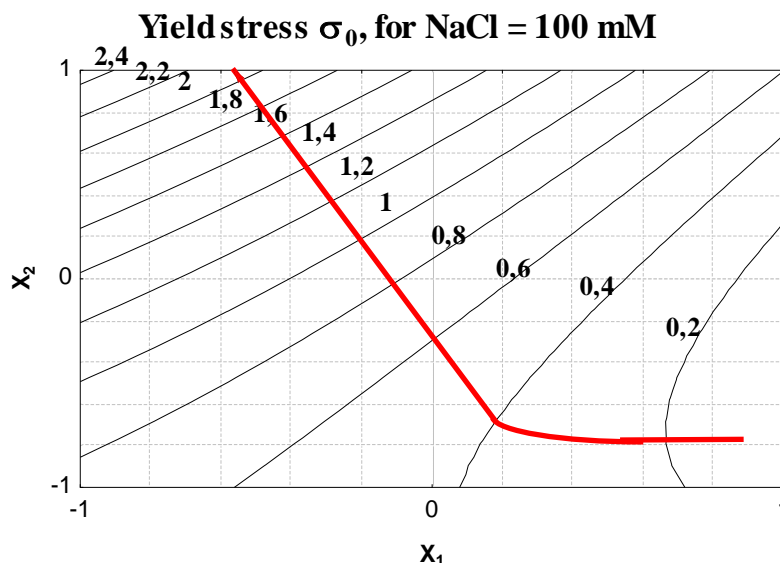


Figure II.4: Contours iso- σ_0 des mélanges en solution, en fonction de la variation simultanée de X_1 (C_{NaCN}) et de X_2 (C_{XTH}). $C_{NaCl} = 100$ mM et $T=20^\circ\text{C}$

II.3.3. Optimisation de la formule

La formule optimale peut correspondre au mélange NaCN-XTH qui offre la valeur maximale de σ_0 , ce qui permettrait d'obtenir des gels les plus consistants. Cette valeur est déterminée par simulation de la réponse σ_0 par son modèle polynomial qui offre une valeur numérique maximale, $\sigma_0 = 3.1 \text{ Pa}$, pour la solution: $C_{NaCN} = 1 \%$, $C_{XTH} = 0.5 \%$. et $C_{NaCl} = 100$ mM.

Le mélange optimal a l'aspect d'un gel turbide homogène, résultat d'une cohabitation des deux biopolymères en solution ou de leur association attractive qui génère des complexes. Afin de déterminer le type d'interaction mise en jeu au sein de ce système, une caractérisation par DLS et par FTIR-ATR a été entreprise.

II.3.4. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La figure I.5 montre les distributions granulométriques des solutions de NaCN à 1%, de XTH à 0,5% et de leur mélange aux mêmes concentrations. Ces solutions ont été diluées au 1/100 dans un milieu salin contenant 100 mM de NaCl. La distribution granulométrique de la protéine est bimodale. Le mode rapide est associé à la petite population de rayon hydrodynamique apparent, $R_{ha1} = 12 \text{ nm}$. Cette valeur est du même ordre de grandeur que la taille des submicelles, déterminée par Chu et al. (1995), Nash et al.(2002) et Hadjsadok et al., (2008) aux alentours de 8nm, 10 nm et 11 nm respectivement. Le mode lent, associé aux gros objets a un rayon hydrodynamique apparent, $R_{ha2} = 100 \text{ nm}$. Hadjsadok et al. (2008)

ont trouvé une valeur aux alentours de 60 nm et l'ont associée à la matière grasse résiduelle dans la solution. Chu et al.,(1995), Nash et al.,(2002) et Dickinson et al.,(2001), ont trouvé une taille aux alentours de 74 nm, 80 nm et 100 nm respectivement qui l'ont associée à des micelles de NaCN.

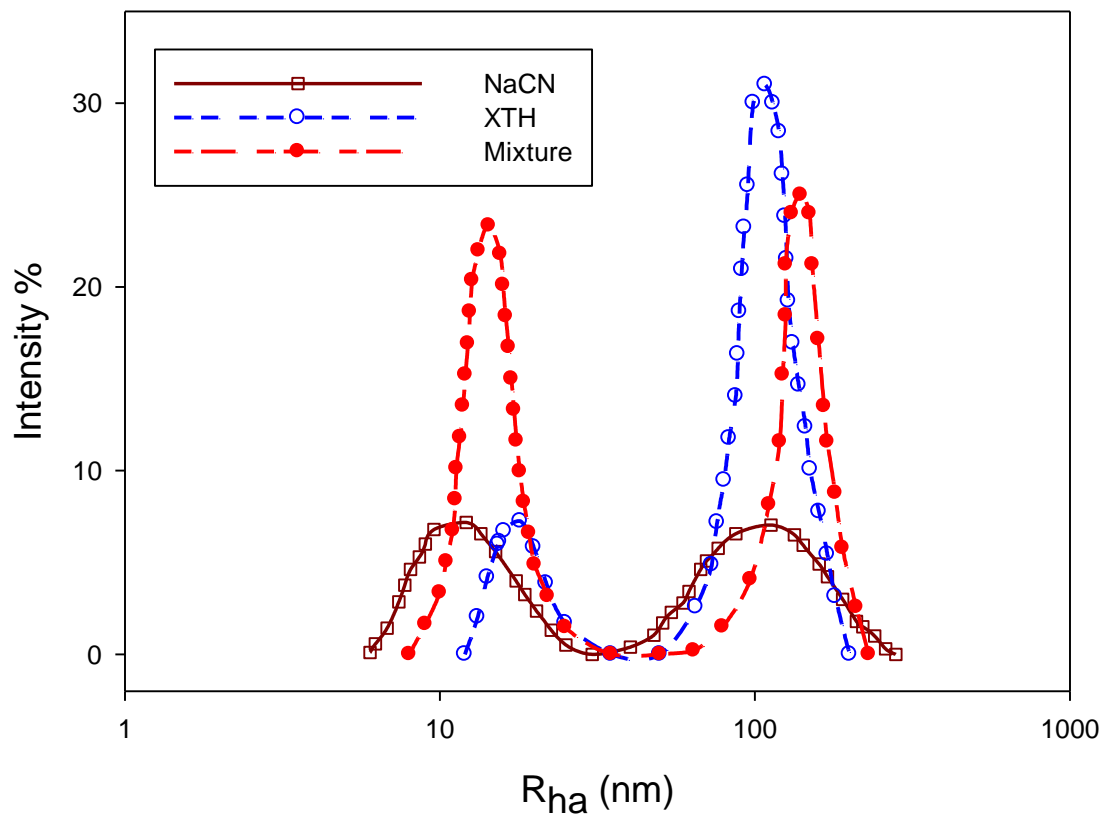


Figure II. 5 : Distribution granulométrique des solutions diluées au 1/100, de NaCN à 1%, de XTH à 0,5% et du mélange ($C_{NaCN} = 1\%$, $C_{XTH} = 0,5\%$, 100mM NaCl). $T=20^{\circ}C$.

Le xanthane présente une distribution bimodale, un mode rapide associé à une population de $R_{ha1} = 17 \text{ nm}$ et un mode lent associé à des objets de $R_{ha1} = 112 \text{ nm}$. Cette deuxième population est le résultat de l'agrégation des macromolécules de xanthane qui se trouvent en régime semi dilué. Ces résultats sont en concordance avec ceux de Oliviera et al.,(2013).

La distribution granulométrique du mélange exhibe deux populations, une à 15 nm environ et la deuxième aux alentours de 140 nm. La première est du même ordre de grandeur que le mode rapide des deux espèces. Donc, elle peut être associée soit aux macromolécules individuelles de xanthane, soit aux submicelles de caséinate de sodium ou aux deux, en même temps. En dépit de la valeur de sa taille qui est sensiblement supérieure, la deuxième

population reste du même ordre de grandeur des micelles de la protéine ou des agrégats de xanthane. L'absence d'une nouvelle entité dans la solution, suggère l'absence des interactions entre les deux espèces, par effet de dilution. En effet, même s'il y a eu formation de complexes dans le mélange initiale, ces complexes ont probablement subi une dissociation suite à la dilution au 1/100. Cette hypothèse peut être confirmée ou infirmée par analyse FTIR-ATR. Les travaux de Nash et al. (2002) confortent l'hypothèse d'absence des interactions, à travers des caractérisations par DLS, pour des concentrations faibles en protéine et en polysaccharide (<0.08 % g/g).

II.3.5. Spectres infra-rouges FTIR

La figure II.6 montre la superposition des spectres IR du mélange optimal et des deux biopolymères. La bande d'élongation asymétrique des CH₂ dans le mélange paraît se déplacer par rapport à sa position dans le cas des polymères seuls. Ceci peut expliquer une interpénétration des chaînes des deux macromolécules par des interactions attractives qui ne sont pas de nature électrostatique (Herrero et al., 2011, Arrieta et al., 2012 ; Lii et al., 2002).

De plus, la bande relative à l'amine, s'est légèrement déplacée (tableau 02). Il est à signaler un remarquable déplacement de la bande du carbonyle de l'amide située à 1635 cm⁻¹ dans le caséinate sodique et à 1642 cm⁻¹ dans le complexe, aussi la bande adjacente relative au même groupement s'est remarquablement déplacée vers les nombres d'ondes plus élevés, Probablement des interactions non-polaires jouent un rôle essentiel dans la formation de complexe, ainsi, la vibration d'élongation des groupements C-O dans les unités glucosique s'est déplacée de 5 cm⁻¹.

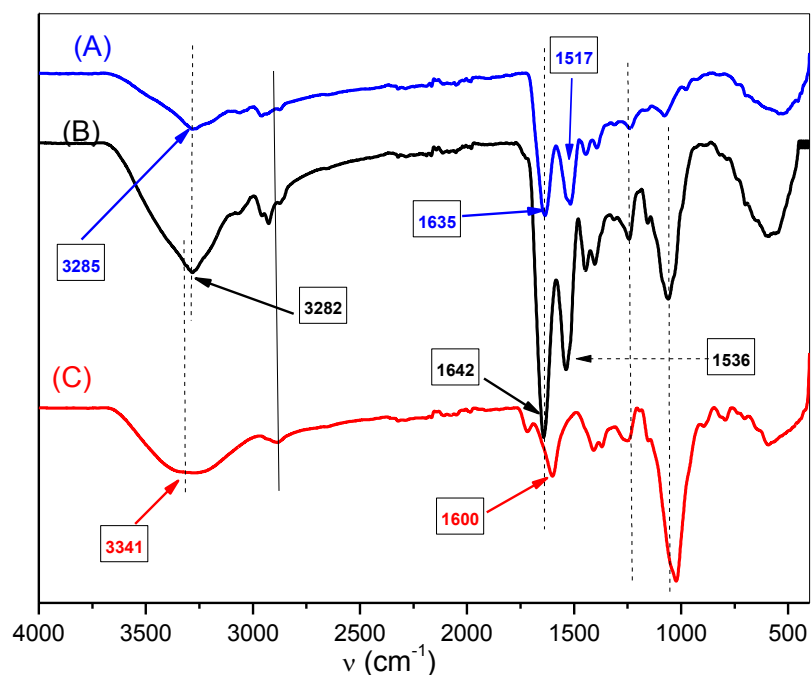


Figure II.6 : spectres infrarouges de : (A) NaCN, (B) mélange optimal, (C) Xanthane.

Tableau II.2 : principales bandes dans les spectres de XTH, NaCN et du mélange optimal.

ν (cm ⁻¹)				
Complexe	XTH	NaCN	Bandes	Intensité
	3341		ν_{OH} intramoléculaire liaisons H	Large et intense
3282		3285	ν_{NH} intramoléculaire liaisons H	Large moyenne
2926	2935	2959	ν_{CH_2} Elongation asymétrique	Faible
2874	2884	2874	ν_{CH_2} Elongation symétrique	Faible
	1717		ν_{COOH}	épaulement
	1600		$\nu_{C=O}, \delta_{OH}$	Intense
1642		1635	$\nu_{C=O}, \delta_{OH}$	Intense
1536		1517	$\nu_{C=N}, \delta_{NH}$	Intense
	1370		ν_{COO^-}	épaulement
1312		1312	δ_{NH}	épaulement
	1251		δ_{CH}	Moyenne
1155	1150		ν_{CO} (unité glucose)	épaulement
1060		1023	$\nu_{CO}, \nu_{C-C}, \delta_{COOH}$	Intense

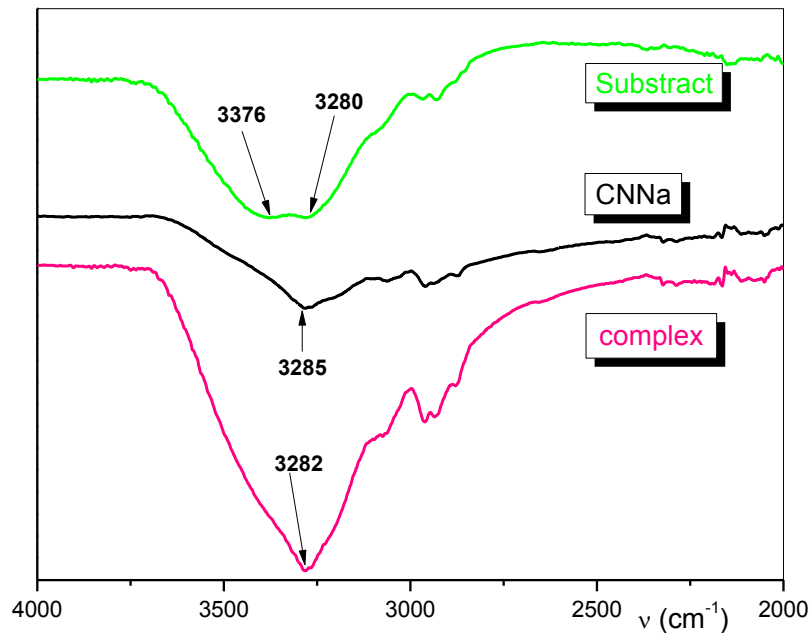


Figure II.7 : soustraction du spectre infrarouge du CNNa de celui du complexe (Subtract).

Dans le domaine spectral entre 4000 et 2000 cm^{-1} , la soustraction du spectre du caseinate de celui du mélange, a révélé que la bande enveloppe du complexe est constituée des bandes hydroxyyles du xanthane impliquée dans l'interaction située à 3376 cm^{-1} et celle de la bande amine située à 3280 cm^{-1} , or les bandes dans les constituants purs se situent respectivement à 3341 cm^{-1} et 3285 cm^{-1} , ce qui prouve que le spectre du mélange ne résulte pas d'une simple addition des spectres respectifs des biopolymère purs. On conclut donc que des complexes sont formés par le biais des interactions hydrophobes.

