



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE

LIBio
Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules

RP2E

**Faculté des
sciences**

USJ 1875

THÈSE

Présentée à l'Université de Lorraine

Par

Aya N.KHANJI

En vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Et

Docteur de l'Université Saint-Joseph

Spécialité : Chimie

Stabilisation de la curcumine par la micelle de caséine: approches structurale et technofonctionnelle.

Université de Lorraine

École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

École Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement

Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules

Soutenue le 28 septembre 2017 devant la commission d'examen

Membres du jury

Mme Sylvie MARCHESSEAU, Professeur, Université de Montpellier	Rapporteur
M. Yves WACHE, Professeur, Université de Bourgogne, Dijon	Rapporteur
M. Florentin MICHAUX, Maitre de conférences, Université de Lorraine	Examineur
M. Richard MAROUN, Professeur, Université Saint-Joseph, Liban	Examineur
Mme Sylvie BANON-DESOBRY, Professeur, Université de Lorraine	Directrice
M. Toufic RIZK, Professeur, Université Saint-Joseph, Liban	Directeur
M. Jordane JASNIEWSKI, Maitre de conférences, Université de Lorraine	Co-directeur
M. Dominique SALAMEH, Maitre de conférences HDR, Université Saint-Joseph, Liban	Co-directeur
Mme Zeina HOBAIKA, Maitre de conférences, Université Saint-Joseph, Liban	Invitée

Remerciements

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio) à l'Université de Lorraine, France en cotutelle avec l'unité de recherche - technologies et valorisation alimentaire (UR-TVA) à l'Université Saint-Joseph, Liban.

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail. Je remercie particulièrement les Professeurs Sylvie Marchesseau et Yves Waché pour avoir accepté d'analyser ce travail en tant que rapporteurs ainsi que l'ensemble des examinateurs : Professeur Richard Maroun et Docteur Zeina Hobaika (MCF).

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, Sylvie Banon-Desobry, pour avoir accepté de diriger ce travail et pour toute la confiance qu'elle m'a accordée. Merci d'avoir cru en moi ! J'espère avoir été à la hauteur de tes attentes !

Je remercie mes directeurs et co-directeur de thèse au Liban, Toufic Rizk et Dominique Salameh pour leur soutien continu en dépit de la distance.

J'exprime toute ma reconnaissance à mon co-directeur de thèse, Jordane Jasniewski, pour avoir toujours été très présent à mes côtés, pour ses conseils et sa bonne humeur quotidienne. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi ! Merci JJ d'avoir cru en moi et d'avoir été toujours à l'écoute !

Je tiens à remercier Florentin Michaux, mon « deuxième » co-directeur, mon encadrant sans qui ce travail n'aurais jamais vu le jour. Merci Flo pour tout le soutien que tu m'as donné et tous ses conseils pour « voler plus haut ». Merci pour toutes ces pauses-café, ces fous rires et tous ces moments partagés.

Merci au Professeur Michel Linder pour m'avoir accueilli dans son laboratoire ! Les maquereaux et les sardines auront particulièrement leur place dans mon alimentation !

Merci aux Professeurs Anne-Marie Révol et Claire Gaiani pour tous leurs conseils et instructions qui ont participé à ma maturation scientifique.

Merci à Jeremy Petit pour ses conseils. Merci d'avoir fait appel aux esprits dans les forêts du Cameroun ou plutôt avoir fait une offrande aux anciens pour notre réussite !

Merci à Cécile pour ces moments de pause-café partagés.

Merci à Fred, pour tous ces beaux concerts !! J'attends toujours les nouvelles musiques ! Helium
Balloons rock !

Une pensée amicale à ma belle Delphine ! C'est grâce à toi que j'ai atterri au LIBio... Merci !

Merci à Aurélie Chapé pour sa patience et son aide !

Merci à Aurélie et Blandine pour leur aide technique et les nombreux beaux moments partagés dont la semestrielle de cette année !

Merci également à l'équipe de microbiologie (Myriam, Sylvie, Marine et Camille) pour leur aide et les nombreux moments d'échange. Une pensée à Arnaud, ancien technicien en microbiologie, pour tout son aide et sa bonne humeur.

Je remercie également les techniciennes du LIBio sans qui le quotidien ne serait pas pareil surtout Carole Perroud pour tous ces moments de « crazy singing » au bureau !

J'ai une pensée amicale pour l'ensemble des stagiaires et doctorants passés ou présents.

Merci en particulier à Jennifer, Magda, Justine, Céleste, Yoana, Marie, Joanna et Loic ce fut un réel plaisir d'être assise avec vous chaque jour. Ce manuscrit tout entier ne serait pas suffisant pour raconter toutes les anecdotes que je n'oublierai jamais.

Merci à Edgard, merci pour ta patience et ton soutien constant. Merci d'avoir été là tout simplement.

A mon oncle Ihab, ma tante Lanloun et ma belle cousine Dandoun, je vous remercie du fond du cœur d'avoir cru en moi. Merci de m'avoir appris à être patiente. Je vous aime.

A mes très chers parents, à mon frère que j'aime plus que tout, tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous

ce que vous avez fait pour moi. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi.

Mamina, merci d'avoir été la lumière qui m'a montré le chemin. Mon papa chéri, voilà, j'y suis, j'espère que tu seras fière de moi.

Table de matières

Liste des figures hors publication

Liste des tableaux hors publication

Liste des abréviations

Introduction générale.....	1
1. Introduction.....	5
2. Les bioactifs.....	7
2.1. Les bioactifs hydrophobes.....	12
2.1.1. Les polyphénols.....	12
2.1.2. Les flavonoïdes.....	12
2.1.3. Les non flavonoïdes.....	16
2.1.4. Les acides gras polyinsaturés.....	21
2.1.5. Les vitamines liposolubles.....	22
2.2. Les bioactifs hydrophiles.....	26
2.2.1. Les anthocyanes.....	26
2.2.2. Les vitamines hydrosolubles.....	27
2.3. Les probiotiques.....	30
3. L'encapsulation : Définition et matrices.....	31
3.1. Définition.....	31
3.2. Les matrices d'encapsulation.....	33
3.2.1. Les matrices d'origine non laitière.....	33
3.2.2. Les matrices laitières.....	53
4. La micelle de caséine.....	72
4.1. Composition, taille et forme.....	72
4.2. Techniques permettant l'étude de la structure micellaire.....	73
4.2.1. La microscopie électronique à transmission.....	73
4.2.2. Diffusion de rayonnements aux petits angles.....	74
4.3. Les modèles de structure de la micelle de caséine.....	80
4.3.1. Les modèles cœur-enveloppe.....	80
4.3.2. Le modèle à sous-unités.....	81
4.3.3. Modèle à dualité de lien (dual bonding model).....	83
4.3.4. Modèle des nanoclusters.....	85
4.3.5. Le modèle poreux.....	88
4.4. La micelle de caséine : vecteur de biomolécules.....	94
4.4.1. Propriétés de surface et d'auto-assemblage.....	94

4.4.2.	Propriétés d'interaction avec d'autres molécules.....	95
4.4.3.	Propriétés de protection	95
4.4.4.	Propriétés de relargage contrôlé.....	96
4.4.5.	Propriétés d'interaction avec des polymères.....	96
4.4.6.	Propriétés technofonctionnelles : la gélification.....	97
5.	Contexte de l'étude	99
Chapitre II : Matériels et Méthodes		103
1.	Matériels.....	103
1.1.	Les poudres laitières.....	103
1.2.	Solutions et Réactifs	103
1.3.	Bactéries lactiques.....	103
2.	Préparation des solutions.....	104
2.1.	Préparation du tampon phosphate	104
2.2.	Préparation des suspensions de caséines micellaires	104
2.3.	Préparation des solutions de curcumine.....	104
2.4.	Conditions de culture bactérienne.....	104
3.	Méthodes	105
3.1.	MATS (Microbial Adhesion To Solvents)	105
3.1.1.	Principe.....	105
3.1.2.	Protocole	106
3.2.	L'atomisation ou spray-drying.....	106
3.2.1.	Principe.....	106
3.2.2.	Protocole expérimental.....	108
3.3.	Caractérisation des poudres produites par atomisation.....	109
3.3.1.	Dosage de l'eau	109
3.3.2.	La solubilité.....	109
3.3.3.	La mouillabilité	109
3.3.4.	La dispersibilité.....	110
3.3.5.	Evaluation de la couleur des poudres	110
3.3.6.	Etude de la morphologie des poudres par ESEM (ou MEB)	111
3.3.7.	Evaluation des propriétés hygroscopiques	112
3.3.8.	Extraction de la curcumine encapsulée dans les poudres de caséines micellaires....	113
3.3.9.	Dosages.....	113
3.4.	La spectrofluorimétrie ou spectroscopie de fluorescence.....	118
3.4.1.	Protocole de l'étude des interactions caséines micellaires-curcumine	118
3.4.2.	Protocole de l'étude des interactions caséines micellaires-curcumine-bactéries	120

3.5.	La microcopie à épifluorescence	121
3.6.	Les méthodes physicochimiques	121
3.6.1.	Mesure de taille par diffusion dynamique de la lumière (DLS)	121
3.6.2.	Mesure de mobilité électrophorétique	123
3.6.3.	Détermination de la taille des particules par granulométrie laser (voie sèche et humide).....	123
3.6.4.	Diffusion des rayons X aux petits angles ou Small Angle X-ray Scattering (SAXS).....	124
3.6.5.	Diffusion multiple de la lumière	126
3.6.6.	Etude des propriétés rhéologiques	127
Chapitre III : Résultats et discussions		129
Publication 1 : L'étude des interactions entre les micelles de caséines et curcumine et l'évaluation de l'ajout du bioactif sur la structure et les propriétés technofonctionnelles de la micelle.		129
1.	Introduction.....	129
2.	Article: Structure and gelation properties of casein micelles doped with curcumin under acidic conditions	131
3.	Contribution de l'article	157
Publication 2 : L'étude des interactions de la curcumine avec les caséines micellaires et l'enveloppe cellulaire des bactéries lactiques et l'évaluation de l'effet de son ajout sur la formation de gel de type yaourt.		160
1.	Introduction.....	160
2.	Article: The study of curcumin interaction with micellar casein and lactic acid bacteria cell envelope	163
3.	Contribution de l'article	190
Publication 3: La production d'une poudre de micelles de caséines dopées en curcumine par atomisation : approches structurales et fonctionnelles.....		192
1.	Introduction.....	192
2.	Article: Structure, gelation, and antioxidant properties of curcumin-doped casein micelle powder produced by spray-drying.....	195
3.	Contribution de l'article	222
Conclusion générale et perspectives.....		223
Références bibliographiques		231
Annexes		285