II.4. Conclusion

Des mélanges aqueux contenant des caséinate de sodium et du xanthane ont été étudiés en présence du sel au pH neutre. L'objectif était de déterminer les conditions optimales de formation des complexes solubles par utilisation de la méthode des plans d'expériences. L'analyse rhéologique des systèmes a montré que le comportement était non newtonien ne pouvant être représenté par le modèle de Casson. L'exploration du modèle RSM de la contrainte seuil, de Casson, a permis de déterminer les contours iso-réponses et

d'identifier les zones dans lesquelles sont obtenus des gels sans enregistrer de séparation de phase.

L'analyse par FTIR de la formule optimale, a mis en évidence la formation de complexes et la nature hydrophobe des interactions responsables de leur formation. La DLS a permis de déduire que ces complexes se dissocient par dilution, d'où leur caractère réversible.

Références

- Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., Garrigós, M. D. C., & Jiménez, A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, *114*(4), 486–494.
- Belyakova, L. E., Antipova, A. S., Semenova, M. G., Dickinson, E., Merino, L. M., & Tsapkina, E. N. (2003). Effect of sucrose on molecular and interaction parameters of sodium caseinate in aqueous solution: Relationship to protein gelation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *31*(1–4), 31–46.
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2002). Protein-Polysaccharide Interactions for Stabilization of Food Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, *23*(1–3), 93–123.
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J. L., & Agnely, F. (2012). Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International Journal of Pharmaceutics*, *436*(1–2), 359–378.

- Chu, B., Zhou, Z., Wu, G., & Farrell, H. M. J. (1995). Laser light scattering of model casein solutions: Effects of High Temperature. *Journal of Colloid and Interface Science*, 170, 102 – 112.
- De Kruif, C. G., Weinbreck, F., & De Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9(5), 340–349.
- Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients, *Drying Technology : An International Journal*, 23:7, 1361-1394
- Dickinson, E., Semenova, M. G., Belyakova, L. E., Antipova, A. S., Il'in, M. M., Tsapkina, E. N., & Ritzoulis, C. (2001). Analysis of light scattering data on the calcium ion sensitivity of caseinate solution thermodynamics: relationship to emulsion flocculation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 239(1), 87–97.
- Dickinson, E. (2011). Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1966–1983.
- Doublier, J. L., Garnier, C., Renard, D., & Sanchez, C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(3–4), 202–214.
- Evans, M., Ratcliffe, I., & Williams, P. A. (2013). Emulsion stabilisation using polysaccharide – protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 272–282.
- Fioramonti, S. A., Perez, A. A., Aríngoli, E. E., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2014). Food Hydrocolloids Design and characterization of soluble biopolymer complexes produced by electrostatic self-assembly of a whey protein isolate and sodium alginate. *Food Hydrocolloids*, 35, 129–136.
- Ghorbani Gorji, S., Ghorbani Gorji, E., Mohammadifar, M. A., & Zargaraan, A. (2014). Complexation of sodium caseinate with gum tragacanth: Effect of various species and rheology of coacervates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 503–511.
- Hadjsadok, A., Moulai-mostefa, N., & Rebiha, M. (2010). Rheological properties and phase separation of xanthan-sodium caseinate mixtures analyzed by a response surface method. *International Journal of Food Properties*, 13: 2, 369 – 380 .
- HadjSadok, A., Pitkowski, A., Nicolai, T., Benyahia, L., & Moulai-Mostefa, N. (2008). Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1460–1466.
- Hemar, Y., Tamehana, M., Munro, P. A., & Singh, H. (2001). Viscosity, microstructure and phase behavior of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 565–574.

- Herrero, A. M., Carmona, P., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F., & Ruíz-Capillas, C. (2011). Olive oil-in-water emulsions stabilized with caseinate: Elucidation of protein-lipid interactions by infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 12–18.
- Huck-Iriart, C., Álvarez-Cerimedo, M. S., Candal, R. J., & Herrera, M. L. (2011). Structures and stability of lipid emulsions formulated with sodium caseinate. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 16(5), 412–420.
- Kobori, T., Matsumoto, A., & Sugiyama, S. (2009). pH-Dependent interaction between sodium caseinate and xanthan gum. *Carbohydrate Polymers*, 75(4), 719–723.
- Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Food Chemistry*, 141(2), 975–984.
- Lii, C. Y., Liaw, S. C., Lai, V. F., & Tomasik, P. (2002). Xanthan gum-gelatin complexes. *European Polymer Journal*, 38(7), 1377–1381.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., & Weiss, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49:6, 577-606
- Moulai-Mostefa, N., Sabri, N., Khalladi, R., & HadjSadok, A. (2014). Investigations of the effects of salt and biopolymer ratio on sodium caseinate-xanthan interactions in aqueous solution and emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 35(3), 390–396.
- Nash, W., Pinder, D. ., Hemar, Y., & Singh, H. (2002). Dynamic light scattering investigation of sodium caseinate and xanthan mixtures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 30(5), 269–271.
- Oliveira, F. C. De, Coimbra, J. S. D. R., de Oliveira, E. B., Zuñiga, A. D. G., & Rojas, E. E. G. (2014). Food Protein-Polysaccharide Conjugates obtained via the Maillard Reaction: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398(August), 37–41.
- Oliveira, P. D., Michel, R. C., McBride, A. J. A., Moreira, A. S., Lomba, R. F. T., & Vendruscolo, C. T. (2013). Concentration regimes of biopolymers xanthan, tara, and clairana, comparing dynamic light scattering and distribution of relaxation time. *PLoS ONE*, 8(5), 2–8.
- Rodriguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2011). Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1925–1937.
- Pitkowski, A., Nicolai, T., & Durand, D. (2009). Stability of caseinate solutions in the presence of calcium. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1164–1168.
- Piorkowski, D. T., & McClements, D. J. (2014). Beverage emulsions : Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42, 5–41.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Banon, S. D., & Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(8), 689–753.

- Schmitt, C., & Turgeon, S. L. (2011). Protein / polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1–2), 63–70.
- Singh, H. (2011). Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1938–1944.
- Sosa-Herrera, M. G., Berli, C. L. A., & Martínez-Padilla, L. P. (2008). Physicochemical and rheological properties of oil-in-water emulsions prepared with sodium caseinate/gellan gum mixtures. *Food Hydrocolloids*, 22(5), 934–942.
- Surh, J., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2006). Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 607–618.
- Takeuchi, K. P., & Cunha, R. L. (2008). Influence of ageing time on sodium caseinate gelation induced by glucono- δ -lactone at different temperatures. *Dairy Science and Technology*, 88(6), 667–681.
- Turgeon, S. L., Schmitt, C., & Sanchez, C. (2007). Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12(4–5), 166–178.

Chapitre III :

Optimisation de la formulation des émulsions multiples stabilisées par le complexe soluble caséinate de sodium - xanthane

Résumé

L'objectif de cette partie d'études est d'évaluer les paramètres de formulation ayant un effet sur l'intégrité et la stabilité des émulsions multiples, conçues avec le complexe soluble de caséinate de sodium – xanthane, et d'illustrer les mécanismes impliqués dans les processus de relargage, i.e. le comportement de ces macromolécules aux interfaces. Une étude d'optimisation a été réalisée afin de déterminer la composition des émulsions multiples permettant l'obtention des systèmes performants comme réservoirs d'encapsulation de la vitamine C. Ainsi, la taille des dispersions, la microstructure, le taux de crémage et l'efficacité d'encapsulation servaient de paramètres de contrôle et de suivi pour une étude de stabilité de trois mois. La diffusion active par micelles inverses s'est avérée le processus destructeur, si présent, et a été entravé par modulation de l'interface interne de l'émulsion multiple.

III.1. Introduction

Les émulsions multiples, couramment appelées membranes liquides, sont des systèmes multi-compartimentés, qui permettent de renfermer plusieurs types de substances incompatibles au sein d'une même formulation, dans des réservoirs séparées par un liquide non miscible, qui est souvent une membrane huileuse séparant deux compartiments aqueux.

La maîtrise de cette membrane est très délicate, car il s'agit d'un état métastable qui finit par la destruction de ces systèmes, et on obtient à la fin deux phases séparées, une huileuse et l'autre aqueuse.

L'usage des tensioactifs appropriés constitue une approche incontournable afin de maîtriser les interfaces. Les tensioactifs les plus prometteurs sont les macromolécules émulsifiantes (polymères), les naturelles telles que les protéines constituent des substances de choix car, à leurs propriétés émulsifiante, s'ajoute leurs qualités biodégradable et nutritive.

Les polysaccharides ont été utilisés ces dernières années associés aux protéines pour stabiliser les interfaces, sous forme de complexes, généralement, par le biais des interactions covalentes ou électrostatiques.

Dans ce travail, des complexes formés en impliquant des interactions hydrophobes, entre le caseinate de sodium (la protéine) et le xanthane (polysaccharide), et qui ont été optimisés dans le chapitre précédent, font l'objet d'une étude visant la mise à profit de leurs propriétés émulsifiantes au sein d'une émulsion multiple.

L'objectif de cette partie est donc de maîtriser la stabilité des émulsions multiples, fabriquées avec ces complexes, au niveau macroscopique (séparation de phase) et au niveau morphologique (maintien de la structure compartimentée, diamètres des globules gras inchangés), et notamment, en terme d'efficacité d'encapsulation et la réduction de relargage des actifs encapsulés. Pour cela, l'impact de divers paramètres de formulation, la concentration d'huile, la concentration de l'émulsifiant hydrophobe et la concentration de caséinate de sodium dans la phase aqueuse interne sera étudié.

Une étude de stabilité pendant trois mois sera envisagée en contrôlant la variation de la taille des globules huileux et le taux de crémage. La détermination de l'efficacité d'encapsulation en fonction des facteurs influents, permettra de révéler les mécanismes de libération de

substances encapsulées, et peut constituer une approche pour la conception de systèmes à libération contrôlée.

III.2. Matériels et méthodes

III.2.1. Matériels

Caseinate de Sodium a été obtenu de ARMOR Protein, France, la gomme Xanthane achetée de Orkila, Algérie. La phase huileuse, (triglycerides à chaines moyennes MCT (Miglyol® 812) et l'émulsifiant hydrophobe, PGPR, Poly glycerol polyricinoleate (IMWITOR® 600) obtenu de Polypharma gmbh. Vitamines achetées de Sigma-Aldrich et sont : acide ascorbique (vitamine C), α - tocopherol (vitamine E), acetate retinol (vitamine A). Tous les autres réactifs sont de grade analytique et ont été achetés de Sigma-Aldrich.

L'eau utilisée dans toutes les expériences est doublement distillée et désionisée.

III.2.2. méthodes

a. Préparation de l'émulsion multiple

Les émulsions multiple ont été préparées en utilisant le procédé à deux étapes.

Dans la première étape, l'émulsion primaire a été préparée par dispersion de la phase aqueuse (w1) dans la phase huileuse (o) contenant l'émulsifiant hydrophobe. Puis, cette émulsion a été dispersée elle-même dans la phase aqueuse externe contenant le complexe biopolymérique (w2).

La phase aqueuse interne contient le caseinate de sodium et l'acide ascorbique (2 %) dissout dans l'eau désionisée. NaOH (0.1 M) a été ajouté à ces solutions pour ajustement du pH à pH neutre. Caseinate de sodium a été ajouté dans le but d'améliorer les propriétés émulsifiantes de PGPR (su et al., 2006), et l'acide ascorbique a été utilisé comme traceur et pour équilibrer la pression osmotique entre les deux phases aqueuses. La concentration d'acide ascorbique choisie (2%) est celle qui offre la même osmolarité que la phase aqueuse externe, mesurée par osmomètre VISCOR®, qui est de l'ordre de 220 mosm.

L'émulsion primaire (w/o), constituée de 30% phase aqueuse interne et 70% phase huileuse, a été préparée par addition goutte à goutte de la phase aqueuse interne à la phase huileuse contenant l'émulsifiant PGPR, sous agitation mécanique à 1400 tr/min pendant 07 min, puis

immédiatement homogénéisée en utilisant un homogénéisateur rotor-stator (Polytron PT 3100, Kinematica AG, Switzerland) à 8000 tr/min pendant 05 min, puis à 24000 tr/min pendant 02 min.

Dans la deuxième étape, une émulsion multiple brute a été obtenue par incorporation progressive goutte à goutte de l'émulsion primaire dans la phase aqueuse externe constitué du complexe soluble caseinate de sodium – xanthane, préparé précédemment, sous agitation à 700 tr/min pendant 10 min, puis cette émulsion multiple brute a été soumise à une homogénéisation (à l'aide d'un homogénéisateur rotor – stator) pendant 05 min à 3500 tr/min pour obtenir l'émulsion double finale.

La fraction émulsion primaire/phase aqueuse externe pour chaque essai est définie dans le plan d'expérience.

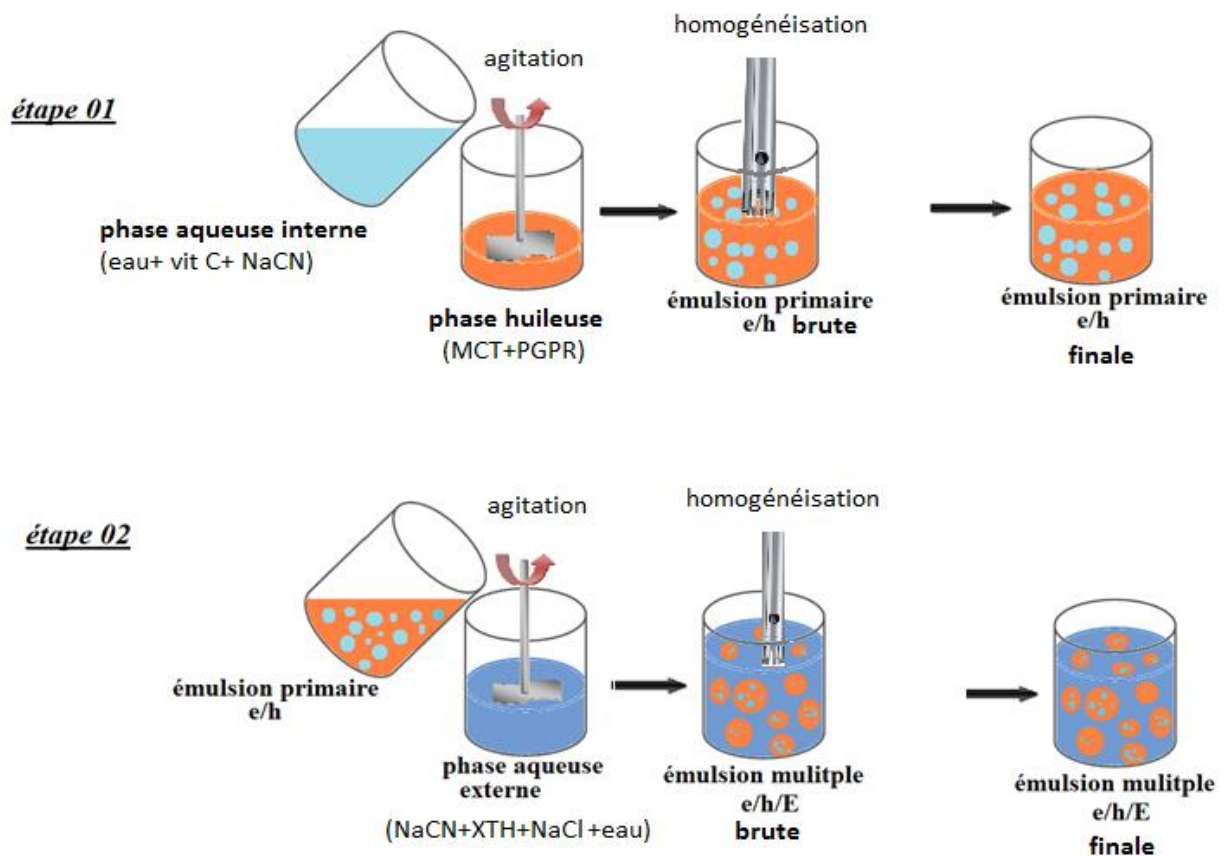


Figure Schéma du procédé de préparation des émulsions multiples

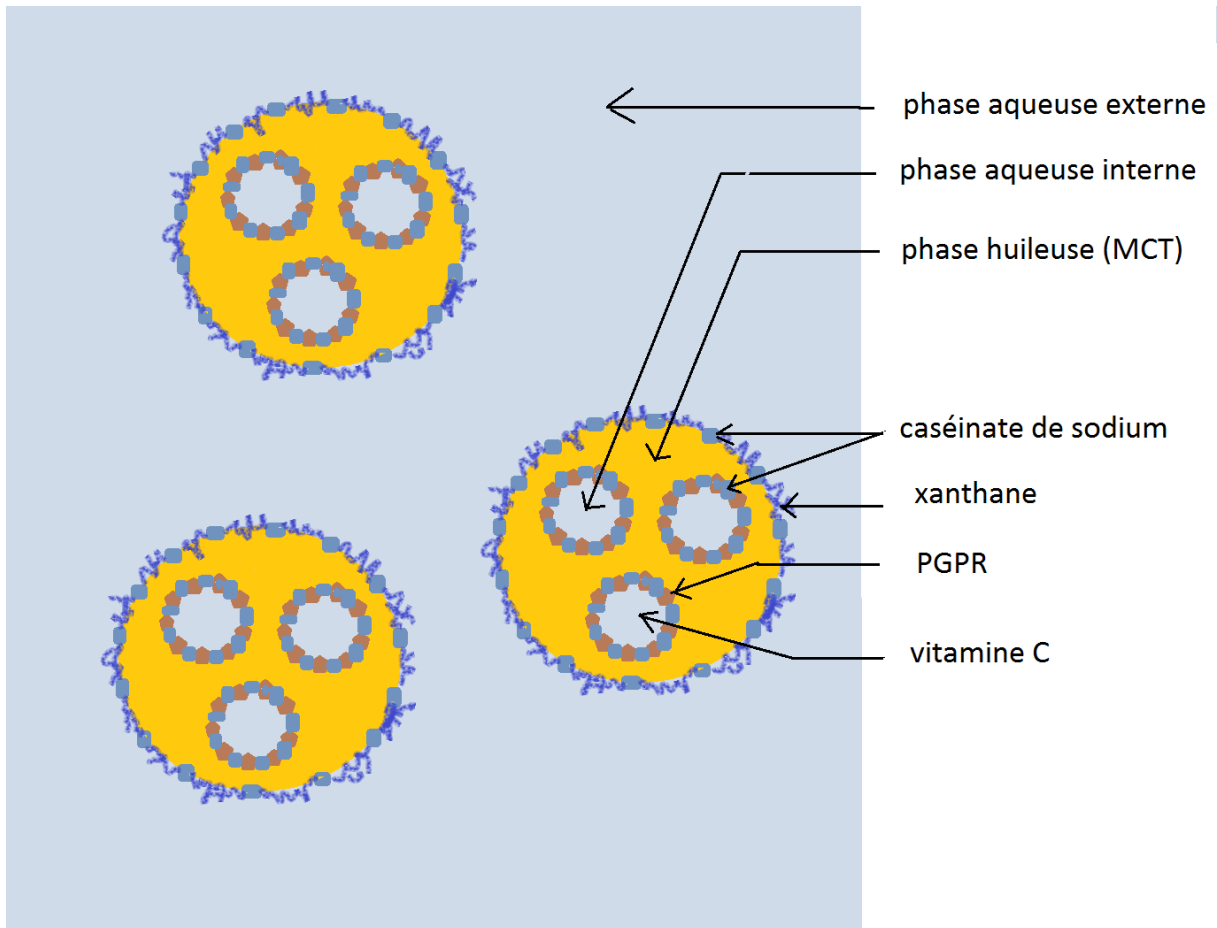


Figure : Schéma représentant la composition et la structure des émulsions multiples

b. Caractérisation :

Le diamètre moyen des globules huileux a été mesuré par diffraction statique de lumière en utilisant un granulomètre laser Malvern 2000s Mastersizer. La taille des gouttelettes internes est très petites et ne pouvait pas être mesurée par cet appareil (gamme de mesure 0.05 μm -1mm). La distribution de taille des globules a été exprimée en diamètre moyen en surface D3,2.

La stabilité au crémage des émulsions multiples a été exprimée en termes de pourcentage de la hauteur des phases séparées à la hauteur initiale des échantillons.

L'évolution structurale des émulsions multiples a été suivie au moyen d'un microscope optique Olympus BX51 (Zeiss, Germany) équipé d'une caméra. Les photo-micrographes (grossissement de 40X) ont été prises juste après fabrication et après 90 jours d'entreposage à 25 °C.

L'efficacité d'encapsulation (**EE**) des émulsions multiples a été évaluée par la détermination du pourcentage d'acide ascorbique libéré dans la phase aqueuse externe par rapport à la quantité initiale présente dans la phase aqueuse interne. La quantité d'acide ascorbique a été déterminée par dosage oxydo-réduction en utilisant la titration par iode.

Stabilité des émulsions multiples

Les paramètres de suivi de la stabilité des émulsions multiples sont le taux de crémage, l'évolution de la distribution de taille des globules huileux ainsi que l'efficacité d'encapsulation.

c. Plan d'expériences

Les effets de trois variables indépendantes, x1 (concentration de caseinate de sodium dans la phase aqueuse interne), x2 (concentration de PGPR / l'émulsion primaire), x3 (fraction émulsion primaire / émulsion multiple), sur trois réponses : Y1 (D32, diamètre moyen en surface des globules huileux immédiatement après préparation), Y2 (D32 après 90 jours d'entreposage à température ambiante) et Y3 (efficacité d'encapsulation des émulsions multiples, 10 jours après la préparation) sont évalués en utilisant la méthodologie de surfaces de réponses (RSM). Un plan factoriel (CCF) a été employé pour établir des modèles mathématiques de prédiction.

Le logiciel exploité pour ces fins est STATISTICA 8.0.

La concentration de caseinate de sodium (X1) est variée dans l'intervalle (0.125% - 1 %), X2, la concentration en PGPR dans l'émulsion primaire, varie de 1 à 10 %, et X3, le pourcentage de l'émulsion primaire/ émulsion multiple (g/g), est varié entre 20% à 60%.

Tableau III.1 montre les niveaux de variation des différents facteurs utilisés dans le plan d'expériences associés aux réponses.

Tableau III. 1 : matrice d'expériences associée aux réponses

	X1	X2	X3	D32	EE (t= 10j)
N ° d'expérience	NaCN	PGPR /E1	E1/E2		
1	0,125	1	20	6,81	56,28
2	1	1	20	5,63	79,04
3	0,125	10	20	4,72	44,76

4	1	10	20	5,05	82,825
5	0,125	1	60	4,8	53,14
6	1	1	60	7,99	70,47
7	0,125	10	60	4,17	47,9
8	1	10	60	4,57	66,349
9	0,125	5,5	40	5,69	51,4286
10	1	5,5	40	5,16	93,429
11	0,5625	1	40	6,95	65,71
12	0,5625	10	40	4,79	54,286
13	0,5625	5,5	20	5,73	69,52
14	0,5625	5,5	60	6,3	81
15	0,5625	5,5	40	6,14	88,75
16	0,5625	5,5	40	5,82	89
17	0,5625	5,5	40	5,64	88,5

III.3. Résultats et discussions

III.3.1. Modélisation mathématique en surface de réponse

Les modèles mathématiques de prédiction des diamètres moyens des globules (D32) ainsi que l'efficacité d'encapsulation (EE), ont été calculés par utilisation de la méthode des moindres carrés partielles (PLS), et sont donnés par les relations qui suivent :

D32

$$D32 = 5.6258 - 0,090 X_1 - 0,882 X_2 + 0,184 X_3 - 0,166 X_1^2 + 0,107 X_2^2 + 0,155 X_3^2 \\ + 0,057 X_1 X_2 + 0,155 X_1 X_3 - 0,255 X_2 X_3$$

EE

$$EE = 81,7108 + 10,7405 X_1 - 0,781691 X_2 - 0,218932 X_3 - 3,44999 X_1^2 - 7,1382 X_2^2 \\ - 0,704241 X_3^2 + 1,01211 X_1 X_2 - 2,54149 X_1 X_3 + 0,432834 X_2 X_3$$

Les coefficients de détermination R^2 sont de l'ordre de 0,95 et 0,80 de pour D32 et EE respectivement, et traduisent la bonne qualité de régression.

III.3.2. Effet des facteurs de formulation sur la taille des globules huileux (D32) :

Le rôle essentiel du complexe biopolymérique au sein de l'émulsion multiple est de maîtriser l'interface externe des globules huileux. Ceci se manifeste principalement par la conservation de la taille des globules huileux. En effet, un émulsifiant efficace permet d'obtenir de faibles tailles de globules, mais aussi qui demeurent inchangées au cours du temps.

La taille des globules huileux (D32) de toutes les émulsions est de l'ordre de 4 – 8 μm , et présente une distribution bimodale, avec une population $< 0.1 \mu\text{m}$ et une large population $> 1\mu\text{m}$. Aucun changement significatif n'est apparu après 90 jours d'entreposage à température ambiante.

La taille des globules huileux obtenus est comparable à celles de Bonnet et al. (2009), qui sont de l'ordre de 10 μm , obtenues pour des émulsions multiples formées avec du caseinate de sodium comme émulsifiant hydrophile et le PGPR comme émulsifiant hydrophobe.

Benichou et al. (2007) ont obtenu des tailles moyennes D43 environ 22 μm pour des émulsions multiples préparées avec des complexes électrostatiques de WPI (isolats de protéines de lactosérum) et de gomme xanthane comme émulsifiant secondaire.

Dans d'autres travaux, Lutz et al. (2009) ont préparé des émulsions multiples de MCT comme phase huileuse avec des complexes solubles de pectine modifiée et de WPI, et ils ont obtenu des tailles réduites à 35 μm , comparées à celles des émulsions préparées avec WPI comme émulsifiant secondaire unique, de l'ordre de 75 μm . La taille des globules a demeuré inchangée pendant 28 jours d'entreposage.

D'autres auteurs ont reporté des tailles comparables des émulsions multiples préparées avec des conjuguats de caseinate de sodium (Fichner et al., 2007 ; J. O'Regan, 2010,....).

- **Influence des concentrations du PGPR, de caseinate de sodium et de la fraction de l'émulsion primaire (paramètres de formulation) sur la taille des globules huileux**

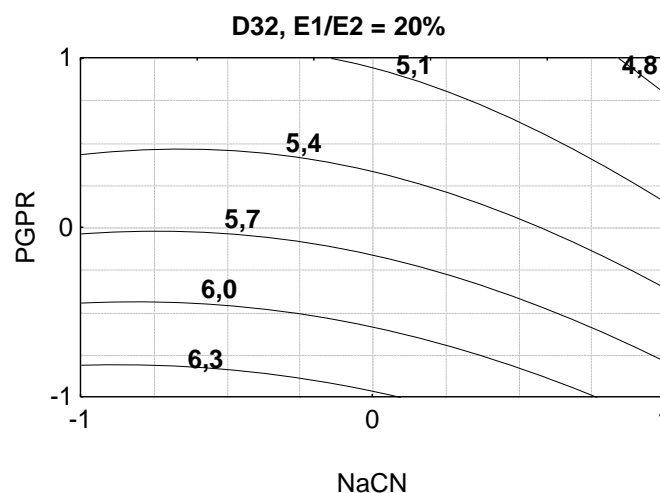
Les courbes d'iso-réponses du D32 sont présentées ci-dessous. On constate clairement que la concentration du PGPR a l'effet dominant sur la taille des globules. En effet, une

augmentation de la concentration du PGPR réduit la taille des globules huileux, même si la variation de celle-ci reste très restreinte.

Le PGPR est présent sur les interfaces des gouttelettes internes de l'émulsion multiple, et son pouvoir émulsifiant ne peut être exercé aux interfaces externes des globules huileux. Cependant, le PGPR augmente la viscosité des émulsions primaires, et améliore de ce fait la résistance aux effets de cisaillement, pendant l'homogénéisation secondaire, et par conséquence réduit la vitesse de coalescence des globules (Su et al., 2006 ; Garti et al., 1997), ce qui peut expliquer la réduction des tailles.

Il est à noter que, dans la quasi-totalité des travaux réalisés sur des émulsions multiples, la taille des globules huileux n'est affectée que par l'émulsifiant secondaire (Bonnet et al., 2009, Su et al., 2006...), sauf quelques exceptions, comme celui des émulsions multiples stabilisées par des conjugués de caséinate de sodium-dextran (Fichner et al., 2007), auquel cas des concentrations exagérées de PGPR ont conduit à la coalescence des globules huileux, à cause de l'interférence du PGPR avec l'émulsifiant secondaire, notamment sous des conditions agressives de pH et de température.