Liste des figures hors publication

Figure 1. Evolution de la valeur ajoutée de l'aliment au fil des années.....	5
Figure 2. Structure de base des flavonoïdes.	13
Figure 3. Structures des différentes classes de flavonoïdes	14
Figure 4. Structures chimiques des catéchines et de leurs épimère.....	15
Figure 5. Structure chimique de la quercétine	15
Figure 6. Structure chimique de la curcumine	16
Figure 7. Les différentes voies de dégradation de la curcumine : (a) réduction (b) conjugaison (c) oxydation (d) clivage	17
Figure 8. Les différents produits de dégradation et d'autoxydation de la curcumine dans un milieu alcalin	18
Figure 9. Structure chimique du trans-resvératrol	18
Figure 10. Epimérisation du trans-resvératrol en cis-resvératrol	19
Figure 11. Structure chimique du lycopène	19
Figure 12. Les différentes voies et produits de dégradation du lycopène	20
Figure 13. Structure chimique de de la lutéine	20
Figure 14. Les différentes voies de dégradation de la lutéine lors de son extraction.....	21
Figure 15. Peroxydation de l'acide linoléique : zoom sur le carbone en position 11	22
Figure 16. Structure chimique du β -carotène	23
Figure 17. Les différentes voies d'oxydation du β -carotène	23
Figure 18. Les différents mécanismes d'oxydation des caroténoïdes tels que le β -carotène, la lutéine et le lycopène	24
Figure 19. Structure chimique de l' α -tocophérol	25
Figure 20. Structures chimiques des vitamines D ₂ et D ₃	25
Figure 21. Structure chimique d'un anthocyane	26
Figure 22. La dégradation d'un anthocyane à pH = 3,5	27
Figure 23. Structure chimique de l'acide L-ascorbique	28
Figure 24. L'oxydation de l'acide ascorbique et ses dérivés de dégradation	29
Figure 25. Structure chimique de l'acide caféique	29
Figure 26. Structure chimique de l'acide chlorogénique	30
Figure 27. Les trois générations de liposomes. A. Première génération. B. Deuxième génération pour un ciblage passif. C. Troisième génération avec des ligands pour un ciblage actif entourés en rouge.	36
Figure 28. Structure chimique de l'amylopectine	38
Figure 29. Structure chimique d'amylose.....	38

Figure 30. Les structures des trois familles principales de cyclodextrines classées selon le nombre d'unités de glucose présentes : α -, β - γ - CDs (avec 6, 7, 8 unités de glucose respectivement).....	40
Figure 31. Présentation générale des modifications sélectives des CDs.....	42
Figure 32. Les structures chimiques des monomères d'acides uroniques (M) et (G) formant l'alginate copolymère à blocs composé de régions homopolymériques M et G	43
Figure 33. Liaisons covalentes des ions calcium avec les résidus poly-G des polymères d'alginate.....	44
Figure 34. Rétention du calcium par un réseau tridimensionnel de segments poly-M ou poly-G définissant une structure de type « egg-box ».....	45
Figure 35. Structure chimique du chitosane.	45
Figure 36. Structure schématique d'une molécule de pectine	47
Figure 37. Représentation schématique du modèle « wattle blossom ». GA (a) en solution, (b) adsorbée à l'interface huile-eau. C : blocs polysaccharidiques, P : chaîne polypeptidique.....	49
Figure 38. Structure de la gélatine -Ala-Gly-Pro-Arg-Gy-Glu-4Hyp-Gly-Pro-.....	53
Figure 39. Structure de la caséine α -S1	55
Figure 40. Structure de la caséine β	56
Figure 41. Structure de la caséine κ	57
Figure 42. Structure tridimensionnelle de la β -lactoglobuline.....	59
Figure 43. Structure tridimensionnelle de l' α - lactalbumine.	60
Figure 44. Modèle de la micelle de caséine « cœur-enveloppe » proposée par Waugh et al 1965.....	80
Figure 45. Modèle « à sous-unités » de micelle de caséine proposée par Schmidt en 1982: représentation schématique de la micelle composée de deux types de sous-unités reliées par le phosphate de calcium colloïdal.	81
Figure 46. Modèle « à sous-unités » de micelle de caséine corrigé par Walstra en 1990.	82
Figure 47. Photographies en microscopie électronique de la micelle de caséines : (A) micelle de caséine adsorbée sur une membrane de céramique observée par microscopie électronique à balayage ou SEM. L'échantillon a été recouvert par une couche d'iridium de 2 nm avant observation avec un grossissement de X 70 000. Barre d'échelle = 100 nm. (B) La micelle de caséine observée par microscopie électronique à transmission avec un grossissement de X 85 000. Barre d'échelle = 100 nm.(d'après McMahon, 1998).....	83
Figure 48. Modèle à dualité de lien proposé par Horne et al. en 1998 et repris par Livney en 2010 : les caséines sont reliées au niveau des fragments hydrophobes représentés par les barres rectangulaires et sont liées par les nanoclusters de calcium colloïdal phosphate (CCP).....	84
Figure 49. Profil SANS (diffusion des neutrons à petits angles) d'une dispersion de caséines micellaires proposé par Holt et al. (2002). Le pic à $q = 0,35 \text{ nm}^{-1}$ met en évidence le phosphate de calcium colloïdal (CaP) correspondant à une distance de corrélation de 18 nm.....	85

Figure 50 Modèle des nanoclusters proposé par Holt et al. en 1994 puis en 2003 : structure formée par un réseau homogène de chaînes protéiques réticulées par les nanoclusters de phosphate de calcium colloïdal et une région externe chevelue de faible densité ..	86
Figure 51. Profils SANS calculés selon différents modèles de dispersions de caséines micellaires dans (A) de l'eau et (B) de l'eau lourde D ₂ O. C) Profils SAXS (diffusion des rayons X à petits angles). Le signal SAXS des nanoclusters est représenté par un trait plein rouge ..	87
Figure 52. La micelle de caséine immobilisée et observée par Cryo-TEM. A sa droite, un schéma illustrant le modèle poreux de la micelle de caséine entière définie par McMahon et al. (2007). Un zoom sur la périphérie de la micelle montre les nanoclusters de phosphate de calcium (boule noire) de 4,8 nm de diamètre avec un espace intermicellaire de 18 nm. Les caséines sont aussi illustrées avec un diamètre hydrodynamique de 8 nm (boule grise) ..	89
Figure 53. L'évolution de la structure de la micelle en cours de contraction par déshydratation osmotique par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) (A) Profils SAXS des dispersions de caséines micellaires à des concentrations (de haut en bas) de 25, 33, 100, 150, 167, 206, 337, 365, et 400 g.L ⁻¹ . Les données ont été décalées le long de l'axe des ordonnées pour une meilleure observation. A 25 g.L ⁻¹ , les dispersions sont turbides et liquides alors qu'à une concentration de 400 g.L ⁻¹ , elles ont l'aspect d'un gel transparent. La transition entre le liquide et le gel se fait à des concentrations entre 150 et 200 g.L ⁻¹ de caséines. (B) représentation log-log de Kratky ($q^2 I(q) = f(q)$) avec q, le vecteur d'onde et I, l'intensité de lumière diffusée.	89
Figure 54. Le facteur de structure $Seff(q)$ mesuré pour les dispersions de caséines micellaires à des concentrations (de haut en bas) de 100, 150, 167, 206, 337, 365, et 400 g.L ⁻¹ ..	90
Figure 55. Le modèle poreux proposé par Bouchoux et al en 2010 : la micelle est formée de régions molles composées de vide ou de solvant et de régions rigides contenant les nanoclusters de phosphate de calcium et les molécules de caséines représentées par des boules de 25 nm.	92
Figure 56. Schéma récapitulatif illustrant l'évolution de la structure micellaire depuis 1956 avec les différents modèles suggérés par les auteurs suivants: Waugh et al (1956), Schmidt et al 1982, Horne et al 1998 et 2005, Holt et al, 2003, McMahon et al, 1998 et 2007, Bouchoux et al, 2010, Dalgleish et al, 2011, Mata et al, 2011, De Kruif et al, 2012 et 2014. Les différentes observations de microscopie électronique à transmission (TEM) sont aussi évoquées ..	93
Figure 57. Propriétés de structure et de fonctions des micelles de caséines lui conférant les bases essentielles pour constituer une matrice d'encapsulation de bioactifs sensibles efficace ..	98
Figure 58. Gamme d'étalonnage de la curcumine obtenue à 420 nm dans l'éthanol (n=3).....	115
Figure 59. Gamme d'étalonnage de la curcumine dosée par ABTS à 734 nm. Cette gamme reflète le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante en fonction de la concentration de curcumine initiale.	117

Figure 60. Gamme d'étalonnage de la curcumine dosée par FRAP à 593 nm (n=3).....	118
Figure 61. Spectres de fluorescence normalisés de la curcumine dans des solvants de polarité différente (A) Spectre d'excitation (B) Spectre d'émission	119
Figure 62. Schéma récapitulant les objectifs de la thèse	230

Liste des tableaux hors publication

Tableau 1. Les différentes catégories des aliments fonctionnels.	7
Tableau 2. Exemples de quelques additifs naturels, leurs sources alimentaires et leurs activités biologiques	11
Tableau 3. Les structures de la curcumine, de ces analogues et des composés dérivés de l'auto-oxydation.....	17
Tableau 4. Exemples des ingrédients naturels d'origines animale ou végétale de la phase huileuse..	33
Tableau 5. Les différents types d'émulsion simple.	34
Tableau 6. Les deux types d'émulsions doubles.	35
Tableau 7. Exemples de bioactifs encapsulés dans des matrices laitières et non laitières et les techniques d'encapsulation correspondantes.	63
Tableau 8. Limites d'utilisation des diverses matrices d'encapsulation.	69
Tableau 9. Propriétés physico-chimiques des caséines.	73
Tableau 10. Variation du log D reflétant le partage de la curcumine en fonction du pH	100
Tableau 11. Caractéristiques énergétiques ou tensions interfaciales (mJ/m^2) des solvants utilisés pour la méthode MATS selon Bellon-Fontaine et al.(1996). γ_{LLW} ; γ_{L+} ; γ_{L-} , correspondent respectivement aux tensions interfaciales des composants de la surface bactérienne responsables des interactions Lifshitz van der Waals, accepteur d'électrons et donneur d'électrons.....	105

Liste des abréviations

° C: Degré Celsius

a* : Composante de mesure de la gamme de couleur allant du vert au rouge

AA: Acide ascorbique

ABTS : 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique (méthode de mesure d'activité antioxydante)

ADH: Alcool déshydrogénase

ADPI : American Dry Product Institute

AFNOR : Association française de normalisation

AGPI: Acides gras polyinsaturés

Aw : Activité de l'eau

b* : Composante de mesure de la gamme de couleur allant du bleu au jaune

C* : Chroma ou saturation de couleur

CaP ou CCP: Phosphate de calcium colloïdal ou colloidal calcium phosphate

CD: Cyclodextrine

CIE : Commission Internationale de l'Eclairage

CM ou MC : Caséines micellaires ou Micellar casein

CMP: Caséino-Macro-Peptide

CPP: Caséinophosphopeptide

Da: Daltons

DDA: Degré d'acétylation

DHA: Acide docosahexaénoïque

DLS : Diffusion dynamique de la lumière ou Dynamic Light Scattering

DVS : Dynamic vapor sorption ou sorption dynamique de vapeur

EFSA: European Food Safety Authority ou Autorité européenne de sécurité alimentaire

EGCG: Epigallocatechine gallate

FIL : Fédération internationale du lait

FRAP : Ferric reducing-antioxidant power

G' : Module élastique

G'' : Module visqueux

GDL: Glucono-delta-lactone

GRAS: Generally recognized as safe ou GJSD Généralement jugé sans danger

GSFA: Codex General Standard for Food Additives

GUV: Giant unilamellar vesicle ou géante vésicule unilamellaire

HG: Homogalacturonique

HM: High methylation ou Hautement méthylé

HMT: Heat moisture treatment ou traitement par la chaleur humide

HPOD: Hydroperoxyde

HR : Humidité relative

JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives ou Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires

kDa: Kilodaltons

L* : Composante de luminance

LAB : Lactic acid bacteria ou bactéries lactiques

Lb: *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*

LM: Low methylation ou faiblement méthylé

LUV: Large unilamellar vesicle ou grande vésicule unilamellaire

MATS: Microbial adhesion to solvents ou test d'adhésion microbienne aux solvents

MGLA: Matière grasse laitière anhydre

MLV: Multilamellar vesicle ou vésicule multilamellaire

ND: Non déterminé

PBS: Phosphate buffer saline solution ou tampon phosphate

pI: Point isoélectrique

pKa: Constante d'acidité

POE: Poly-(oxyéthylène)