L'effet de *caseinate de sodium* sur la taille des globules huileux est insignifiant. Plusieurs études ont mentionné que le caseinate de sodium contribue à former une forte couche viscoélastique, qui stabilise l'interface de l'émulsion primaire (Bonnet et al., 2009 et Su et al., 2006). Cependant, le caseinate de sodium n'agit pas au niveau de l'interface secondaire. En effet, sa grande taille moléculaire l'empêche de migrer d'une interface à l'autre, et ne peut donc affecter la taille des globules huileux.



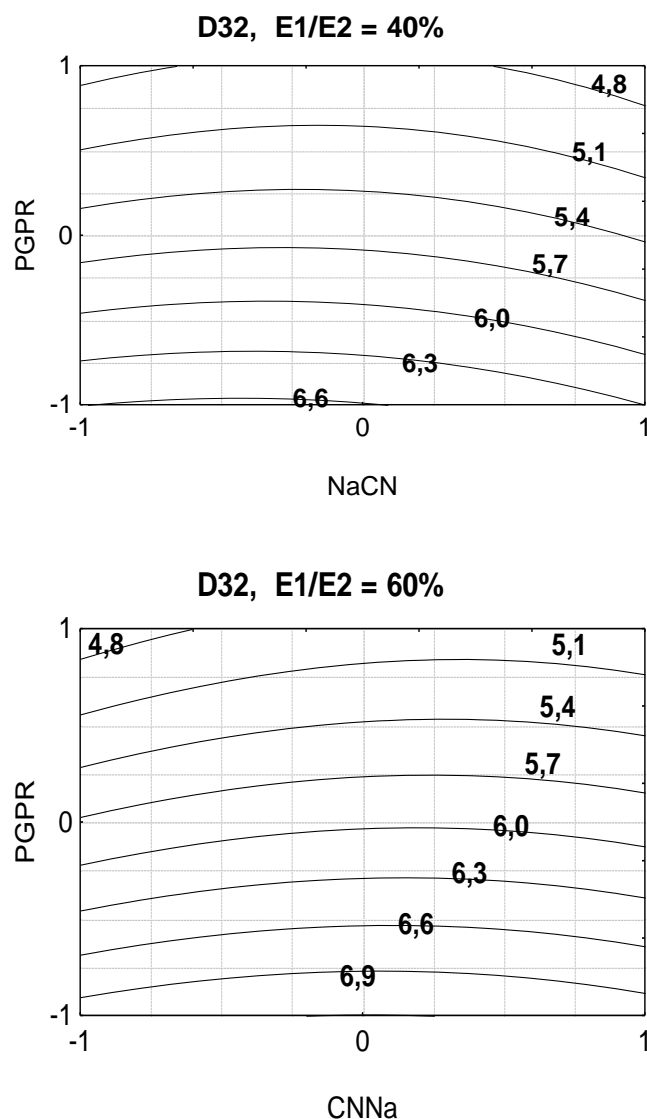


Figure III. 1. Contours d'iso-D32 des émulsions multiples juste après fabrication en fonction de la variation simultanée de [NaCN] et [PGPR] à différentes fractions E1/E2

La fraction des globules huileux n'a aucun effet sur la taille des globules. Cet effet est connu pour les émulsifiant biopolymériques (Benichou et al., 2002). En outre, la floculation par pontage, à haute fraction des globules huileux, ne peut pas être suspectée.

▪ **D32 après trois mois d'entreposage**

La taille des globules demeure inchangée pour toutes les émulsions, y compris celles présentant un crémage (avec 20 % de la phase dispersée, voir plus loin), ceci reflète la stabilité élevée contre la coalescence, due aux mécanismes de stabilisation stériques et électrostatiques assurés par le complexe biopolymérique.

La taille des globules huileux D32 après 90 jours de stockage montre une forte corrélation avec D32 juste après préparation, et sont représentés dans la figure II.2.

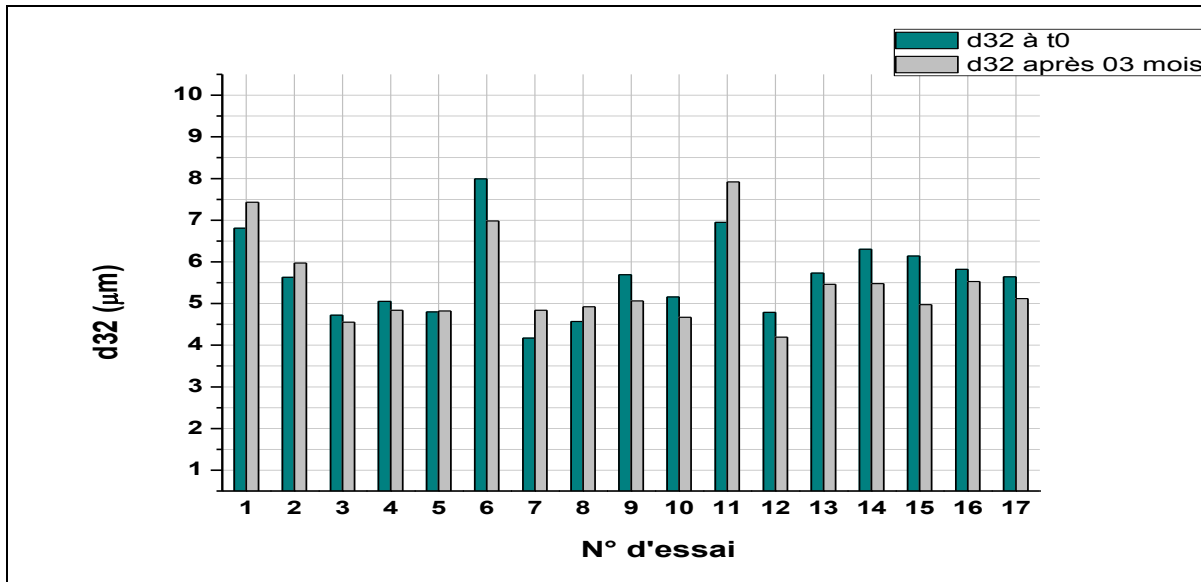


Figure III.2. Histogramme représentatif des diamètres des globules des émulsions multiples à t₀ (juste après fabrication) et après trois mois d'entreposage

III.3.3. Stabilité au crémage

Pour des fractions relativement élevées de la phase dispersée, 40 – 60 %, les globules huileux sont stables à la séparation gravitationnelle (crémage). Ceci permet de conclure que l'amélioration des propriétés rhéologiques (l'effet viscosifiant) attribuées au complexe NaCN-XTH a permis de prévenir tels mécanismes de déstabilisation. Cependant, les émulsions à faible fraction d'huile (20%), montrent un crémage suite à l'entreposage à température ambiante (à 4°C, pas de crémage observé pendant 10 mois de stockage), cet effet peut être attribué à la déplétion par floculation, causée par le haut pourcentage des biopolymères non adsorbés par rapport aux globules d'huile.



Figure III.3.Aspect macroscopiques des émulsions multiples après trois mois d'entreposage à température ambiante

III.3.4. Microstructure des émulsions multiples

Figure III.4. montre un exemple de micrographes d'une émulsion multiple, immédiatement après préparation et après 90 jours de stockage à température ambiante. Toutes les émulsions produites présentent des structures similaires, quelque soient leurs composition et sont constituées de globules multi-compartimentées, renferment plusieurs gouttelettes aqueuses (émulsions doubles type C). La taille des gouttelettes internes paraît trop faible (non mesurée) et il n'y a pas de coalescence apparente (gouttelettes internes entre elles ou gouttelettes internes/globules huileux).

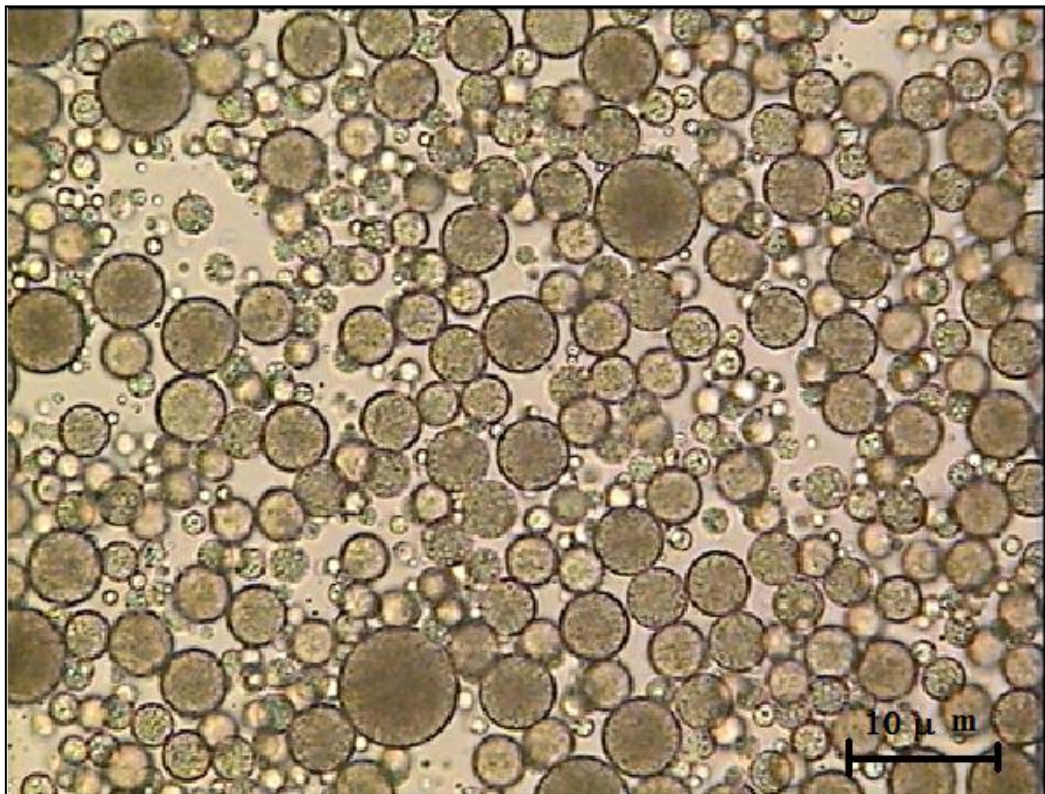
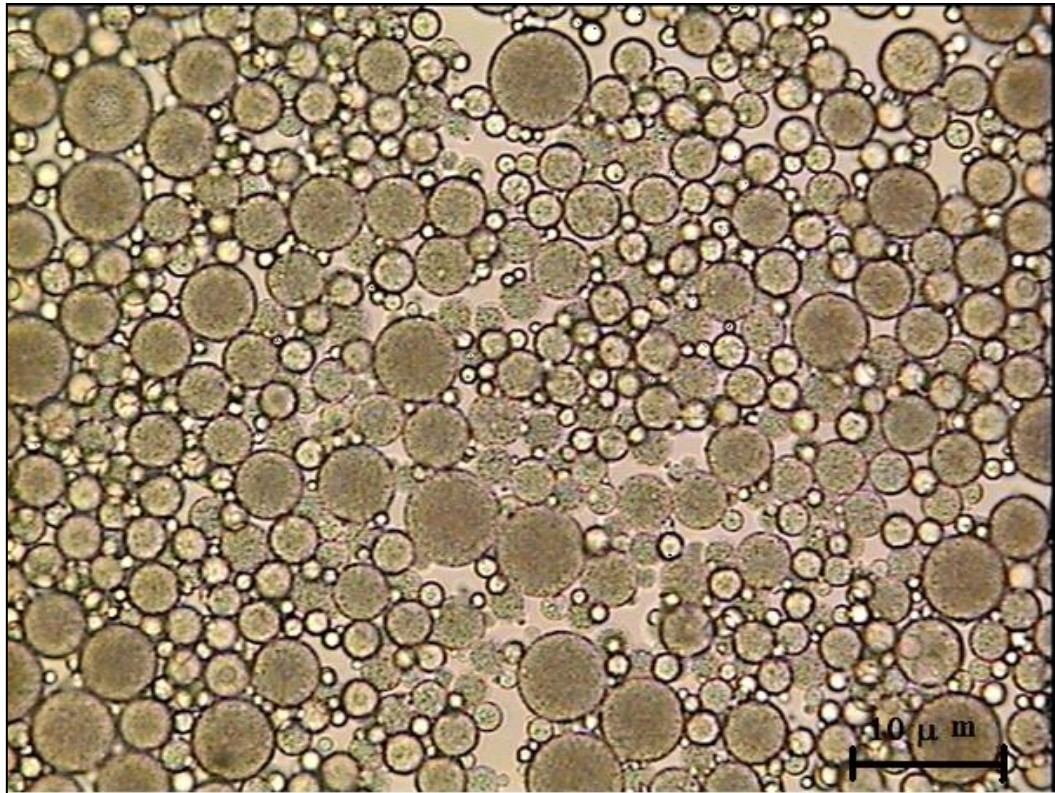


Figure III.4. Photo microscopique de l'émulsion de l'essai n° 16 après la préparation (image du haut) et après trois mois (image du bas).

III.3.5. Efficacité d'encapsulation (EE) de l'acide ascorbique dans les émulsions multiples :

Une bonne efficacité d'encapsulation est la propriété la plus importante qui peut être attribuée à une émulsion multiple. L'EE est influencée par une multitude de paramètres incluant la composition des émulsions à tous les niveaux notamment aux interfaces, dont les émulsifiants sont les acteurs dominants. La connaissance de l'influence de ces derniers permet de prédire les mécanismes impliqués dans la libération des substances encapsulées.

L'efficacité d'encapsulation des émulsions multiples a été déterminée immédiatement après préparation et après 10 jours de stockage à température ambiante, et a été calculée sur la base du rapport de la quantité d'acide ascorbique mesurée dans la phase aqueuse externe, sur celle présente initialement dans la phase aqueuse interne.

L'analyse des surfaces de réponse (figure II.5) montre que l'augmentation de la concentration de NaCN dans la phase interne conduit à une grande augmentation de l'EE, cependant l'augmentation en concentrations de PGPR résulte en une légère augmentation EE, pour atteindre un maximum autour de 5.5 %, puis une diminution à haute concentrations.

La fraction de la phase dispersée n'a pratiquement aucun effet sur EE.

On peut expliquer l'effet du PGPR par son habilité connue d'améliorer les propriétés interfaciales des gouttelettes internes d'eau, et ceci par la réduction de la coalescence et par conséquent la libération de l'acide ascorbique. Cependant, à des concentrations plus élevées, le PGPR en excès migre de l'interface des gouttelettes internes à l'interface du globule, et déstabilise cette dernière par interférence avec l'émulsifiant lipophile (complexe NaCN-XTH). (Benichou et al., 2002). Pendant cette migration, le PGPR accroît la diffusion de l'acide ascorbique par micelles inverses et accroît donc sa libération.

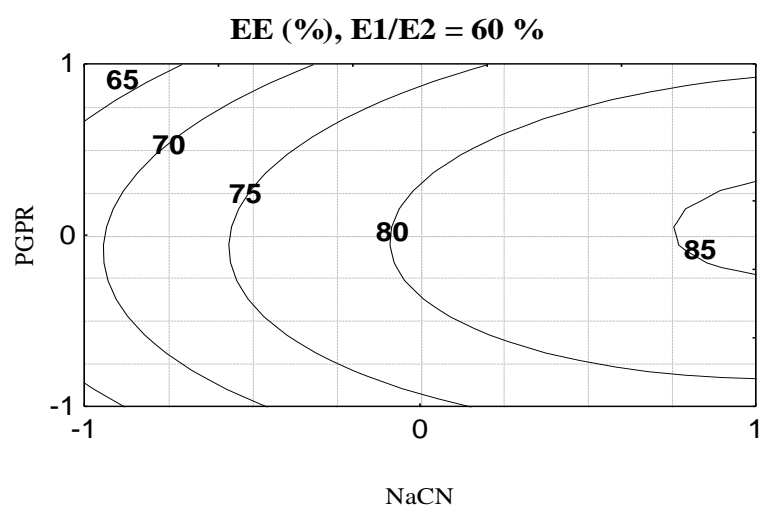
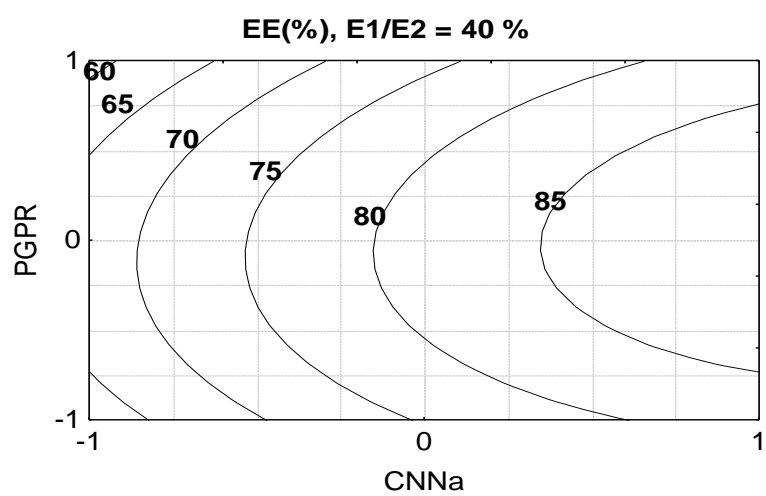
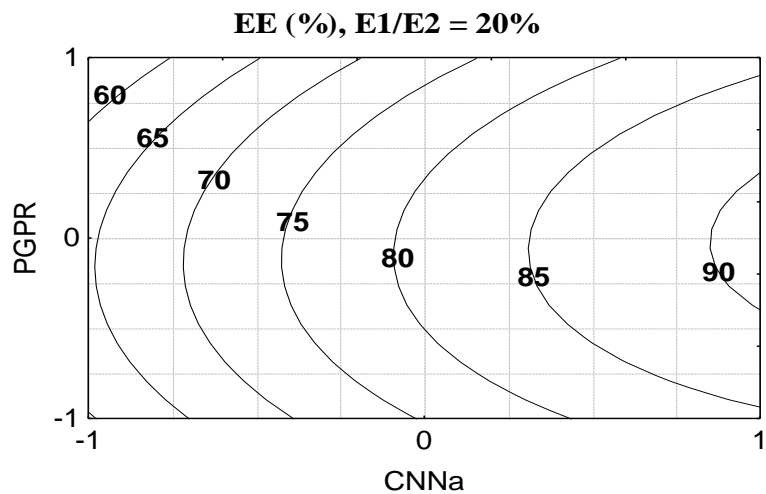


Figure III.5. Contours iso-EE des émulsions multiples en fonction de [PGPR], [NaCN] à différentes fractions E1/E2

On peut présumer que le caseinate de sodium, associé au PGPR dans l'interface interne, interagit avec ce dernier et prévient sa migration en produisant une couche interfaciale plus résistante, ceci en s'appuyant sur les travaux de Gülseren et al., (2012) qui ont démontré que le caseinate de sodium se lie avec le PGPR via des interactions hydrophobes, pour former des films interfaciaux plus rigides, avec des tensions interfaciales réduites et des propriétés viscoélastiques améliorées.

Pour Tepsongkroh et al., (2015), l'efficacité d'encapsulation des émulsions multiples est principalement dépendante des concentrations de PGPR (le seul émulsifiant hydrophobe). Le PGPR en quantité suffisante (> 8 %) résulte en une réduction de la coalescence globule / gouttelette, et par conséquent des EE plus élevées.

Su et al. (2006) ont reporté que l'efficacité d'encapsulation d'un *colorant polymérique* dans des émulsions multiples, dépend fortement de la concentration du PGPR, 6 – 8 % en PGPR ont été nécessaires pour produire des émulsions stables avec des EE d'encapsulation considérables, au-dessous de lesquelles les émulsions sont non stables avec de très faible EE. Cependant, le NaCN à la phase aqueuse interne agit en synergie avec le PGPR et permet de réduire sa concentration jusqu'à 2 % pour obtenir des émulsions stables.

Fichner et al., (2007) ont préparé des émulsions multiples avec du PGPR comme seul émulsifiant primaire, et le caseinate de sodium conjugué avec le dextran à l'interface externe. Pour ces auteurs, la concentration de PGPR est le facteur dominant affectant l'efficacité d'encapsulation et la libération de la vitamine B12 encapsulée dans l'émulsion multiple, soit quand le caseinate de sodium est utilisé comme seul émulsifiant hydrophile ou conjugué avec le dextran. L'efficacité d'encapsulation décroît avec le temps quand de faibles concentrations de PGPR sont utilisées même quand l'émulsifiant secondaire est conjugué.

Cependant, ceux-ci ont reporté que des concentrations élevées de PGPR ont une influence négative aux conditions acides et sous traitement thermique (chauffage), ou la coalescence est plus prononcée à haut niveau de PGPR (8%) comparé avec les émulsions obtenues avec 2 % PGPR, il a été suggéré que l'excès de PGPR qui n'est pas adsorbée à l'interface primaire, peut interférer avec l'émulsifiant hydrophile, le caseinate de sodium à pH 4.0 et peut favoriser la coalescence des globules huileux.

Il est à noter que de l'acide ascorbique reste une molécule difficile à encapsuler. En effet, Lutz et al., (2009), ont fabriqué des émulsions multiples stabilisées par un complexe électrostatique de pectine modifiée et d'isolats de protéines de lactosérum, et en dépit de la

stabilité importante face à la coalescence, l'efficacité d'encapsulation d'ascorbate de sodium était réduite pour des teneurs inférieures à 15 %, (qui a atteint 55 % après 07 jours pour ce cas), un crémage a été observé pour toutes les émulsions après 28 jours d'entreposage.

L'efficacité d'encapsulation relativement élevée dans notre cas peut être attribuée au caséinate de sodium ajouté à la phase interne, et au complexe biopolymérique qui contribue aussi à la stabilité au crémage.

III.4. Conclusion

Dans ce chapitre on a démontré que le complexe formé par le biais des interactions hydrophobes, entre le NaCN et le XTH, se trouve aussi performant pour stabiliser des émulsions multiples, que les complexes formés avec des conjuguâts ou les complexes électrostatiques reportés dans la littérature. Le complexe soluble caseinate de sodium – xanthane attribue aux émulsions multiples une excellente stabilité contre la coalescence des globules huileux, et leur offre des propriétés rhéologiques adéquates, empêchant le crémage et la floculation. De hautes efficacités d'encapsulation ont été obtenues avec ces émulsions multiples, suite à l'optimisation de leur composition, notamment aux interfaces internes des globules.

Les résultats obtenus suggèrent que le mécanisme impliqué dans la libération de la substance encapsulée est le transport par micelles inverses, sans rupture de film, ce qui permet d'envisager la conception de systèmes à libération contrôlée avec ces émulsions. Cependant, d'autres investigations doivent être conduites dans l'objectif d'illustrer les propriétés de ces émulsions multiples, à des conditions spécifiques telles que l'acidité et l'ajout de quelques substances influentes, afin de prédire le comportement des biopolymères à ces niveaux et de manipuler ces systèmes pour des visées prédéfinies.

Références

- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2002). Protein-Polysaccharide Interactions for Stabilization of Food Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23(1–3), 93–123. <http://doi.org/10.1080/01932690208984192>
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2007). W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 294(1–3), 20–32. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.07.056>
- Bonnet, M., Cansell, M., Berkaoui, A., Ropers, M. H., Anton, M., & Leal-Calderon, F. (2009). Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, 23, 92–101
- Fechner, A., Knoth, A., Scherze, I., & Muschiolik, G. (2007). Stability and release properties of double-emulsions stabilised by caseinate-dextran conjugates. *Food Hydrocolloids*, 21(5–6), 943–952. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.10.021>
- Garti, N., & Bisperink, C. (1997). Double emulsions : progress and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 3(6), 657–667. [http://doi.org/10.1016/S1359-0294\(98\)80096-4](http://doi.org/10.1016/S1359-0294(98)80096-4)
- Gülseren, I., & Corredig, M. (2012). Interactions at the interface between hydrophobic and hydrophilic emulsifiers: Polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and milk proteins, studied by drop shape tensiometry. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 193–198. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.03.010>
- Lutz, R., Aserin, A., Wicker, L., & Garti, N. (2009). Release of electrolytes from W/O/W double emulsions stabilized by a soluble complex of modified pectin and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1), 178–185. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.07.014>
- Lutz, R., Aserin, A., Wicker, L., & Garti, N. (2009). Double emulsions stabilized by a charged complex of modified pectin and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72(1), 121–127. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.03.024>
- Regan, J. O., & Mulvihill, D. M. (2010). Sodium caseinate – maltodextrin conjugate stabilized double emulsions : Encapsulation and stability. *Food Research International*, 43(1), 224–231. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.031>
- Su, J., Flanagan, J., Hemar, Y., & Singh, H. (2006). Synergistic effects of polyglycerol ester of polyricinoleic acid and sodium caseinate on the stabilisation of water-oil-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 20(2–3 SPEC. ISS.), 261–268. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.03.010>
- Tepsongkroh, B., Harnsilawat, T., Maisuthisakul, P., & Chantrapornchai, W. (2014). Influence of Polyglycerol Polyricinoleate and Biopolymers on Physical Properties and Encapsulation Efficiency of Water-in-Oil-in-Water Emulsions Containing Mango Seed Kernel Extract. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 36(8), 1126–1133. <http://doi.org/10.1080/01932691.2014.956116>

Chapitre IV

Effet du pH sur les propriétés et la stabilité des émulsions multiples stabilisées par le complexe soluble caséinate de sodium – xanthane

Résumé :

Cette partie de thèse se penche sur le pouvoir émulsifiant du complexe soluble protéine – polysaccharide, produit via des interactions hydrophobes, dans la stabilisation des émulsions multiples soumises à différentes conditions de pH. Ce complexe est constitué de caséinate de sodium (1%) et xanthane (0.5%) à 0.1 M du sel sodique NaCl. Les émulsions multiples montrent des comportements différents selon que l'ajustement de pH est réalisé sur les complexes eux-mêmes ou bien sur les émulsions. En effet, dans le premier cas, les émulsions multiples présentent une coalescence à pH très acide (pH 2), et une faible efficacité d'encapsulation au point isoélectrique de la protéine (4.6). Cependant, les émulsions multiples fabriquées avec un complexe préparé à pH neutre puis soumises aux différents pH, montrent une excellente stabilité en termes de taille des globules (coalescence) et d'efficacité d'encapsulation, pour tout l'intervalle de pH allant de 2 jusqu'à 8,5. Ce type de complexes s'avère plus prometteur, autant qu'émulsifiant, que les complexes électrostatiques qui ne sont efficaces que pour un intervalle de pH souvent très restreint.

IV.1. Introduction

La dénaturation de la protéine caseinate de sodium aux conditions de pH acides est bien connue. Cet effet conduit à la réduction de ses propriétés fonctionnelles aux interfaces des émulsions et cause leur déstabilisation (Huck-Iriart et al., 2011). D'autre part, les conditions de pH affectent les interactions protéine-polysaccharide en solutions (phases continues) et aux interfaces huileuses, conduisant à des comportements qui vont davantage compliquer la maîtrise de ces substances dans l'élaboration des systèmes recherchés.

La complexation des protéines avec des polysaccharides, peut contribuer à pallier ces contraintes, et améliorer la stabilité des émulsions. Ceci a été atteint avec des complexes de type conjuguat impliquant des liaisons covalentes ou des complexes électrostatiques (Evans et al., 2013 ; Bouyers et al.).

Plusieurs chercheurs ont employé ces deux types de complexes pour la stabilisation des émulsions multiples, ou simples, sous différentes conditions de pH. Ils ont reporté des comportements différents, selon l'ordre d'ajout du polysaccharide ainsi que de la méthode d'émulsification (Hernández-Marín et al., 2013 ; Perrechil et al., 2010 ; Benichou et al., 2007, etc.). De même, le type de la protéine (globulaire ou flexible) et du polysaccharide ont une

influence déterminante des propriétés des complexes résultants. La nature des complexes protéine – polysaccharide, qu'ils soient formés via des interactions électrostatiques ou bien par le biais des liaisons covalentes, est d'une importance majeure dans la détermination des propriétés fonctionnelles de ces complexes et des émulsions résultantes.

Plusieurs chercheurs ont réussi à obtenir des émulsions multiples relativement stables, avec des complexes *électrostatiques*, mais à des intervalles de pH très restreints. En effet, Benichou et al., (2007), ont utilisé des complexes électrostatiques d'isolat de protéines de lactosérum (WPI) et de xanthane, et ont reporté une efficacité de ces complexes, aux valeurs de pH acides ($\text{pH} \leq 3.5$), mais qui se dissocient aux valeurs de pH plus importantes (supérieures au point isoélectrique de la protéine), conduisant à la déstabilisation des émulsions et à libération de la substance encapsulée .