Poly-G: Poly-gulonate

Poly-M: Poly-mannuronate

PPCN : Phosphocasinat natif

PST: Protéine de soja texturée

PVT: Protéine végétales texturée

RG: Aide Rhamnogalacturonique

Rpm: Round per minute ou tpm tour par minute

SAB ou BSA: Sérum albumine bovine ou Bovin serum albumin

SANS: Small angle neutron Scattering ou diffusion des neutrons aux petits angles

SAS: Small Angle Scattering ou diffusion de rayonnements aux petits angles

SAXS: Small Angle X-ray Scattering ou diffusion des rayons X aux petits angles

SEM ou MEB : Scanning electron microscopy ou Microscopie électronique à balayage

SLN: Solid lipid nanoparticles ou nanoparticules lipidiques solides

SPI: Soy protein isolate ou Isolat de soja

St: *Streptococcus thermophilus*

SUV: Small unilamellar vesicle ou petite vésicule unilamellaire

TEM ou MET: Microscopie électronique en transmission

TPTZ : 2,4,6-tri [2-pyridyl]-s-triazine (réactif)

Trp : Tryptophane

UA : Unité arbitraire

UV: Ultra-violets

WPC: Whey protein concentrate ou concentré de protéines sériques

WPH: Whey protein hydrolysate ou hydrolysat de protéines sériques

WPI: Whey protein isolate ou isolat de protéines sériques

Yomix : Ferments lactiques du yaourt industriels

α -TOC: α -tocophérol

Δ BS (%) : Pourcentage relatif de l'intensité de lumière rétrodiffusée (Δ backscattering percentage)

Introduction générale

Introduction générale

« **Que ton aliment soit ta seule médecine.** » Ces paroles d'Hippocrate, le père de la médecine occidentale, sont aujourd'hui encore plus vraies que jamais. Chaque jour, la relation entre les aliments et la santé est renforcée. L'utilisation des aliments à des fins médicinales est à la portée des consommateurs avec les **aliments fonctionnels**. Dans les faits, beaucoup d'aliments sont considérés comme fonctionnels car la science découvre continuellement de nouveaux composés bénéfiques pour la santé comme les antioxydants, les prébiotiques, les éléments phytochimiques, etc.

Les aliments fonctionnels contiennent des éléments bénéfiques pour la santé autres que les macronutriments essentiels pour leur apport énergétique. Ces éléments à classer dans les micronutriments peuvent être qualifiés de **bioactifs**. Parmi les composés bioactifs les plus intéressants, un grand nombre correspond à des molécules hydrophobes telles que les caroténoïdes, les vitamines liposolubles, les flavonoïdes ou même les acides gras. Ces composés étant hydrophobes, ils sont caractérisés par une faible solubilité en milieu aqueux. Ils ont généralement une faible biodisponibilité impliquant une absorption minimale au niveau du tractus gastro-intestinal. Une très forte dégradation au cours des procédés de formulation, de transformation et de conservation alimentaires constitue encore une restriction à laquelle il faut remédier. Face à ces limites, de nombreuses solutions et stratégies, notamment d'encapsulation, sont développées pour protéger ces bioactifs, augmenter leur stabilité, leur efficacité et leur biodisponibilité. Les matrices d'encapsulation de bioactifs sont nombreuses et diverses et peuvent être à base de protéines, de lipides, de polysaccharides etc. Cependant, chaque matrice présente des limites spécifiques. Le choix d'une matrice appropriée au bioactif à véhiculer et au produit fini dans laquelle elle sera incorporée s'avère primordial.

Parmi les nombreux systèmes d'encapsulation disponibles, les nanoparticules à base de protéines ont joué d'un intérêt considérable ces dernières années. Les **micelles de caséines**, protéines majoritaires du lait, sont considérées comme des vecteurs naturels de composés bioactifs. Les caséines micellaires sont des particules colloïdales d'environ 80 nm de rayon formées par les interactions entre environ

Introduction générale

100 molécules de caséines et 800 nano-agrégats de phosphate de calcium amorphe. Leur structure et leurs propriétés physicochimiques permettent leur utilisation à des fins d'encapsulation et de libération contrôlée de composés d'intérêt dans des applications alimentaires. Leur caractère non toxique et leur stabilité au cours des procédés de transformation les rendent d'autant plus intéressantes.

Le **premier objectif** de cette thèse était de mettre en évidence les interactions entre les micelles de caséine et une molécule hydrophobe modèle représentative des bioactifs, la curcumine. L'étude de ces interactions dans différentes conditions physicochimiques a permis d'évaluer le potentiel des micelles de caséines en tant que transporteur de composés hydrophobes en milieux aqueux. Cette première partie traitera également de l'influence de la présence de ce polyphénol sur la structure de la micelle et sur ses propriétés de gélification acide.

Sachant qu'il est intéressant d'incorporer des bioactifs dans des produits alimentaires courants, peu coûteux et largement consommés en France tels que des produits laitiers de type yaourt, l'incorporation de la curcumine dans les yaourts a été étudiée. Dans cette étude, les composantes biotiques représentées par les bactéries du yaourt et abiotiques du milieu ont été prises en compte afin d'obtenir une incorporation efficace pour le consommateur. Une fois la curcumine encapsulée dans les micelles de caséines, son incorporation dans un produit type yaourt doit faire face à la présence des bactéries lactiques que sont *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. L'étude de l'interaction entre la curcumine et ces bactéries constituait ainsi le **deuxième objectif** de la thèse.

Une fois la curcumine ajoutée au lait, elle risque de subir des altérations suite aux nombreux traitements de préparation, aux procédés de transformation et aux diverses contraintes que peut imposer le stockage. Par ailleurs, les protéines lactières sont souvent utilisées en industrie sous forme de poudres dans diverses formulations. Il semblait ainsi nécessaire de tester si les micelles de caséines permettent de protéger la curcumine d'un tel procédé. Le **troisième objectif** de cette thèse était la

production d'une poudre de caséine enrichie en curcumine et la vérification de la préservation de son activité antioxydante. La conservation des propriétés fonctionnelles des micelles de caséines dopées et atomisées a également été étudiée, notamment les propriétés de gélification acide. Cette étude nous a permis de produire une poudre active contenant un bioactif « intègre » et pouvant être ajouté aux autres constituants du lait pour produire des produits laitiers de type yaourt à valeur ajoutée.

La présentation de ce travail s'articule en trois chapitres :

Dans un premier chapitre, une synthèse bibliographique présentera les bioactifs utilisés dans les aliments fonctionnels, ainsi que leurs propriétés et leurs limites d'incorporation. L'encapsulation des bioactifs et les principales matrices utilisées seront proposées. La dernière partie développera spécifiquement la matrice choisie dans notre étude : la micelle de caséine d'un point de vue structural et technofonctionnel. Pour clôturer ce premier chapitre, les différents objectifs de la thèse seront présentés.

Le deuxième chapitre sera consacré à la présentation des outils méthodologiques et matériels utilisés pour étudier les interactions entre la curcumine, la micelle de caséine et les bactéries lactiques du yaourt ainsi que pour la production de la poudre de caséine dopée en curcumine.

Le troisième chapitre présentera les résultats et discussion sous forme des trois publications. La première publication vise à comprendre le comportement des complexes caséines micellaires-curcumine pendant l'acidification.

Les propriétés de fluorescence des micelles de caséines et de la curcumine ont été utilisées pour évaluer l'ampleur des interactions entre la curcumine et les caséines micellaires. La structure interne et la structure globale des micelles de caséines dopées avec la curcumine ont été analysées par diffusion des rayons-X aux petits angles et par diffusion dynamique de la lumière. L'influence de la température et du pH sur la stabilité des complexes caséines micellaires-curcumine et de leurs propriétés de gélification a été étudiée par spectroscopie de fluorescence et par des mesures de rhéologie et diffusion multiple de la lumière.

Introduction générale

Article 1 : Khanji, A. N. *et al.* Structure and gelation properties of casein micelles doped with curcumin under acidic conditions. *Food Funct.* **6**, 3624–3633 (2015).

La deuxième publication vise à étudier les interactions curcumine-bactéries lactiques. La microscopie à épifluorescence a été utilisée pour visualiser qualitativement les interactions entre ces deux composants. Pour mieux déterminer quantitativement ces interactions, la fluorescence et le *quenching* de fluorescence des résidus tryptophane ont permis d'évaluer l'intensité des interactions curcumine-bactéries lactiques. L'activité antibactérienne de la curcumine a été aussi évaluée. Enfin, les propriétés de gélification du lait ont été étudiées en présence de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* par diffusion multiple de la lumière et par des mesures rhéologiques afin d'évaluer les modifications induites dans une matrice complexe protéique par la coexistence des bactéries et de bioactifs.

Article 2: Khanji, A. N. *et al.* The study of curcumin interaction with micellar casein and lactic acid bacteria cell envelope. Soumis à *LWT* (2017a).

Le troisième et dernier article est consacré à la production par atomisation d'une poudre de micelles de caséines dopées en curcumine. La poudre dopée de curcumine a été par la suite caractérisée et l'influence de l'ajout de la curcumine sur les différentes propriétés physicochimiques de la poudre a été évaluée. L'activité antioxydante de la curcumine encapsulée a été déterminée. Enfin, l'effet de l'ajout de curcumine aux micelles de caséines et la production d'une poudre dopée sur les propriétés technofonctionnelles des micelles ont été étudiés par des mesures rhéologiques.

Article 3 : Khanji, A. N. *et al.* Structure, gelation and antioxidant properties of a curcumin-doped casein micelle powder produced by spray drying. Soumis à *Food Chemistry* (2017b).

Ce travail s'achèvera par une conclusion générale permettant de faire un bilan sur les résultats obtenus et d'ouvrir sur les nombreuses perspectives que soulèvent cette thèse.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Introduction

Dans le passé, les aliments étaient reconnus principalement pour leur apport en substances nutritives nécessaires au fonctionnement normal du corps. Aujourd'hui, la diversité des aliments mis sur le marché et les innovations sont davantage voire exclusivement liées aux nouvelles technologies. L'apparition de nouveaux produits est reliée au concept de la qualité qui englobe plusieurs éléments : coût, sens, praticité, santé, sécurité et environnement ¹.

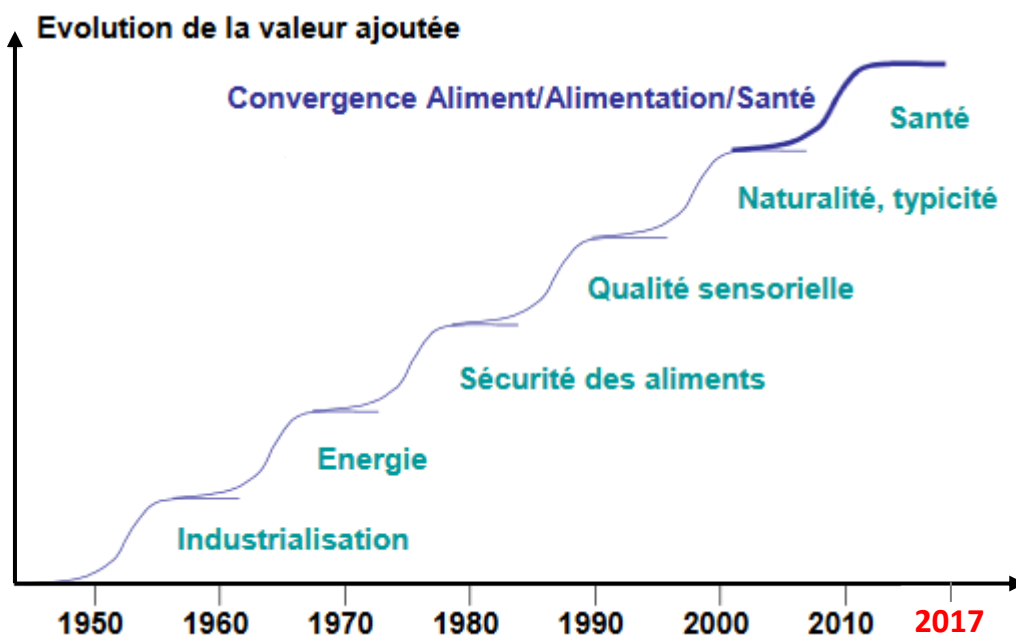


Figure 1. Evolution de la valeur ajoutée de l'aliment au fil des années ¹.