De même, un autre complexe électrostatique, constitué de caséinate de sodium et de pectine (Surh et al., 2006) a été utilisé pour stabiliser une émulsion simple, soumise à différents pH. La stabilité a été atteinte pour des valeurs de pH autour du pH_i de la protéine (point isoélectrique), aux autres valeurs de pH, la pectine se dissocie de la protéine déstabilisant ainsi l'émulsion.

Beaucoup d'autres travaux ont montré des résultats comparables : Hernández-Marín et al. 2013 (CMC et WPI), Lutz et al., 2009 (pectine et WPI), Zhao et al., 2015 (gomme de grain de lin et caséinate), Zinoviadou et al. 2012 (chitosan et caséinate), etc.

Par contre, des émulsions multiples préparées avec des complexes de type conjuguats ont montré une stabilité meilleure et une sensibilité moindre aux conditions de pH, tels que des conjuguats de caseinate de sodium et dextran (Fichner al., 2009), conjuguats de caséinate et de maltodextran (O'regan et al., 2010)...etc. Cependant, les procédés de préparation des conjuguats restent délicats, et peuvent générer des substances indésirables, engendrant des mécanismes méconnus (Oliveira et al., 2014).

Dans cette partie de travail, on tentera d'étudier l'impact de l'utilisation d'un autre type de complexes, produit par le biais des interactions hydrophobes - qui restent des interactions très faibles-, constitués de caseinate de sodium et de xanthane, dans des émulsions soumises à différentes conditions de pH.

L'objectif majeur de cette partie est donc d'investiguer le comportement du complexe NaCN-XTH (optimisé dans la première partie), en solution (phases continues), ainsi qu'à l'interface externe des globules huileux, à différentes conditions de pH. Pour ce faire, on étudiera les propriétés et la stabilité des émulsions multiples, dont la composition a été optimisée dans le chapitre précédent.

IV.2. Matériels et méthodes :

IV.2.1. Matériels :

Les mêmes matières premières utilisées dans le chapitre précédent ont servi pour la réalisation de cette partie de travail.

a. Préparation des émulsions multiples :

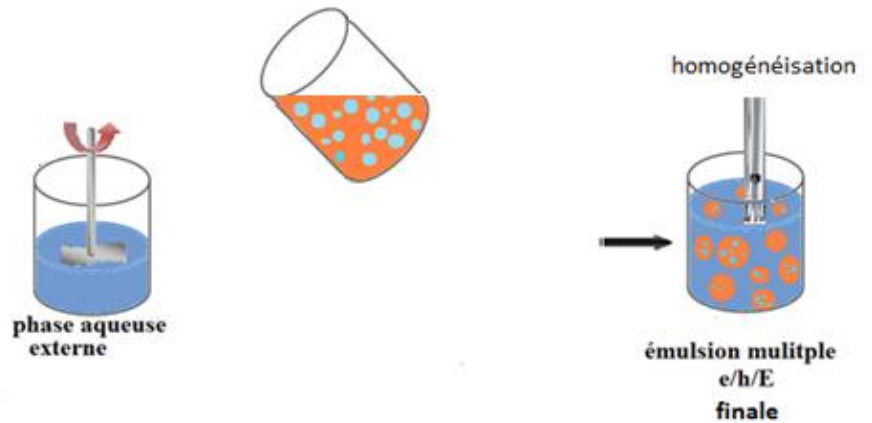
Les émulsions multiples ont été préparées par un procédé à deux étapes, en respectant la méthode mise au point dans l'étude précédente.

Dans une première série d'expériences, l'ajustement de pH – par ajout de solutions de NaOH et HCl à 0.1 M – a été réalisé avant la dernière étape d'homogénéisation, i.e. avant l'adsorption des biopolymères aux interfaces des globules huileux. Donc, les phases aqueuses externes ont été préparées, par mélanges des biopolymères dans les conditions optimales de formation de complexes solubles, puis ces dernières phases ont subi un ajustement de pH, à pH 2, 4, 4.6, 5, 7 et 8.5. Ces phases aqueuses à pH ajustés, ont servi de phases continues externes, dont lesquelles des émulsions primaires préalablement préparées ont été dispersées puis homogénéisées, pour obtenir à la fin des émulsions multiples.

La deuxième série d'expérience est consacrée à élucider comment les conditions de pH affectent les interactions NaCN – XTH aux interfaces des globules, en d'autres termes, l'effet du pH sur la stabilité et les propriétés des émulsions doubles produites finales. Pour cela, les émulsions doubles ont été préparées, une fois leur fabrication achevée, ces dernières ont subi un ajustement de pH à 2, 4, 4.6, 5, 7 et 8.5.

Série 01

ajustement de pH



Série 02

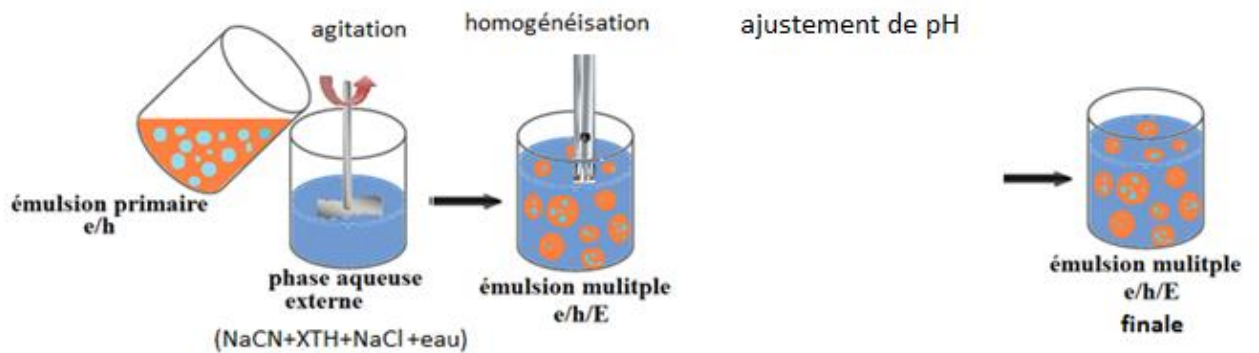


Figure Schéma représentatif des étapes d'ajustement de pH des émulsions multiples

b. Caractérisation

Pour les deux séries d'expériences, les émulsions doubles préparées ont subi les mêmes méthodes de caractérisation, employées dans le chapitre précédent : la taille des globules huileux, l'analyse microscopique ainsi que le suivi de l'efficacité d'encapsulation, juste après fabrication, et après un temps d'entreposage, afin de suivre leur stabilité.

IV.3. Résultats et discussions

IV.3.1. Observation microscopique

La figure IV.1. montre les micrographes des émulsions multiples stabilisées par le complexe NaCN – XTH, soumises aux différentes conditions de pH avant et après l'émulsification.

Les micrographes montrent des structures des émulsions multi-compartmentées, des émulsions multiples ont été obtenues à toutes les valeurs de pH, aucun signe de coalescence des gouttelettes internes n'a été détectée.

La coalescence (très accentuée) des globules huileux a été observée uniquement sur les émulsions préparées avec un mélange NaCN – XTH à pH=2 (au-dessous du point isoélectrique de la protéine, pHi). Le complexe formé à ce pH est fibreux et se précipite au fond du récipient, ce qui reflète sa très faible solubilité. Ces complexes insolubles sont caractérisés par des interactions attractives très fortes entre les molécules du polysaccharide et celles de la protéine, ce qui réduit la disponibilité de ces dernières aux interfaces des globules huileux et résulte en une augmentation de leurs tailles (Murray et al., 2011, Hernández-Marín et al., 2013).

Figure IV. 1. d. Micrographes des émulsions multiples finales soumises à différents pH après 90 jours d'entreposage.

En effet, la séparation de phase à pH=2 est évidente, l'aspect macroscopique de l'émulsion multiple à cette valeur de pH montre de gros globules agrégés baignant dans un liquide clair.

Figure IV. 2. Aspect macroscopique de l'émulsion multiple préparée avec le complexe à pH=2

D'autre part, une floculation des globules huileux a été observée pour des émulsions contenant des complexes préparés à $\text{pH} \leq 4$. Cette floculation apparaît aux valeurs acides de pH (pH au-dessous du pHi), et doit être attribuée à la perte de viscosité des phases aqueuses, constituées de complexes NaCN-XTH ayant une faible solubilité à ces valeurs de pH (Liu et al., 2012). Cette floculation n'apparaît que sous observation microscopique, et n'engendre pas de séparation de phase visuelle pendant 15 jours d'entreposage à température ambiante.

Après 90 jours d'entreposage, les émulsions multiples montrent le même profil, une coalescence prononcée aux conditions acides (pH=2), une floculation à pH au-dessous du pHi (pH=4), et des émulsions homogènes au pH au-dessus du pHi (pH 5, 7 et 8.5).

Cependant, pour les émulsions multiples préparées avec le complexe aux conditions neutres puis soumises aux différentes conditions de pH, aucune coalescence n'est apparue. Les micrographes montrent des structures des émulsions multi-compartmentées, des émulsions multiples ont été obtenues à toutes les valeurs de pH, aucun signe de coalescence des globules huileux n'a été détecté, y compris à faibles valeurs de pH, et ce malgré la floculation apparente à pH 4 et 4.6.

La réduction de la propriété tensioactive de complexe préparé à pH acide, associée à sa faible solubilité, n'est pas observée quand les émulsions multiples sont fabriquées avec un complexe au pH neutre, puis soumises au pH acide. On suppose que dans le deuxième cas le complexe

est adsorbé irréversiblement aux interfaces des globules huileux, de nouveaux sites (hydrophobes et ioniques) sont exposés aux phases huileuse et hydrophiles et conduisent à améliorer la stabilité de l'émulsion (Benichou et al., 2002).

La floculation (microscopique) des émulsions multiples au pH 4 et 4.6 peut être attribuée à la neutralisation de charge de la couche interfaciale à ce pH, ce qui supprime la répulsion électrostatique des complexes absorbés aux interfaces des globules.

IV.3.2. Granulométrie des globules huileux

L'analyse de la distribution de taille confirme les résultats précités. Le tableau III.1. montre de petites tailles de globules similaires pour toutes les émulsions multiples, à l'exception de celle produite avec le complexe biopolymérique à pH acide (pH 2), caractérisé par une grande taille de globules (D3,2), autour 60 μm , et une diminution importante de cette dernière après 90 jours d'entreposage à température ambiante, pour atteindre 20 μm . Ceci, comme ça était discuté plus haut, est dû au comportement du complexe sur le film interfaciale à cette valeur de pH.

Tableau IV.1. Distribution de taille des émulsions multiples soumises aux différents pH juste après fabrication et après trois mois d'entreposage

Etape d'ajustement du pH Ph	t_0	$t = 90 \text{ jours}$	t_0	$t = 90 \text{ jours}$
	Sur les phases aqueuses (complexe)		Sur les émulsions multiples	
2	61.61	20.81	6.64	6.53
4	5.16	3.89	6.69	4.26
4.6	7.73	5.05	4.44	4.46
5	4.29	3.95	4.53	5.05
7	3.73	3.87	3.73	3.87
8.5	4.22	4.11	4.58	4.31

Après 90 jours d'entreposage à température ambiante, à l'exception de l'émulsion multiple préparée après acidifications des phases aqueuses à pH 2, les diamètres moyens demeurent inchangés pour toutes les émulsions, y compris l'émulsion multiple soumise au pH 2.

IV.3.3. Efficacité d'encapsulation

Le tableau III.2. montre l'efficacité d'encapsulation (EE) de l'acide ascorbique dans les émulsions multiples en fonction du pH.

Tableau IV.2. Efficacité d'encapsulation de l'acide ascorbique dans les émulsions multiples juste après préparation, et après 08 jours d'entreposage à température ambiante

Etape d'ajustement du pH Ph	EE			
	Sur les phases aqueuses		Sur les émulsions multiples	
	t0	t=08 jours	t0	t=08 jours
2	99.09	99.047%	99.52	95.03
4	98.63	98.47 %	97.13	89.4
4.6	54 %	23.80 %	96.2 %	87.93
5	98.99%	97%	97.19%	92.21
7	99.3	92.38 %	99.3	92.38
8.5	97.05	93.714 %	97.13	89.83

Quand le pH est ajusté avant l'émulsification, i.e. sur les phases aqueuses (sur le complexe biopolymérique), étonnamment, la libération montre un profil inattendu, particulièrement à pH acide. La coalescence accentuée observée à pH 2, est accompagnée d'un très faible taux de libération d'acide ascorbique dans la phase aqueuse externe. On peut expliquer ceci par le fait que la structure du complexe NaCN – XTH est très compacte à l'interface des globules huileux, une fois absorbé, et suffisamment résistante pour empêcher le transport et le relargage de l'acide ascorbique.

En outre, aux valeurs de pH au voisinage pHi (4.6), une très grande quantité d'acide ascorbique encapsulée a été libérée dans la phase aqueuse externe. Il a été reporté par Kobori et al., (2009), qu'à ce pH, les molécules de caseinate de sodium sont agrégées, associées au xanthane et présentent une déposition intra-fibres. On suppose que cette structure relaxée pour laquelle les molécules de protéine sont moins compactes (moins disponibles à l'interface), ne permis pas de prévenir la libération d'acide ascorbique à l'interface externe. Il faut noter que, Kobori et al. (2009), ont étudié des systèmes NaCN et XTH exempts de sel, dans notre cas, le sel contribue à accentuer davantage les interactions attractives entre les molécules de la protéine (caseinate), ce qui diminue leur disponibilité à l'interface.

Aux valeurs de pH neutre, et basique (8.5), le complexe soluble NaCN – XTH peut facilement être adsorbé aux interfaces des globules et stabilise l'émulsion multiple, et par conséquence réduit la libération de l'acide ascorbique.

Cependant, l'EE est importante et de même amplitude, pour toutes les émulsions multiples, préparées avec un complexe à pH neutre puis soumises aux différentes conditions de pH. D'où on conclut l'intérêt de l'utilisation de ce complexe dans la stabilisation des émulsions multiples. Ce complexe, très influencé par le pH en solution, se trouve insensible une fois adsorbé aux interfaces des globules, et exhibe de très bonnes propriétés émulsifiantes, quel que soit le pH, et offre de très bonnes propriétés d'encapsulation aux émulsions.