Au cours des deux dernières décennies, les consommateurs sont passés du simple fait de satisfaire les besoins nutritionnels à la consommation d'aliments pour le maintien du bien-être et la réduction des risques de maladie (Figure 1) ². Aujourd'hui, il est généralement admis que la consommation de « bons » aliments augmente la longévité et améliore la qualité de vie.

Le changement d'attitude des consommateurs envers les aliments et la modification des tendances dans l'approvisionnement alimentaire résultent d'un grand nombre de facteurs, tels que le vieillissement de la population, l'augmentation des coûts des soins de santé, le désir des

Synthèse bibliographique

consommateurs d'améliorer leur santé, la sensibilisation et l'évolution des attentes des consommateurs, les preuves scientifiques que le régime alimentaire modifie la prévalence des maladies et leur progression, les progrès scientifiques et technologiques en alimentation et les changements de réglementation sur les aliments.

Compte tenu des tendances en matière de demande des consommateurs, l'industrie alimentaire a mis sur le marché une nouvelle catégorie de produits que sont les « aliments fonctionnels »². À titre de définition générale, un aliment est « fonctionnel » s'il contient une composante alimentaire qui affecte une ou plusieurs fonctions précises du corps et qui produit des effets positifs. Cet effet devrait être utile au bien-être et à la santé ou permettre de réduire le risque de maladie³.

Un aliment fonctionnel peut être obtenu :

- En éliminant l'un des composants d'un aliment, connu ou identifié pour ses effets nocifs sur la santé des consommateurs (protéines allergéniques, par exemple) ;
- En ajoutant, à des produits alimentaires, une substance, normalement absente de la majorité de ces aliments, mais dont les effets bénéfiques sur la santé ont été démontrés (antioxydants non vitaminiques, fructosane prébiotique) ;
- En augmentant la concentration d'un composant naturel dans un produit afin d'atteindre une concentration susceptible d'induire des effets souhaités (vitamine C) ;
- En remplaçant un composant, notamment un macronutriment, dont la consommation abusive provoque des effets nocifs (graisses), par un autre, aux effets bénéfiques reconnus (inuline de la chicorée) ;
- En améliorant ou en modifiant la biodisponibilité des composants alimentaires, généralement reconnus par leurs effets positifs sur la santé humaine (Tableau 1).

Tableau 1. Les différentes catégories des aliments fonctionnels ⁴.

Produit non-modifié	Aliment qui a, naturellement, une teneur élevée en éléments nutritifs ;
Produit enrichi	Aliment où la teneur des éléments nutritifs est augmentée ;
Produit supplémenté	Aliment auquel sont ajoutés des éléments nutritifs qu'il ne contient pas normalement ;
Produit modifié	Aliment dont sont remplacés les éléments existants par des éléments bénéfiques pour la santé ;
Produit amélioré	Aliment brut dont est changée la composition en éléments nutritifs.

2. Les bioactifs

L'effet santé des aliments fonctionnels est dû particulièrement aux substances biologiquement actives présentes dans les produits alimentaires. Il s'agit notamment des fibres alimentaires, des minéraux, des vitamines, des oligo-éléments, des protéines, des peptides, des acides aminés, des acides gras spécifiques (acides gras polyinsaturés (oméga-6 et oméga-3) et acides gras monoinsaturés (oméga-9)), des substances phytochimiques, des antioxydants, des probiotiques, etc. Ces substances sont qualifiées de « **bioactifs** ».

Certains de ces bioactifs sont déjà utilisés en tant qu'additifs alimentaires et ce pour leurs propriétés colorantes, antioxydantes, texturantes, conservatrices, etc. et non pas pour leurs propriétés biologiques. Un additif alimentaire est en effet défini en tant que substance qui n'est pas normalement consommée en tant que denrée alimentaire, ni utilisée normalement comme ingrédient caractéristique d'une denrée alimentaire, qu'elle ait ou non une valeur nutritive, et dont l'addition intentionnelle à une denrée alimentaire dans un but technologique (y compris organoleptique) à une étape quelconque de la fabrication, de la transformation, de la préparation, du traitement, du conditionnement, de l'emballage, du transport ou de l'entreposage de ladite denrée entraîne, ou peut,

Synthèse bibliographique

selon toute vraisemblance, entraîner (directement ou indirectement) son incorporation ou celle de ses dérivés dans cette denrée ou en affecter d'une autre façon les caractéristiques ⁵.

Les additifs qui sont déjà utilisés en industrie alimentaire que ce soit en tant que colorant, antioxydant ou conservateur et qui possèdent en plus des activités biologiques intéressantes leur permettant d'être classés dans le groupe des bioactifs seront notés par la suite selon leur code E et leur dose journalière sera précisée.

En général, les bioactifs sont classés en trois catégories :

- Les bioactifs hydrophobes
- Les bioactifs hydrophiles
- Les probiotiques

Incorporer ces bioactifs à activités biologiques intéressantes dans des matrices alimentaires et les préserver sera bénéfique pour le consommateur.

Quelques exemples de ces bioactifs classés en fonction de leurs caractères hydrophiles ou hydrophobes sont listés dans le tableau 2 avec une indication sur les sources alimentaires et les activités biologiques associées à ces molécules.

Bioactifs	Sources alimentaires	Activités biologiques	Références
Bioactifs hydrophobes			
Les catéchines, épicatechines, épicatechines gallate.	<ul style="list-style-type: none"> - Fruits : pommes, raisins, cerises. - Légumes : fèves, haricots verts. - Thé vert. 	Importante activités antioxydantes, antibactériennes, antifongiques, anti-inflammatoires et anticancéreuses.	6
La curcumine	<ul style="list-style-type: none"> - Rhizomes d'une plante appelée <i>Curcuma longa</i>. - Présente dans les épices du curry et dans la moutarde, les produits laitiers (dans le yaourt en tant que colorant) et les boîtes de conserve de poissons en tant que colorant. 	Importantes propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-cancéreuses, anti-inflammatoires et cicatrisantes.	7–13
La quercétine	<ul style="list-style-type: none"> - Fruits : pommes - Légumes : oignons - La livèche - Les thés - Les vins rouges - Les câpres 	<ul style="list-style-type: none"> - Importantes activités anticancéreuses surtout le cancer du pancréas - Protection cardiovasculaire : * Inhibition de l'agrégation plaquettaire (athérosclérose) * Diminution des troubles coronariens et des accidents vasculaires cérébraux 	14–17
Le Resvératrol	<ul style="list-style-type: none"> - La vigne - Le raisin - L'arachide - Le pistachier 	<ul style="list-style-type: none"> - Importante activité antioxydante - Inhibition des maladies coronaires cardiovasculaires et inhibition de l'agrégation plaquettaire - Activité anticancéreuse, en particulier contre le cancer du côlon - Réduction du poids et de l'obésité en augmentant la sensation de satiété 	18–20
Le lycopène	<ul style="list-style-type: none"> - Fruits : tomate, melon, papaye, pamplemousse rose, goyave. 	<ul style="list-style-type: none"> - Activité antioxydante - Induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses et inhibition de leur prolifération 	21,22
La lutéine	<ul style="list-style-type: none"> - Légumes : maïs, carotte, épinards, oseille - Jaune d'œuf 	<ul style="list-style-type: none"> - Atténuation des dommages rénaux induits par le diabète 	23

Synthèse bibliographique

Les acides gras polyinsaturés	<ul style="list-style-type: none"> - Huile de lin - Huile d'olive - Huile d'origine marine 	<ul style="list-style-type: none"> - Réduction des maladies cardiovasculaires. - Prévention contre le cancer du sein et de la prostate. - Activités anticancéreuses, anti-stress et thérapeutiques pour les diabètes de type I et II 	24,25
Le β-carotène ou vitamine A	<ul style="list-style-type: none"> - Fruits : mangues, abricots - Légumes : carottes, légumes vert, patates douces, persil 	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition des maladies cardiovasculaires, des maladies oculaires, des cancers et diverses autres maladies chroniques 	26
α-tocophérol ou vitamine E	<ul style="list-style-type: none"> - Huiles végétales 	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition de l'oxydation des lipides en tant que piègeur de radicaux libres 	27
Vitamine D	<ul style="list-style-type: none"> - Lait, Beurre - Poissons gras (espadon, saumon, truite) - Foie de veau/volaille 	<ul style="list-style-type: none"> - Activité neuro-immuno modulatrice - Effet sur la différenciation et la fonction des cellules du système immunitaire. - Amélioration de la masse et des performances musculaires. 	28,29
Bioactifs hydrophiles			
Les anthocyanes	<ul style="list-style-type: none"> - Fruits : myrtille, mûre, cerise, raisin noir et orange sanguine 	<ul style="list-style-type: none"> - Activité antioxydante - Prévention des risques cardiovasculaires 	30,31
Vitamine C	<ul style="list-style-type: none"> - Les agrumes : orange, pamplemousse, mandarine - Fruits frais ; goyave mangue, papaye, kiwi, fraise, ananas - Légumes : chou, brocoli, poivron vert ou rouge, pois vert cru. 	<ul style="list-style-type: none"> - Activité antioxydante importante - Inhibition de la formation des composés cancérogènes - Biosynthèse de la carnitine et de la noradrénaline - Stimulation de la synthèse du collagène - Modulation des systèmes de neurotransmetteurs du cerveau - Amélioration de l'immunité contre les maladies - Réduction des risques de développement de cancer des maladies cardiaques et de la cataracte 	32,33

Acides caféique et chlorogénique	- Plantes : sauge et menthe - Café	- Propriétés antivirales, anti-inflammatoires et anti-carcinogènes importantes	34
Les probiotiques			
<i>Bifidobacterium, Lactobacillus</i>	Pas de source alimentaire mais incorporés dans de nombreux aliments tels que les yaourts, les céréales etc.	- Rôle thérapeutique de modulation de l'immunité, réduction du taux de cholestérol, amélioration de la tolérance au lactose et inhibition des risques de développement de cancer	35–37

Tableau 2. Exemples de quelques additifs naturels, leurs sources alimentaires et leurs activités biologiques

Synthèse bibliographique

Comme il a déjà été précisé dans le tableau 2, des activités biologiques intéressantes et nombreuses sont associées aux bioactifs alimentaires naturels. Cependant, afin de bénéficier de ces activités, il est nécessaire que le bioactif soit préservé après les étapes de transformation liées à la préparation de l'aliment, à son conditionnement, à son stockage ou même à son ingestion par le consommateur. Selon leur structure et leur solubilité dans l'eau, les bioactifs peuvent être classés en hydrophobes et hydrophiles. Les probiotiques constituent à eux seuls un groupe à part.

2.1. Les bioactifs hydrophobes

2.1.1. Les polyphénols

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisé en une dizaine de classes chimiques dont un point est commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) ³⁸. Il existe de nombreuses classes de polyphénols : phloroglucinols, quinones, stilbénoides, coumarines, anthocyanes, tanins, flavonoïdes, acides-phénols,...). Ces structures peuvent également être acylées, glycosylées, ce qui donne une grande variété de structures et de polarités. Cependant, une grande majorité des composés phénoliques présentent une très faible ou aucune solubilité dans l'eau.

2.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes partageant tous une même structure de base formée par deux cycles aromatiques désignés par A et B reliés par trois carbones : C6-C3-C6, chaîne souvent fermée en un hétérocycle oxygéné hexa- ou pentagonal ³⁹ (Figure 2).

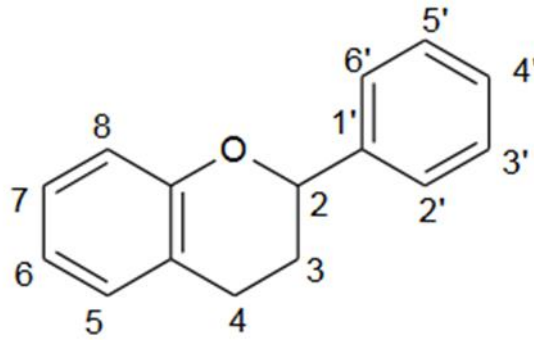


Figure 2. Structure de base des flavonoïdes ⁴⁰.

On les classe en fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central. On les distingue aussi par le nombre et la position des groupements hydroxyles, par l'existence ou non de substituants sur la génine ⁴¹. Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les positions 2 ou 3 (Figure 3) :

- Dans la position 2 : le flavonoïde est appelé flavane.
- Dans la position 3 : le flavonoïde est désigné par le terme isoflavane.
- Si la position 4 du flavane porte un groupement carbonyle, la molécule est appelée flavanone.
- Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est en plus insaturée, le composé est nommé flavone.
- Si le squelette précédent est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle, il est désigné par le nom de flavonol ⁴².

Synthèse bibliographique

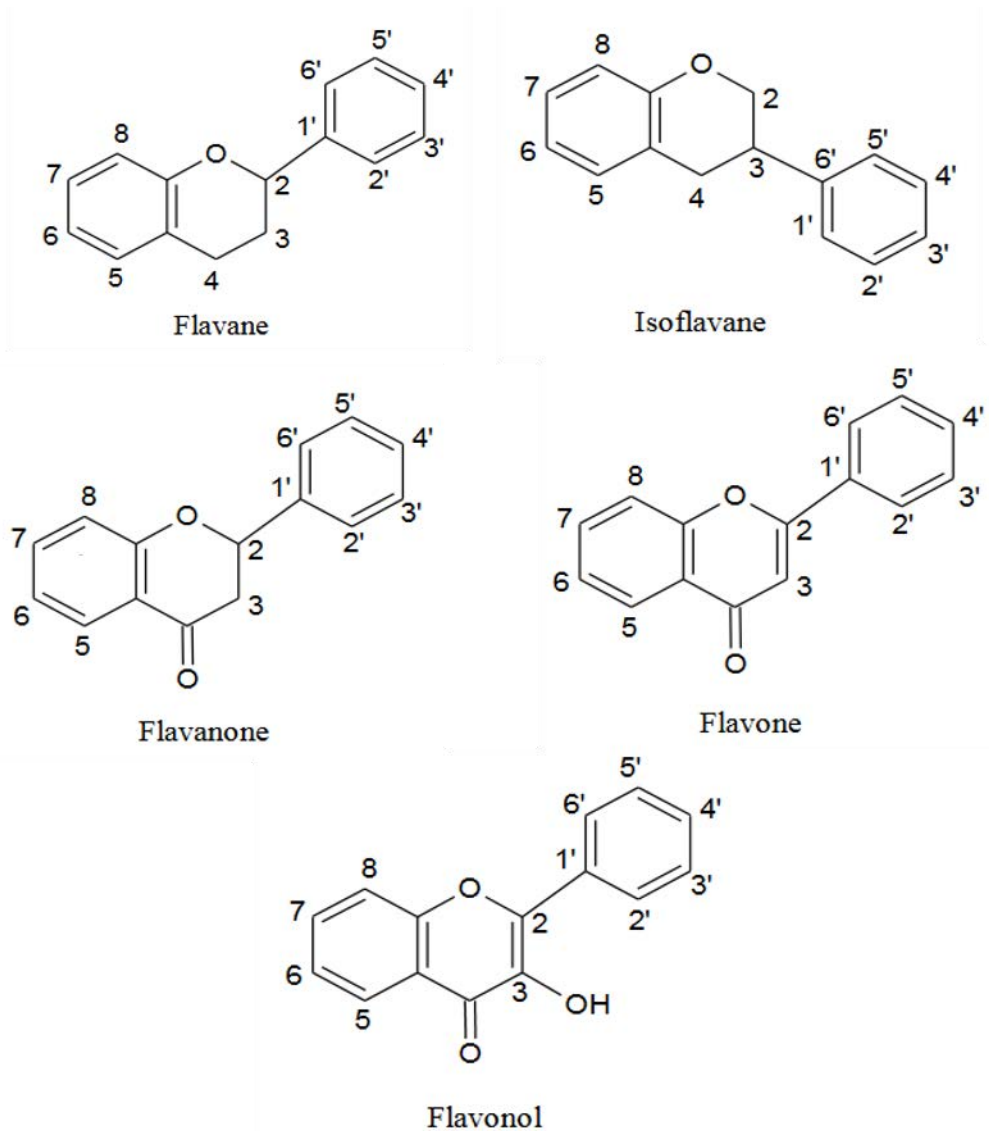


Figure 3. Structures des différentes classes de flavonoïdes ⁴³.

i) Les catéchines

La catéchine est un composé de la famille des flavonoïdes de la sous-classe des flavanols. Elle est aussi connue sous le nom de catéchol. La catéchine, l'épicatéchine et l'épicatéchine gallate sont les plus connus et les plus présents en tant que polyphénols dans le thé vert ⁶. Elles subissent la dégradation et l'épimerisation une fois exposée à des températures élevées, à des fluctuations de pH, et à la présence d'oxygène et de lumière les rendant moins biodisponibles ^{44,45} (Figure 4).

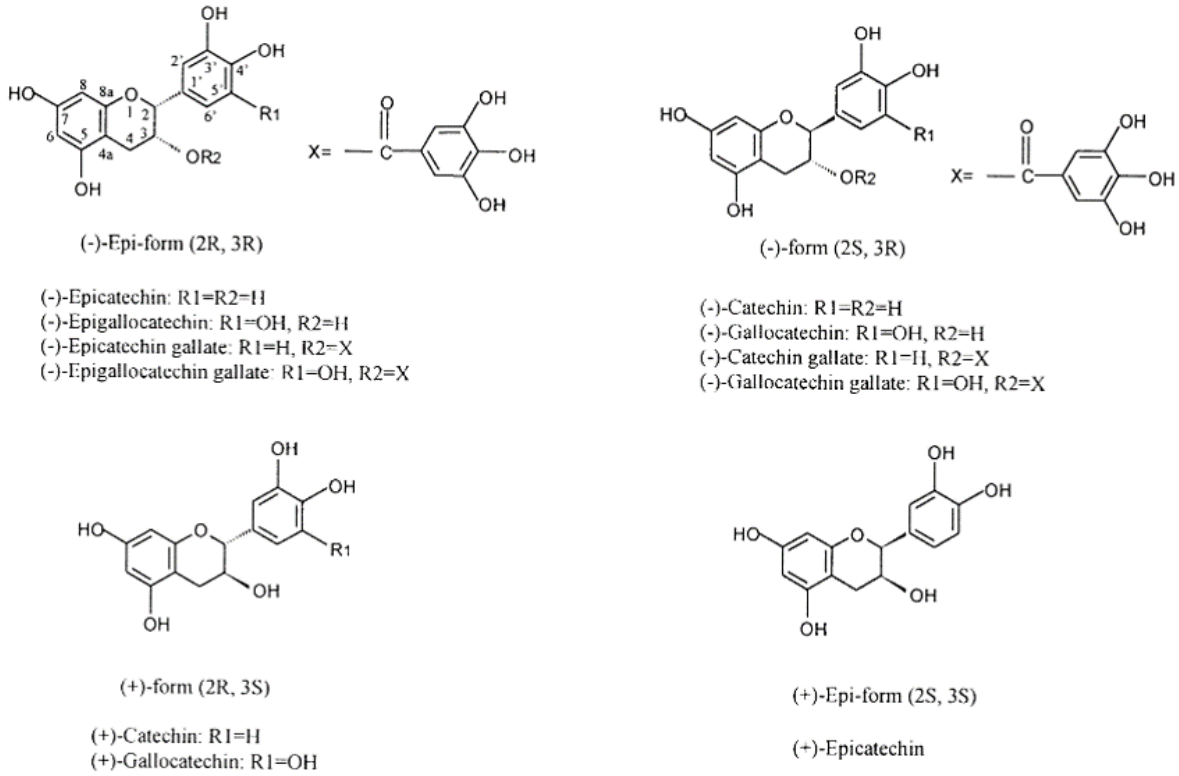


Figure 4. Structures chimiques des catéchines et de leurs épimères ⁴³.

ii) La quercétine

La quercétine, également appelée 3,3', 4', 5'-7-pentahydroxyflavone, appartient à la famille des flavonoïdes sous la classe des flavonols ⁴⁶ (Figure 5).

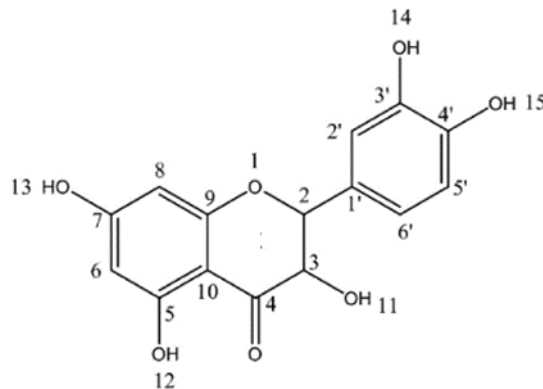


Figure 5. Structure chimique de la quercétine ⁴⁷.

Synthèse bibliographique

Elle se dégrade sous traitement thermique, à l'exposition à l'oxygène et à la lumière⁴⁸. De plus, elle est peu soluble dans l'eau et possède une stabilité médiocre durant les procédés de fabrication la rendant difficile à incorporer dans les produits alimentaires⁴⁶.

2.1.3. Les non flavonoïdes

i) La curcumine

La curcumine, également connue sous le nom de 1, 7-bis (4-hydroxy-3-méthoxyphényl) -1,6-heptadiène-3, 5-dione, est un polyphénol présent dans les rhizomes d'une plante appelée *Curcuma longa* (Figure 6). De par sa couleur jaune orangée, la curcumine a été traditionnellement utilisée dans les aliments en tant que colorant naturel E 100⁴⁹.

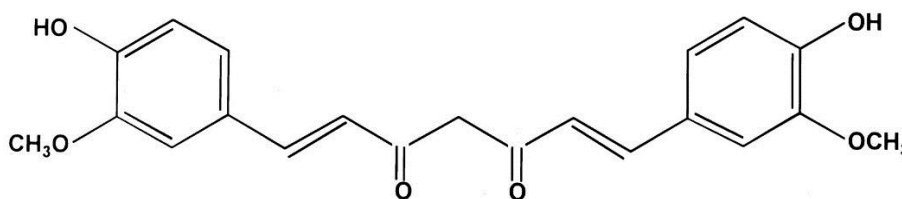


Figure 6. Structure chimique de la curcumine⁵⁰.