IV.4. Conclusion

Cette étude a été consacrée à l'évaluation des propriétés fonctionnelles d'un complexe soluble de protéine et polysaccharide dans la stabilisation des émulsions multiples, à différentes conditions de pH. Ce complexe est constitué par l'association de caseinate de sodium et du xanthane via des interactions hydrophobes, en présence de sel (0.1M), et fabriqué par une simple agitation de ces constituants en solution aqueuse.

Ce complexe a joué un rôle de tensioactif puissant à l'interface des globules dispersés au sein des émulsions multiples, et ce en balayant un large intervalle de pH, allant de 2 jusqu'à 8.5. Les émulsions stabilisées par ce complexe sont restées stables, avec une bonne efficacité d'encapsulation, pour une longue durée quel que soit le pH.

Le pH affecte fortement les interactions de caseinate de sodium et xanthane en solution, cependant, une fois leur complexe est adsorbé aux interfaces des globules de l'émulsion, il devient insensible aux variations de pH, ses propriétés aux interfaces sont conservées à toutes les valeurs de pH, contrairement aux complexes électrostatiques -cités dans la littérature- qui, ne sont efficaces que pour un intervalle très étroit de pH, et qui se dissocient pour les autres valeurs.

L'apport de ce complexe dans la stabilisation des émulsions multiples est son potentiel pour la conception des systèmes à libération contrôlée, stables en milieux acides, basiques et neutres. Ces émulsions multiples peuvent constituer à la fois des systèmes multi-compartmentés et gastro-résistants, qui peuvent contenir plusieurs substances incompatibles ; des substances peuvent être présentes dans la phase externe et libérées juste après consommation au niveau

gastrique, et d'autres substances peuvent être encapsulées dans la phase interne et libérées au niveau intestinal.

Références

- Benichou, A., Aserin, A., Lutz, R., & Garti, N. (2007). Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity. *Food Hydrocolloids*, 21(3), 379–391. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.04.013>
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2002). Protein-Polysaccharide Interactions for Stabilization of Food Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23(1–3), 93–123. <http://doi.org/10.1080/01932690208984192>
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J. L., & Agnely, F. (2012). Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1–2), 359–378. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.052>
- Evans, M., Ratcliffe, I., & Williams, P. A. (2013). Emulsion stabilisation using polysaccharide – protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 272–282. <http://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.04.004>
- Fechner, A., Knoth, A., Scherze, I., & Muschiolik, G. (2007). Stability and release properties of double-emulsions stabilised by caseinate-dextran conjugates. *Food Hydrocolloids*, 21(5–6), 943–952. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.10.021>
- Hernández-Marín, N. Y., Lobato-Calleros, C., & Vernon-Carter, E. J. (2013). Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein-polysaccharide soluble complexes. *Journal of Food Engineering*, 119(2), 181–187. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.039>
- Huck-Iriart, C., Alvarez-Cerimedo, M. S., Candal, R. J., & Herrera, M. L. (2011). Structures and stability of lipid emulsions formulated with sodium caseinate. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 16(5), 412–420. <http://doi.org/10.1016/j.cocis.2011.06.003>
- Kobori, T., Matsumoto, A., & Sugiyama, S. (2009). pH-Dependent interaction between sodium caseinate and xanthan gum. *Carbohydrate Polymers*, 75(4), 719–723. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.008>
- Liu, L., Zhao, Q., Liu, T., Long, Z., Kong, J., & Zhao, M. (2012). Sodium caseinate / xanthan gum interactions in aqueous solution : Effect on protein adsorption at the oil - water interface. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 339–346. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.10.007>

- Lutz, R., Aserin, A., Wicker, L., & Garti, N. (2009). Double emulsions stabilized by a charged complex of modified pectin and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72(1), 121–127. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.03.024>
- Oliveira, F. C. De, Coimbra, J. S. D. R., de Oliveira, E. B., Zuñiga, A. D. G., & Rojas, E. E. G. (2014). Food Protein-Polysaccharide Conjugates obtained via the Maillard Reaction: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398(August), 37–41. <http://doi.org/10.1080/10408398.2012.755669>
- O'Regan, J., & Mulvihill, D. M. (2010). Sodium caseinate-maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability. *Food Research International*, 43(1), 224–231. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.031>
- Perrechil, F. A., & Cunha, R. L. (2010). Oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate: Influence of pH, high-pressure homogenization and locust bean gum addition. *Journal of Food Engineering*, 97(4), 441–448. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.10.041>
- Surh, J., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2006). Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 607–618. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.07.004>
- Zhao, Q., Long, Z., Kong, J., Liu, T., Sun-Waterhouse, D., & Zhao, M. (2015). Sodium caseinate/flaxseed gum interactions at oil-water interface: Effect on protein adsorption and functions in oil-in-water emulsion. *Food Hydrocolloids*, 43, 137–145. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.009>
- Zinoviadou, K. G., Scholten, E., Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2012). Properties of emulsions stabilised by sodium caseinate-chitosan complexes. *International Dairy Journal*, 26(1), 94–101. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.01.007>

Chapitre V

Evaluation in vitro de l'émulsion multiple comme système de la libération contrôlée de plusieurs substances incompatibles

Résumé :

Cette partie de thèse a été consacrée à l'examen de la potentialité de l'émulsion multiple comme système de libération contrôlée. En effet, l'émulsion multiple, optimisée dans les chapitres précédents, a servi de formule en pharmaco-nutrition immunomodulatrice pour une co-administration d'antioxydants : les vitamines A, E, C et le Sélénium.

La libération de ces substances a été étudiée in vitro, en conditions gastro-intestinales simulées. Ainsi, grâce à la structure multi-compartimentée de l'émulsion multiple, il était possible de séparer deux substances incompatibles, pour les libérer séparément. La libération du sélénium est immédiate, cependant, la relargage de la vitamine c, piégée dans la phase interne, est retardé. Ladite vitamine est libérée suite à la destruction des films interfaciaux de l'émulsion par les enzymes digestives. Ainsi, la réaction d'oxydo-réduction de ces deux substances, néfaste à la biodisponibilité du sélénium, est évitée.

V.1. Introduction

La pharmaco-nutrition en réanimation constitue une arme thérapeutique à part entière pour les patients post-agressés (chirurgicaux, polytraumatisés, brûlés ou septiques). Les antioxydants sont parmi les pharmaco-nutriments qui ont un effet crucial dans la modulation des processus inflammatoire et immunologique. Ils permettent par conséquent la réduction des complications notamment infectieuses et de défaillance d'organes, et donc la mortalité.

Parmi les substances antioxydantes qui ont prouvé leur efficacité pour ces visées, des vitamines telles que la vitamine A, C et E, et des minéraux (oligo-éléments) tels que le sélénium (Se). Leur association conduit à une bonne synergie de leurs effets bénéfiques. Cependant, l'administration simultanée de ces substances dans le même système relève quelques challenges.

En effet, les vitamines A et E sont, contrairement à la vitamine C et le sélénium, des substances liquides lipophiles. L'acide ascorbique (la vitamine C) et le sélénium (sous forme de sel sélénite de sodium) sont deux substances chimiquement incompatibles. L'acide ascorbique, en solution aqueuse, réduit le Se en forme élémentaire insoluble et non biodisponible.

Pour pallier à ce problème, l'emploi du Se sous forme organique, issu d'une levure (Sé-méthionine) s'avère efficace. Cette forme administrée dans des préparations sèches, telles que les comprimés et les gélules, accroît la biodisponibilité du Se en présence de Vit C. Cependant, cette forme de Se, n'est pas approprié dans les préparations liquides, préconisées en réanimation [Coëffier et al., 2009]. En outre, son élimination de l'organisme humain est plus lente, ce qui augmente le risque de toxicité [Gammelgaard et al., 2012].

Il serait donc intéressant de les administrer dans un système approprié.

Les émulsions multiples sont parmi les systèmes de délivrances liquides (ou semi-liquides), qui, par leur structure multi-compartmentée, offrent des avantages intéressants. Ainsi, elles permettent l'encapsulation de plusieurs types de substances. Les entités lipophiles peuvent être dissoutes dans la phase huileuse intermédiaire. Quant aux substances hydrophiles incompatibles, elles peuvent être administrées séparément dans les phases aqueuses interne et externe.

Dans cette partie de thèse, on s'intéressera à l'emploi de l'émulsion multiple, optimisée dans les chapitres précédents, pour la délivrance simultanée des substances précitées. Dans la phase aqueuse interne, est encapsulée la vitamine C, en vue de sa protection d'une éventuelle oxydation. Le sélénium est administré dans la phase aqueuse externe, pour éviter son contact avec la vitamine C. La phase intermédiaire huileuse contient les vitamines E et A lipophiles. L'objectif est donc d'étudier le relargage de ces substances dans le tractus gastro-intestinal simulé, en d'autres termes, l'examen de l'efficacité de l'émulsion multiple en tant que système de libération contrôlée.

V.2. Matériels et méthodes

V.2.1. Matériels

Les matières premières utilisées sont identiques aux chapitres précédents, le sélénite de sodium et les réactifs pour analyse sont de grade analytique et achetés de Sigma-Aldrich, Algérie.

V.2.2. Méthodes

a. Préparation des émulsions multiples

Les émulsions multiples sont préparées en suivant le protocole décrit dans le chapitre II. La vitamine A et E sont dissoutes dans la phase huileuse à des concentrations de 25000 UI/100 ml et 2000 mg/ 100 ml respectivement.

L'ascorbate de sodium (vitamine C) a été incorporée dans la phase aqueuse interne à une concentration de 2 %, et le sélénite de sodium a été ajouté à la phase externe à 300 µg.

Pour l'étude de la cinétique de libération, la concentration du sélénium a été multipliée par 10, afin de pouvoir détecter les plus faibles quantités, lors du dosage par UV. Le Se a été utilisé comme traceur afin de suivre le relargage de l'ascorbate de sodium. Il est à noter que la quantité très faible de sélénite de sodium ajoutée en phase externe, n'affecte pas la qualité et la stabilité de l'émulsion multiple (effet osmotique).

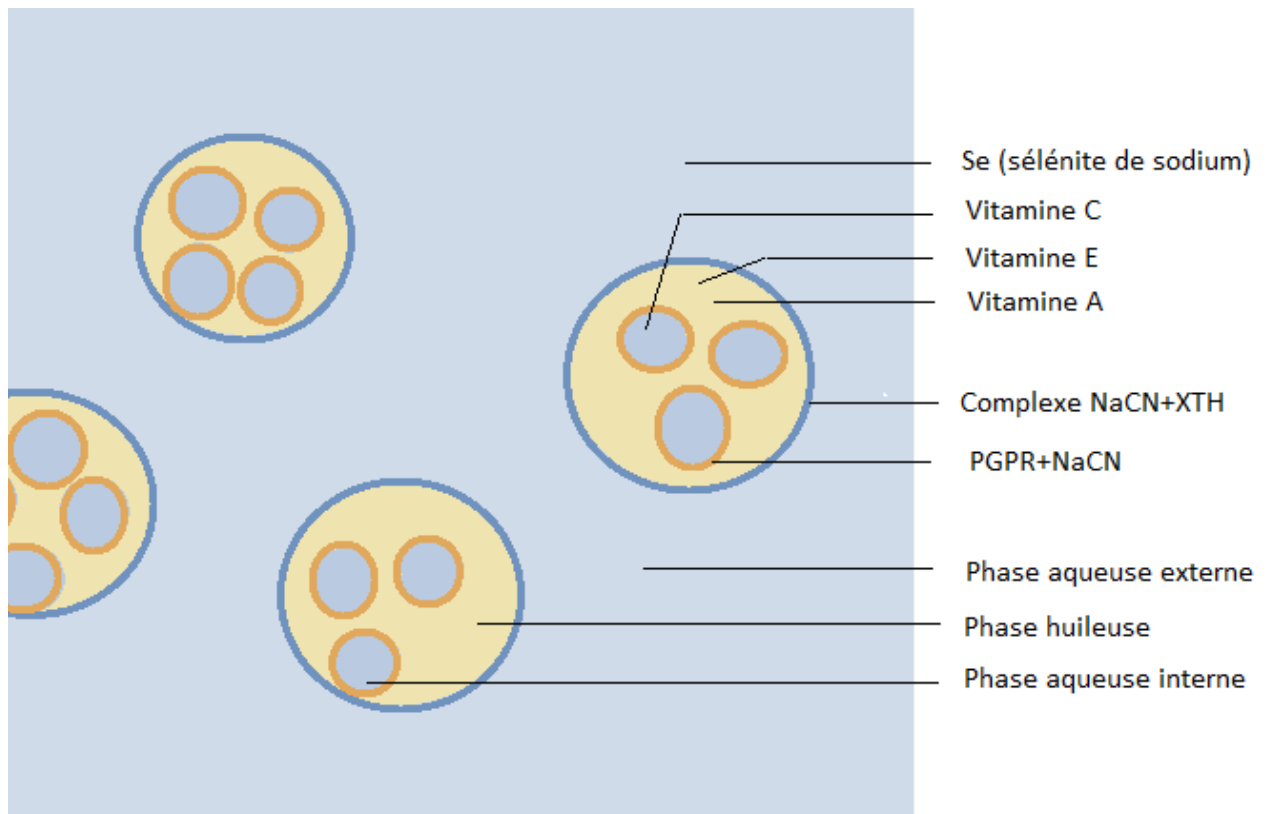


Figure : Schéma représentatif de la composition de l'émulsion multiple

b. Etude de libération In vitro de l'ascorbate de sodium

Le fluide gastrique simulé (FGS) contient 34 mM NaCl est préparé par ajout de 2 gr de NaCl et 7 ml d'une solution de HCl à 1 M. Après ajustement de pH à 2 par une solution de HCl à 0.1 M et le volume final a été ajusté à 1L, la pepsine a été ajoutée dans une proportion de 3.2 mg/ml .

Le fluide intestinal simulé est (FIS) est constitué de : K_2HPO_4 (39 mM), NaCl (30 mM) et $CaCl_2$ (30 mM) et le NaOH pour ajuster le pH à 7.5, les extraits biliaries à 5 mg/ml, et la pancréatine (1.6 mg/ml).

Digestion in vitro de l'émulsion multiple

L'étude de la digestion a été réalisée dans un appareil de dissolution Pharmatest® à palettes (dissolutest type 2), à 100 tr/min et à 37 °C.

- **Simulation de la digestion gastrique**

La première étape de la digestion consiste à soumettre l'émulsion sous des conditions simulant la digestion gastriques, par ajout de 10 ml de l'émulsion multiple au 100 ml de FGS. Le mélange a été incubé dans le vase du dissolutest pendant 30 min à 37 ° C.