La dose journalière de curcumine en tant qu'additif colorant est de 0 à 3 mg/ kg de masse corporelle par jour selon le règlement UE 231/2012 et de la JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives) et sa concentration maximale dans les aliments de type potage est de 50 mg/ kg d'aliments⁵. Elle peut être utilisée seule ou avec d'autres colorants notamment dans les matières grasses, fromages fondus, produits à tartiner, viandes et produits de la pêche préparés, saucisses, boissons alcoolisées ainsi que divers produits agroalimentaires tels que des plats préparés et confiseries⁵¹. Cependant, sa nature lipophile conduit à une faible biodisponibilité une fois ingérée⁵²⁻⁵⁴. De plus, la curcumine est aussi dégradée à pH basique et neutre, à de hautes températures, à l'exposition à la lumière, aux enzymes et à l'oxygène^{55,56}. Les différentes voies de dégradation de la curcumine sont représentées dans les (Figures 7-8) ainsi que les principaux produits de dégradation dans le tableau 3.

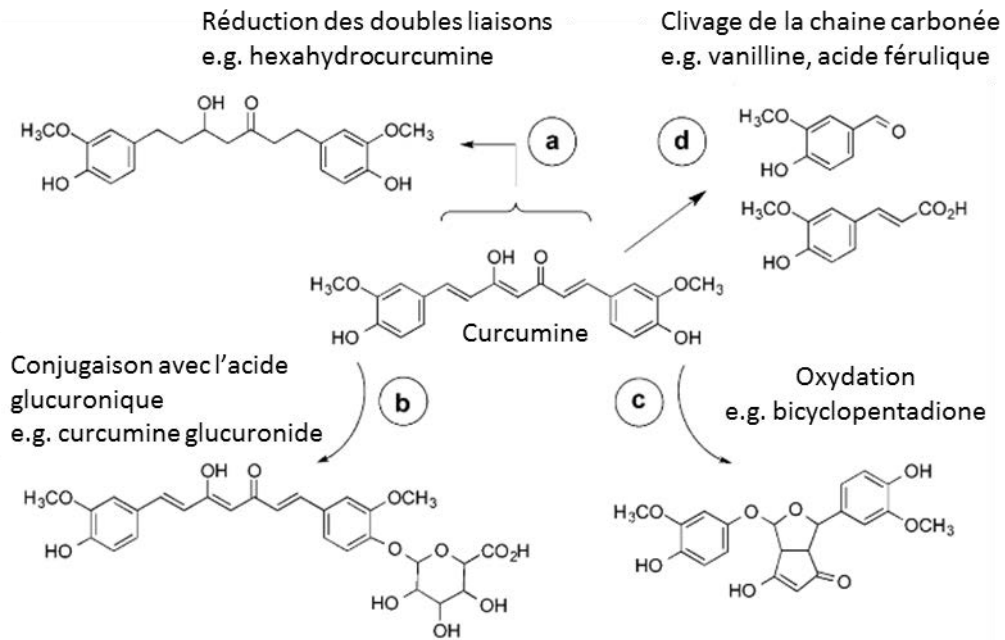
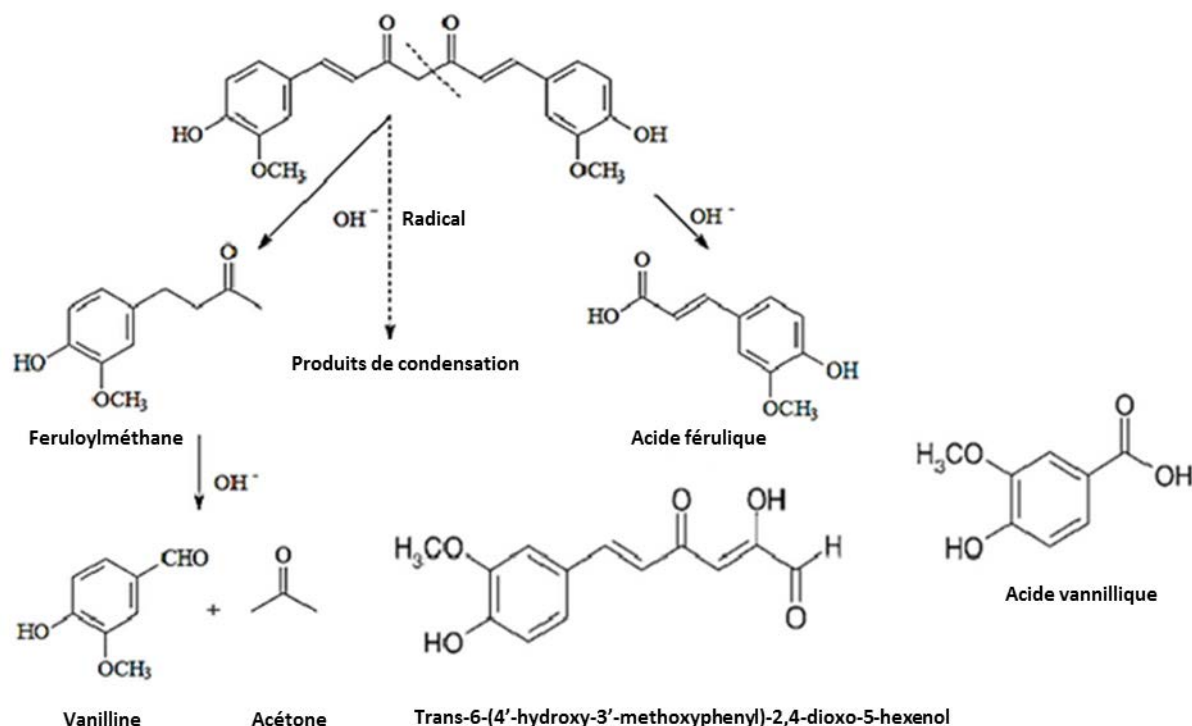


Figure 7. Les différentes voies de dégradation de la curcumine : (a) réduction (b) conjugaison (c) oxydation (d) clivage⁵⁷.

Composé et structure	Auto-oxdyation $t_{1/2}$	Produit principal
 Curcumine	Rapide (minutes)	 Bicyclopentadione
 Deméthoxycurcumine (DMC)	Lente (heures/jours)	 Deméthoxycyclopentadione
 Bisdeméthoxycurcumine (BDMC)	Stable, nécessite une oxydation chimique ou enzymatique	 Bisdeméthoxyspiroepoxide
 4'-O-méthylcurcumine	Lente (heures/jours)	 méthylbicyclopentadione
 4'-4''-O-diméthylcurcumine	Stable	ND

Tableau 3. Les structures de la curcumine, de ces analogues et des composés dérivés de l'auto-oxydation⁵⁷.

Synthèse bibliographique



ii) Le resvératrol

Le resvératrol (trans-resvératrol; trans-3,5, 4'-trihydroxystilbène) est une phytoalexine polyphénolique naturelle (Figure 9), synthétisée par une grande variété d'espèces végétales telles que la vigne, l'arachide, le pistachier en réponse aux situations de stress telles que les infections microbiennes, l'application de produits chimiques, l'irradiation aux UV, les changements de température, les dangers mécaniques et l'exposition à l'ozone ou aux ions métalliques ⁵⁹.

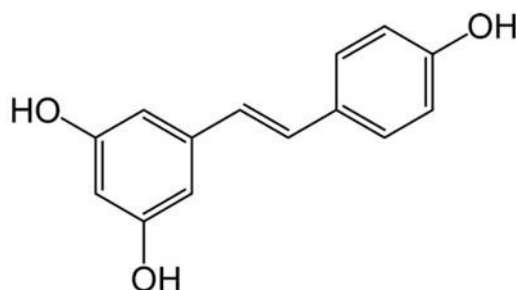


Figure 9. Structure chimique du trans-resvératrol ⁶⁰.

Le resvératrol pourrait aussi être dégradé une fois exposé à de hautes températures, à des fluctuations de pH, aux rayons UV et à certaines enzymes ⁶¹⁻⁶³. Cette dégradation est traduite par une isomérisation

du trans - resvératrol en cis- resvératrol. Ce dernier n'est pas aussi efficace en tant qu'anti-inflammatoire et antioxydant ⁶⁴ (Figure 10).

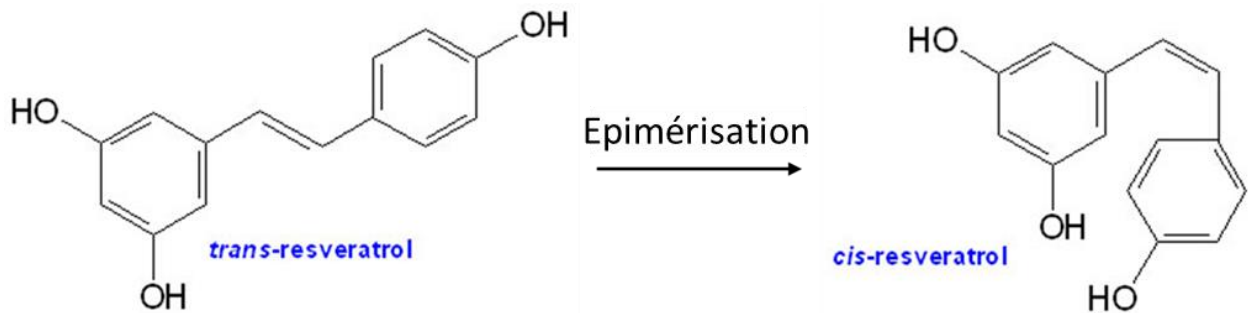


Figure 10. Epimérisation du trans-resvératrol en cis-resvératrol ⁶⁰.

iii) Le lycopène

Le lycopène (ψ , ψ -carotène), caroténoïde le plus abondant dans les tomates, est utilisé comme colorant E160d, seul ou en association avec d'autres colorants dans l'alimentation transformée (Figure 11). Les produits affectés sont, entre autres, des fromages ou leurs croutes comestibles, produits de boulangerie fine, viandes et poissons traités, assaisonnements et condiments, soupes, sauces, et divers produits agroalimentaires comme les confiseries, les boissons et produits laitiers aromatisés, les glaces, ainsi que diverses boissons alcoolisées ⁵¹. Sa dose journalière arrive jusqu'à à 0,5 mg / Kg de masse corporelle par jour ⁶⁵.

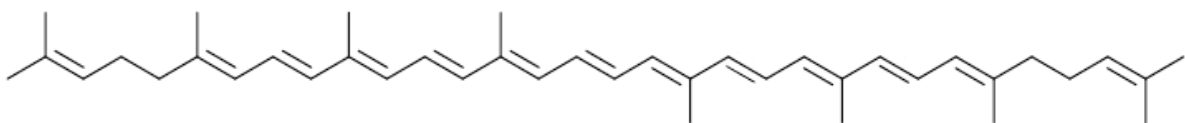


Figure 11. Structure chimique du lycopène ⁶⁶.

Cependant, en raison de la présence de doubles liaisons conjuguées dans la structure moléculaire, le lycopène est sensible aux oxydants, à la lumière et à la chaleur, et peut être facilement détérioré une fois exposé à ces facteurs ⁶⁷ (Figure 12).