Des prélèvements de 1 ml ont été effectués à plusieurs intervalles de temps (15 min, 30 min, 1 h et 2 h).

- **Simulation de la digestion intestinale**

Après la digestion gastrique, le pH du digesta est ajusté à 7.5 par ajout de phosphate de sodium monobasique (0.68 g) et d'une solution de NaOH (0.1M). Ensuite, le FIS a été ajouté afin de simuler les conditions intestinales. L'étude de la dissolution a été suivie pendant 4 h.

Des prélèvements pour analyse ont été effectués après 15 min, puis tous les 30 min.

c. Détermination de la quantité d'ascorbate de sodium libéré :

La vitamine C, (et sa forme d'ascorbate de sodium, AS), en contact avec le sélénite de sodium (incolore), le réduit en sélénium élémentaire (Se^0) de couleur rouge brique. Ainsi, la quantité du sélénium réduit, qui correspond à une quantité d'AS libérée, est dosée par spectrophotométrie UV-Visible à une longueur d'onde de 460 nm (Mess et al., 1995 ; Pornwillard et al., 2014).

Dosage du sélénium réduit :

Pour déterminer la quantité du sélénium réduit, exprimé en termes d'absorbance à 460 nm, une quantité 1 ml du digesta est prélevée, mélangée avec l'acide chlorhydrique (0.1 M) puis centrifugée à 4500 tr/min pendant 15 min. Cette étape préalable vise à éviter toute interférence avec les enzymes des sucs gastro-intestinaux, les globules de l'émulsion et les biopolymères. Les solutions ont été ensuite filtrées en utilisant des filtres Millipores® de 22 µm, puis une mesure d'absorbance à 460 nm a été réalisée.

La courbes d'étalonnage a été préalablement établie, en mesurant l'absorbance de sélénite de sodium réduit en fonction de la concentration de l'ascorbate de sodium réagit.

V. 3. Résultats et discussion

L'efficacité de l'émulsion multiple pour la libération contrôlée de substances a été évaluée en étudiant la cinétique de libération des substances encapsulées.

La figure V.1. montre la cinétique de libération de l'ascorbate de sodium suite à la dégradation de l'émulsion multiple.

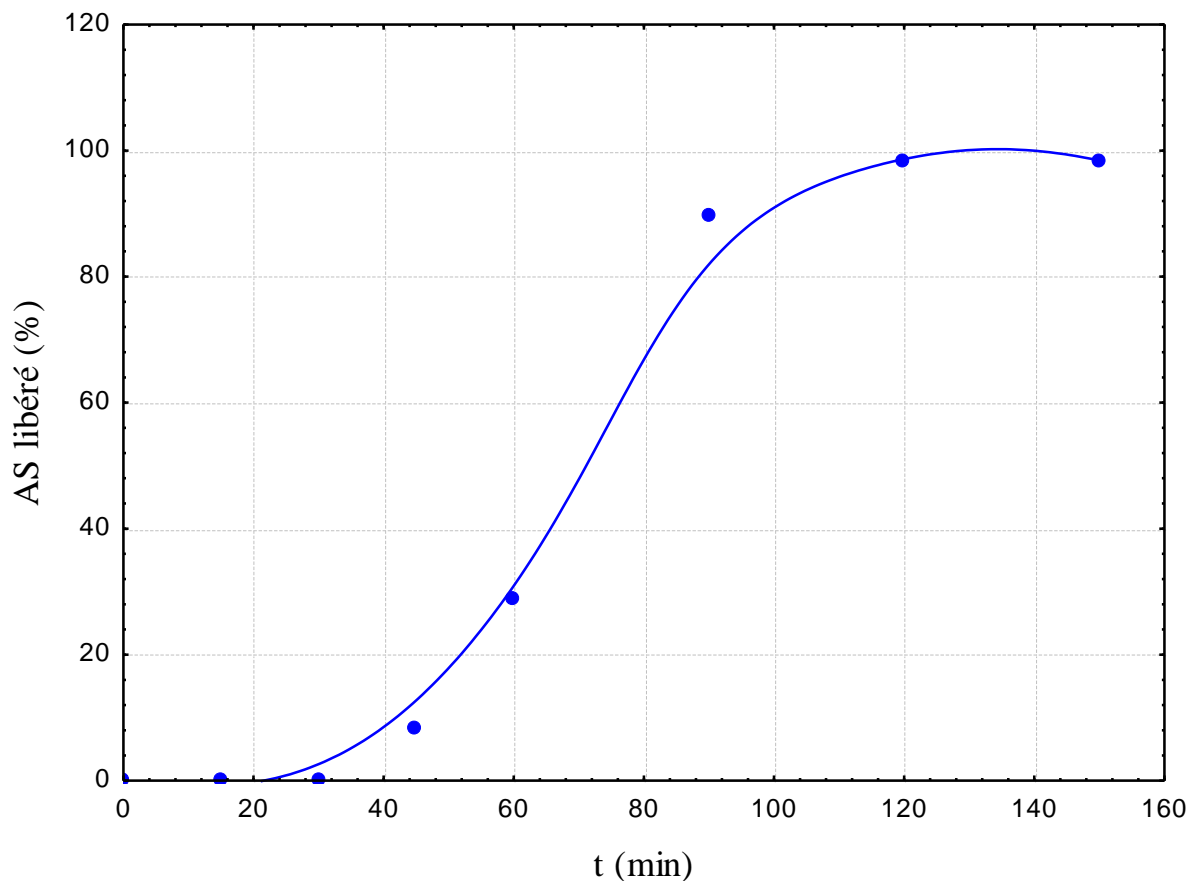


Figure V.1. Profil de libération in vitro de l'ascorbate de sodium de l'émulsion multiple

Deux comportements distincts caractérisent la libération de l'AS :

- La phase gastrique : la libération gastrique est quasiment nulle, l'AS reste piégé dans la phase aqueuse interne. L'émulsion multiple se comporte comme un système gastro-résistant qui permet de protéger la substance encapsulée (AS).
- La phase intestinale : caractérisée par un relargage progressif de la substance encapsulée, l'ascorbate de sodium, la valeur maximale est atteinte après 90 min de digestion intestinale simulée. La libération de l'ascorbate de sodium se fait suite à la

dégradation de l'émulsion multiple, sous l'action des enzymes pancréatiques. Les protéases (notamment la trypsine) agissent sur l'interface biopolymérique (complexe NaCN-XTH) par hydrolyse de la protéine, la lipase dégrade la phase huileuse, ce qui engendre le relargage de l'AS encapsulée dans la phase aqueuse interne de l'émulsion.

Il a été prouvé dans plusieurs études que l'absorption de sélénium (sous sa forme de sélénite) s'effectue dans les minutes qui suivent son passage au niveau de l'intestin grêle, dans le premier segment, le duodénum, exigeant des conditions relativement acides (Kato et al., 1992). Par contre, l'absorption de la vitamine C, se fait au niveau de l'iléon ; dernier segment de l'intestin grêle.

Donc in vivo, la réduction du sélénite par l'AS ne peut pas avoir lieu, du moment qu'il est absorbé avant la dégradation de l'émulsion multiple et la libération du AS. En outre, il est à noter que la dégradation enzymatique de la phase huileuse, engendre systématiquement la libération des vitamines lipophiles.

V.4. Conclusion

L'émulsion multiple, optimisée dans les chapitres précédents, a servi de formule en pharmaco-nutrition immunomodulatrice pour une co-administration d'antioxydants : les vitamines A, E, C et le Sélénium. Sa structure multi-compartimentée permet de séparer les substances incompatibles, la vitamine C piégée dans la phase interne et le sélénium dans la phase externe.

Au film interfacial, constitué de complexe caséinate de sodium-xanthane, s'attribue une propriété de gastro-résistance, qui a permis contrôler la libération de la vitamine C. Ainsi, le relargage retardé de la vitamine C, permet de protéger le sélénium d'une réaction réductrice. Ceci a été confirmé par l'étude de la cinétique de libération in vitro, en présences d'enzymes gastro-intestinaux.

En outre, la phase huileuse intermédiaire constitue un bon véhicule pour les vitamines liposolubles.

Enfin, l'émulsion multiple, par sa composition : une protéine, une phase huileuse et un polysaccharide, contribue à la constitution d'une base nutritive, renforçant les visées thérapeutiques recherchées.

Références

Coëffier M., Tamion F., Déchelotte P., (2009) Quel pharmanutrimement choisir en réanimation ? *Revue générale. Nutrition Clinique et Métabolisme* 23, 226–234.

Gammelgaard B., Rasmussen L.H., Gabel-Jensen C., Steffansen B. (2012) Estimating intestinal absorption of inorganic and organic selenium compounds by in vitro flux and biotransformation studies in Caco-2 cells and ICP-MS detection. *Biological Trace Element Res.* 145(2):248-56.

Kato T, Read R, Rozga J, Burk RF. (1992) Evidence for intestinal release of absorbed selenium in a form with high hepatic extraction. *American Journal of Physiology.* 262(5 Pt 1): G854-8.

Mees D.R., Physto W., Tarcha. P.J. (1995). Formation of selenium colloids using sodium ascorbate as reducing agent. *Journal of colloid and interface science* 170, 254 – 260.

Nitenberg G., Blot F., de Lassence A., Gachot B. (1996) Nutrition entérale à visée immunomodulatrice en situation d'agression aiguë. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 10, 107-123.

Nitenberg G., Antoun S., Raynard B. (1998) Complications spécifiques de l'agression : bases pour une assistance nutritionnelle appropriée. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 12 (Suppl 1): 93-103.

Pornwillard M-m , Somchue W, Shiowatana J, Siripinyanond A. (2014) Flow field- flow fractionation for particle size characterization of selenium nanoparticles incubated in gastrointestinal conditions. *Food Research International* 57, 203–209.

Conclusion générale

Ce travail de thèse s'est attaché à étudier les potentialités de combiner le caséinate de sodium (une protéine de lait) au xanthane (polysaccharide) pour la formulation et la stabilisation d'émulsions multiples pour une application en pharmaco-nutrition.

La première partie a été consacrée à l'étude des combinaisons de caséinate de sodium et de xanthane en solution en présence du sel sodique. L'étude rhéologique a permis la détermination des domaines expérimentaux permettant l'obtention de gels. Ceci est conditionné par de faibles concentrations de protéine évitant ainsi la prévalence des incompatibilités d'origine thermodynamique menant à une séparation de phases ségrégative, souvent associées à ces macromolécules négativement chargées au pH neutre. Le xanthane quant à lui, il améliore les attributs rhéologiques par son effet viscosifiant. Le sel est de loin l'élément déterminant les états structuraux qui peuvent s'établir en présence de ces deux entités. Il accentue l'incompatibilité thermodynamique à des teneurs relativement élevées des deux biopolymères, qui se traduit par une perte de texture. Par contre, aux conditions favorables, c.à.d. aux teneurs en caséinate ne dépassant pas 5.5 % (p/p), le sel contribue à la formation des complexes solubles au sein des gels. Ces derniers ont été mis en évidence par la technique de FTIR, ainsi que leur nature chimique. En effet, ces complexes se forment par la mise en jeu des interactions hydrophobes entre les molécules de caséinate et de xanthane négativement chargées au pH neutre. En outre, par la technique de DLS nous avons prouvé la réversibilité de ces complexes, qui se trouvent dissociés par dilution. Un constat important à prendre en compte lors de leur utilisation pour la fabrication des émulsions.

Dans une seconde partie, la formulation des émulsions multiples a été entreprise en utilisant le complexe soluble NaCN-XTH comme tensioactif de l'interface externe. Les paramètres de formulation ont été optimisés dans un objectif de façonner la microstructure et de maintenir la stabilité des émulsions multiples le plus longtemps possible. La cinétique de relargage de la vitamine C, utilisée comme traceur, a permis de déceler les mécanismes impliqués dans le processus de destruction.

Il s'est avéré que le complexe biopolymérique préserve l'intégrité de l'interface externe des globules de l'émulsion multiple indépendamment des autres paramètres. De ce fait la coalescence des globules huileux a été évitée. Par contre, une migration du tensioactif interne, le PGPR, de l'interface interne vers l'interface externe, a été rencontrée pour des teneurs

relativement élevées de ce dernier. Ce processus a été inhibé par addition de caséinate de sodium à l'interface interne. La vitamine C, le traceur, reste piégée dans la phase interne de l'émulsion, dans ces conditions.

La troisième partie a été dédiée à l'étude de l'influence du pH sur le comportement du complexe biopolymérique à l'interface des globules des émulsions multiple. L'émulsion multiple, stabilisé par un complexe de caséinate-xanthane, soumise à différents pH, demeure stable, du point de vue morphologique, quel que soit la valeur du pH. Cependant, pour des complexes préparés au pH approchant le point iso-électrique de la protéine, l'émulsion montre une libération non désirable de l'actif encapsulée. Cet état est évité quand l'ajustement du pH est réalisé sur l'émulsion finale mais pas sur le complexe. On conclut donc que le complexe caséinate-xanthane, une fois adsorbé sur la surface de globule, devient insensible aux conditions environnementales, pour un large intervalle de pH allant de 2 à 8.5 %. L'émulsion multiple dans ces cas, conserve son intégrité et son pouvoir d'encapsulation.

Cette propriété a été exploitée pour une formulation gastro-résistante, qui a fait l'objet de la dernière partie de cette thèse. Une application en pharmaco-nutrition immuno-modulatrice a permis d'exploiter le potentiel de l'émulsion multiple pour une libération contrôlée de substances incompatibles, séparées dans les deux compartiments aqueux interne et externe de l'émulsion multiple. Ainsi, la libération de la vitamine C, piégée dans la phase interne, a été retardée pour qu'elle soit envisagée au niveau intestinal. Contrairement au sélénium, présent dans la phase externe de l'émulsion multiple dont la libération est immédiate au niveau gastrique simulé. De ce fait la réduction de ce dernier par la vitamine C a été empêchée. Ce système permet aussi la co-administration des vitamines A et E, liposolubles, dans la phase intermédiaire huileuse.

Les complexes solubles formés par la protéine de lait, caséinate de sodium, et le xanthane, le polysaccharide, en impliquant des interactions aussi faibles que des interactions hydrophobes, ont permis la conception des systèmes complexes telles que les émulsions multiples et de maintenir leur stabilité face à des conditions de pH agressives, et ont montré une efficacité comparable voire supérieure aux complexes covalents et électrostatiques d'usage courant.