Synthèse bibliographique

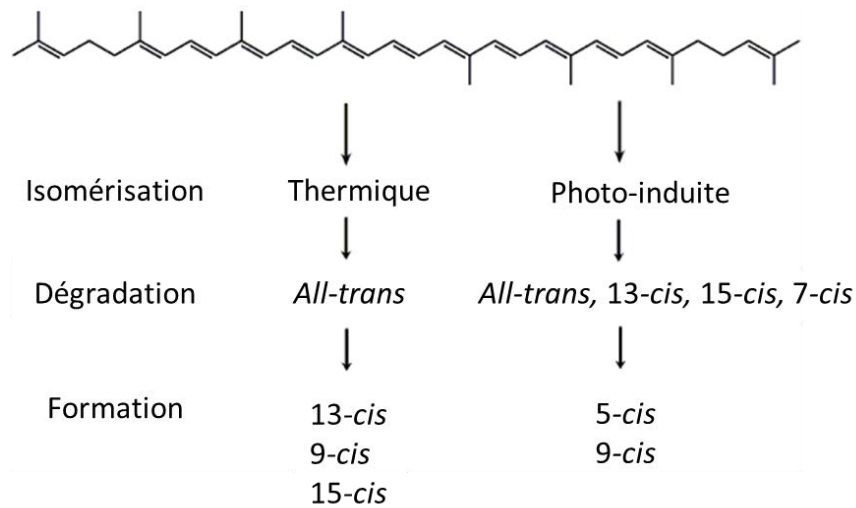


Figure 12. Les différentes voies et produits de dégradation du lycopène ⁶⁶.

iv) La lutéine

La lutéine est un caroténoïde présent dans les fruits et légumes (Figure 13). La lutéine E161b est un additif colorant utilisé seul ou en association avec d'autres colorants dans les fromages, les confitures, les pâtes à tartiner, certains poissons et produits de la pêche transformés, etc. Comme l'ensemble des colorants, il est également utilisé dans de nombreux produits agroalimentaires, confiseries et boissons gazeuses, par exemple. Il est vraisemblablement très utilisé dans l'alimentation des volailles, pour la coloration de leur chair et du jaune d'œuf.

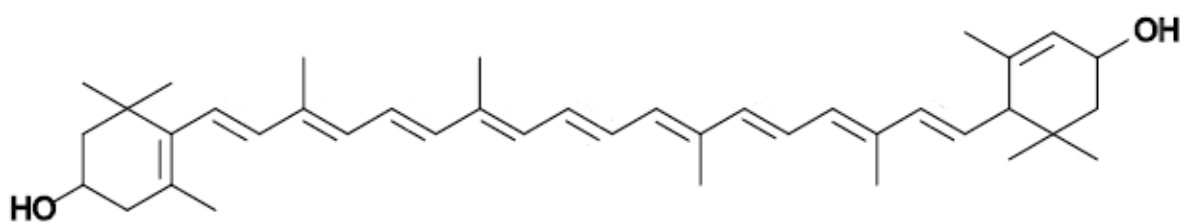


Figure 13. Structure chimique de de la lutéine ⁶⁸.

Cependant, son application dans les aliments est limitée par son instabilité en présence d'oxygène, de lumière et de hautes températures lors de son extraction due à sa structure à huit doubles liaisons conjuguées (Figure 14).

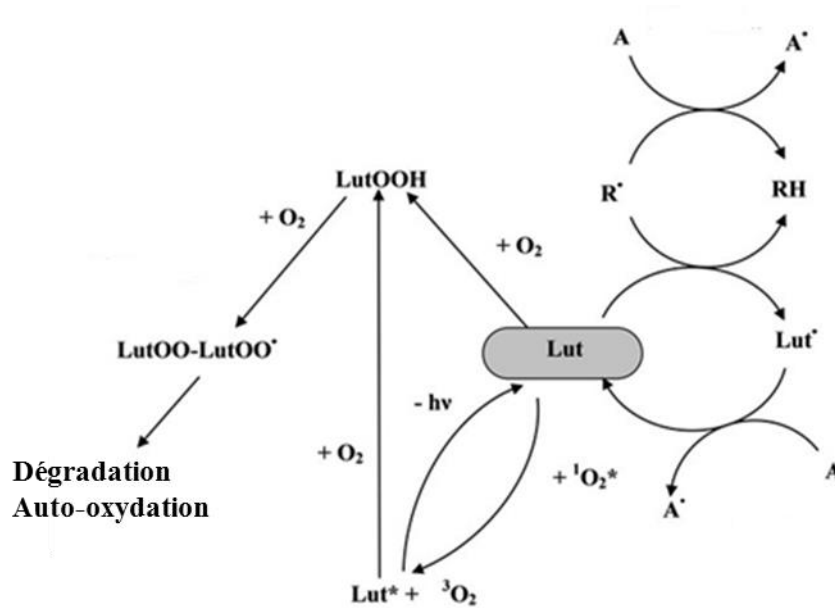


Figure 14. Les différentes voies de dégradation de la lutéine lors de son extraction ⁶⁸.

2.1.4. Les acides gras polyinsaturés

L'ajout des acides gras polyinsaturés (AGPI), connu sous le nom d'oméga-3 et oméga-6, aux aliments a connu une augmentation spectaculaire dans le marché ces dernières années. En effet, la consommation des aliments fonctionnels qui en contiennent ne cesse d'augmenter due aux diverses activités biologiques qu'ils engendrent sur la santé du consommateur ⁶⁹.

Parmi ces lipides, l'huile de lin présente une source très riche en acides gras polyinsaturés comme l'acide α -linoléique. Cependant, son utilisation dans les aliments à système aqueux est limitée par sa nature hydrophobe et sa sensibilité à la peroxydation (Figure 15). En s'oxydant, les carbones C9 et C12 de l'acide linoléique (C18:2) génèrent quatre isomères hydroperoxydes ou HPOD diènes conjugués. La formation de ces composés s'initie par l'abstraction du radical hydrogène sur le carbone en position $\Delta 11$ et se poursuit par la production d'un radical alkyle qui réagit avec l'oxygène en positions C-9 et C-13 pour produire un mélange de deux HPOD diènes conjugués (Figure 15). Ces derniers contenus dans les produits alimentaires sont absorbés par l'intestin grêle au cours de la digestion et sont reconnus comme cytotoxiques, en particulier par leurs effets délétères au niveau sanguin, et leurs propriétés pro-inflammatoires ⁷⁰.

Synthèse bibliographique

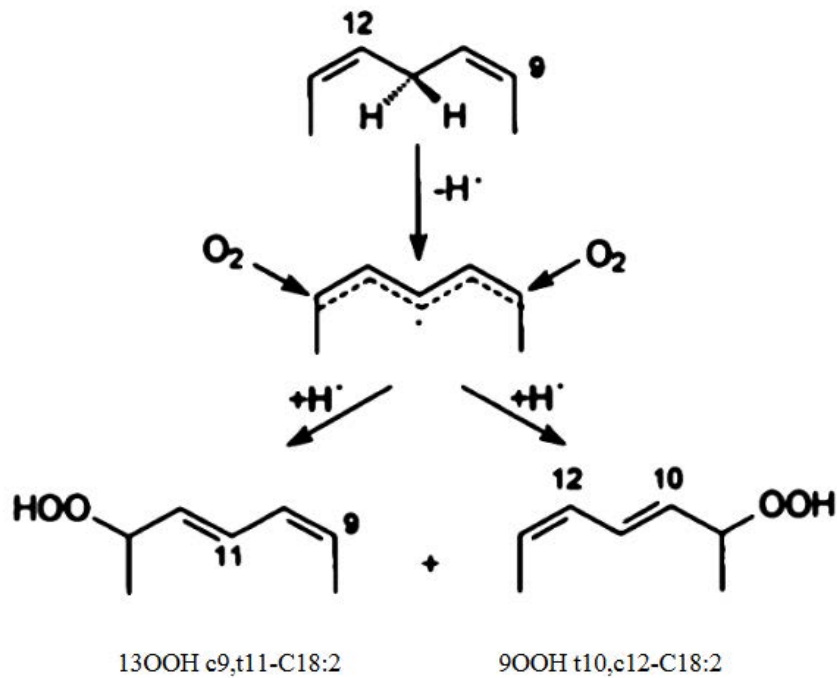


Figure 15. Peroxydation de l'acide linoléique : zoom sur le carbone en position 11 ⁷¹.

De même, l'huile d'olive contient beaucoup de triglycérides composés principalement d'acide oléique et de peu d'acides gras saturés. La perte des nutriments et de la flaveur résulte de l'oxydation, de la conversion des acides gras insaturés en saturés et de la production de produits détériorants tel que les dérivés réactifs de l'oxygène ⁷².

Sachant que les acides gras polyinsaturés ne peuvent être produits par le corps humain, leur consommation doit se faire via l'alimentation.

2.1.5. Les vitamines liposolubles

i) Le β -carotène ou Vitamine A

Le β -carotène (E160a) présente une couleur intense rouge / orange / jaune et peut être utilisée en tant que colorant naturel dans les aliments. Le bêta-carotène E160a est ajouté notamment dans les fromages, matières grasses, beurres, fruits (rouges) et légumes en conserves, confitures, potages, céréales pour petits déjeuners, saucisses, produits de la pêche traités, ainsi qu'une quantité impressionnante de produits agroalimentaires tels que les plats préparés, confiseries, glaces, boissons gazeuses ⁵¹. Sa dose journalière peut atteindre 5 mg/ kg de masse corporelle par jour.

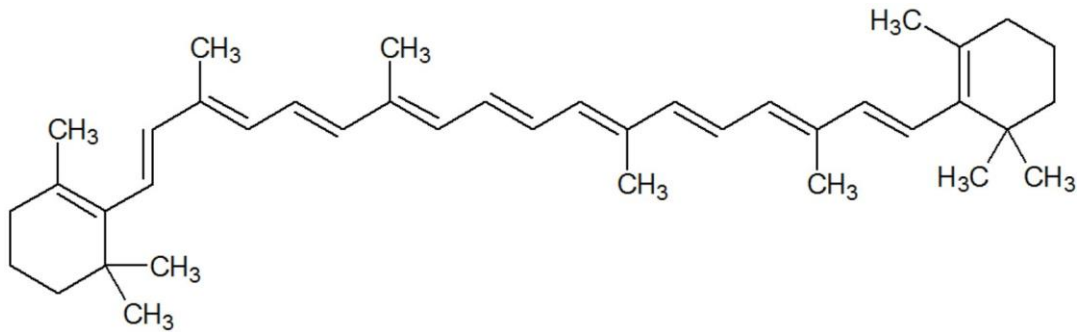


Figure 16. Structure chimique du β -carotène ⁷³.

Cependant, cette longue molécule (Figure 16) est hydrophobe et sa température de fusion est très élevée, ce qui conduit à une très faible solubilité dans l'eau et à une solubilité limitée dans l'huile à température ambiante ⁷⁴. Plusieurs mécanismes sont liés à l'oxydation des caroténoïdes en général et du β -carotène en particulier (Figures 17-18). Ainsi, le β -carotène est difficile à incorporer dans de nombreux aliments, et tend à avoir une biodisponibilité orale faible et variable. De plus, le β -carotène est une molécule polyinsaturée qui est très sensible à la dégradation chimique pendant la production alimentaire, le transport et le stockage ^{75,76}.

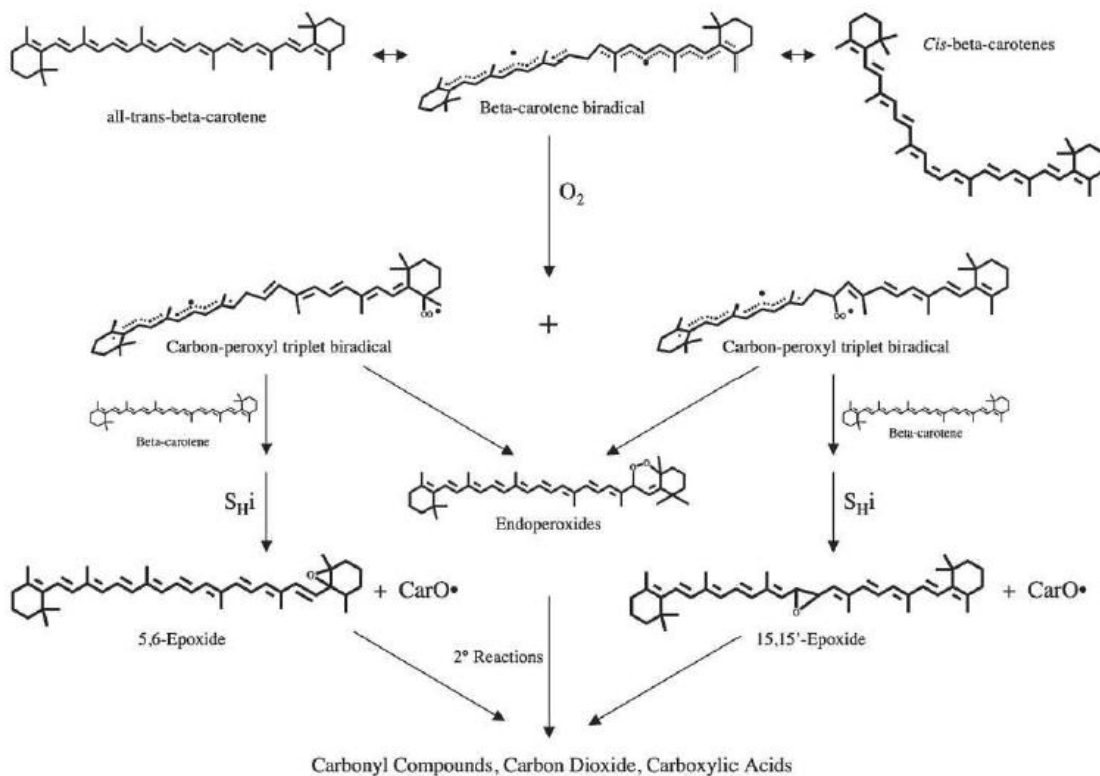


Figure 17. Les différentes voies d'oxydation du β -carotène ⁷³.

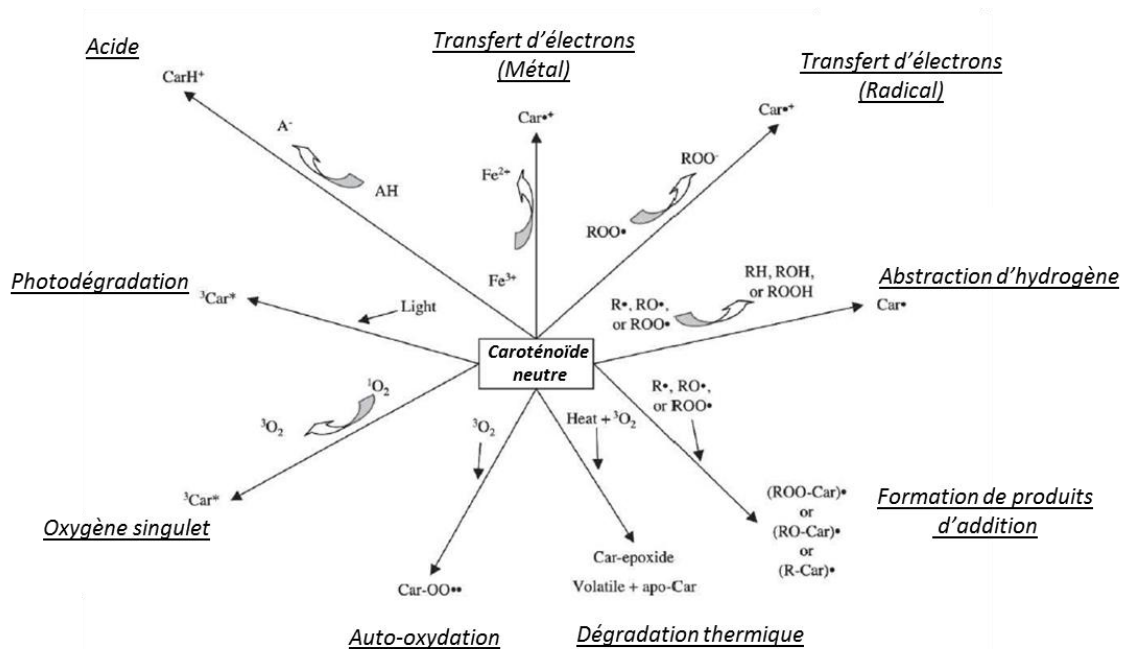


Figure 18. Les différents mécanismes d'oxydation des caroténoïdes tels que le β -carotène, la lutéine et le lycopène ⁷³

ii) Vitamine E ou α -tocophérol

La vitamine E est une vitamine liposoluble recouvrant un ensemble de huit molécules organiques, quatre tocophérols et quatre tocotriénols. La forme biologiquement la plus active est l' α -tocophérol, la plus abondante dans l'alimentation étant le γ -tocophérol. Ces molécules sont présentes en grande quantité dans les huiles végétales. Elles agissent essentiellement comme antioxydants contre les dérivés réactifs de l'oxygène produits notamment par l'oxydation des acides gras. Cela lui permet d'être utilisé en tant qu'additif alimentaire (E306, E307) ⁷⁷. Sa dose journalière peut atteindre 0,15 mg/kg de masse corporelle par jour. Il peut être ajouté dans les matières grasses et huiles (sauf huiles vierges et huiles d'olive non raffinées), les préparations pour nourrissons et enfants en bas âge, et *quantum satis* dans la fabrication d'enzymes et de nutriments ⁵¹.

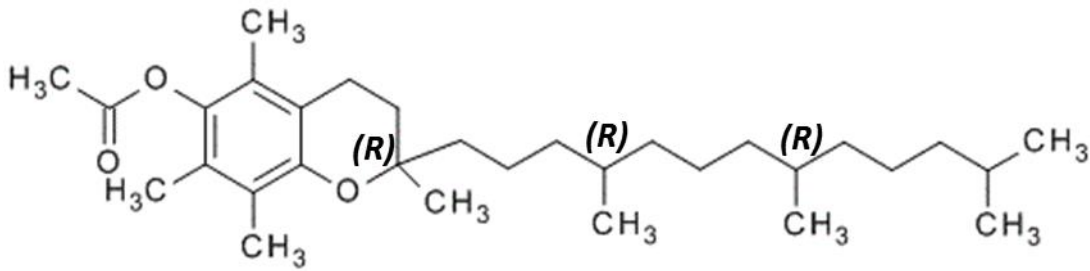


Figure 19. Structure chimique de l' α -tocophérol ⁷⁸.

Cependant, la structure chimique de ces vitamines composée de doubles liaisons conjuguées (Figure 19) les rend très sensible à l'oxygène, à la lumière et à la température ⁷⁹. En effet, les huit stéréoisomères qui constituent l' α -tocophérol subissent l'oxydation (exposition à la lumière, l'oxygène, etc.) conduisant à la dégradation des sites actifs RRR et rendant donc la vitamine E inactive.

iii) Vitamine D

Le terme de « vitamine D » recouvre deux composés (Figure 20). L'ergocalciférol, ou vitamine D₂, est présent dans l'alimentation d'origine végétale. Le cholécalciférol, ou vitamine D₃, est produit par la peau sous l'action des rayons ultraviolets mais on le trouve également dans les aliments d'origine animale.

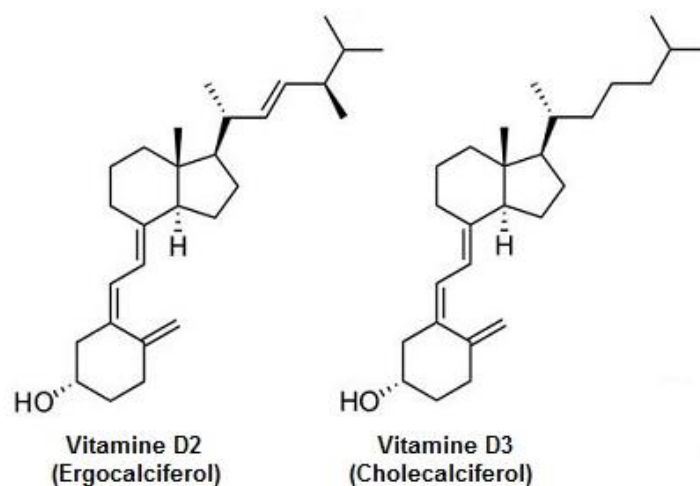


Figure 20. Structures chimiques des vitamines D₂ et D₃ ⁸⁰.

Synthèse bibliographique

La vitamine D est une vitamine liposoluble qui joue un rôle important dans la santé surtout au niveau osseux. Chez les nourrissons, une carence grave en vitamine D provoque le rachitisme ⁸¹. D'autre part, l'apport excessif en vitamine D est associé au risque d'hypercalcémie ou d'hypercalciurie et de problèmes rénaux ⁸². En outre, les compléments alimentaires et diététiques sont considérés aussi comme source de vitamine D. Puisqu'il est généralement conseillé de protéger les jeunes enfants contre la lumière directe du soleil pour prévenir le cancer de la peau, la majorité compte sur les aliments et les suppléments diététiques pour se procurer la dose de vitamine D nécessaire pour leur corps ⁸³. Toutefois, son application est limitée par une faible solubilité dans l'eau.

2.2. Les bioactifs hydrophiles

2.2.1. Les anthocyanes

Les anthocyanes naturelles sont des pigments végétaux nuancés du rose au pourpre, elles sont présentes dans une variété de fruits et légumes, des feuilles et des racines ³⁰ (Figure 21). On identifie aujourd'hui près de 600 anthocyanes. D'origine naturelle (pigment végétal), l'additif colorant composé d'anthocyanes est régulièrement présenté comme sans danger, voire bénéfique vu ses propriétés entre autres antioxydantes. Leur fort pouvoir colorant, leur solubilité en milieu aqueux et leur absence de toxicité font des anthocyanosides des colorants naturels utilisés pour remplacer les colorants synthétiques dans l'industrie agroalimentaire ⁸⁴.

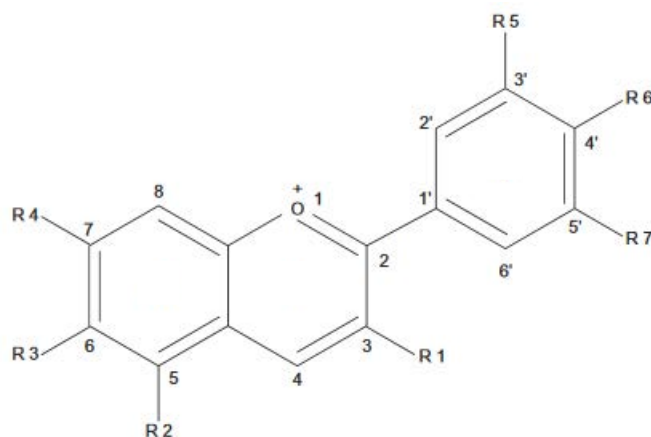


Figure 21. Structure chimique d'un anthocyane ³¹.

Cependant, il ne faut pas le confondre avec l'additif industriel E163 qui provient de l'extraction des restes de raisins noirs et de fruits rouges. L'extraction est réalisée à l'aide de principes actifs douteux comme le méthanol ou l'eau sulfitée, ou plus sûrs comme l'éthanol ou l'anhydride carbonique. Pour ce, sa dose journalière est limitée à 2.5 mg/kg de masse corporelle par jour⁵¹.

Les anthocyanes sont sensibles et dégradés à des pH acides et en présence d'oxygène^{31,85} (Figure 22). Les traitements thermiques, une exposition aux rayons UV ou l'utilisation d'enzymes induisent également la dégradation des anthocyanines. Après digestion, les anthocyanines sont absorbées au niveau de l'estomac et de l'intestin. Toutefois, les conditions dans le tractus gastro-intestinal déclenchent la dégradation de ces composés, ce qui explique pourquoi la biodisponibilité des anthocyanines est très faible⁸⁶.

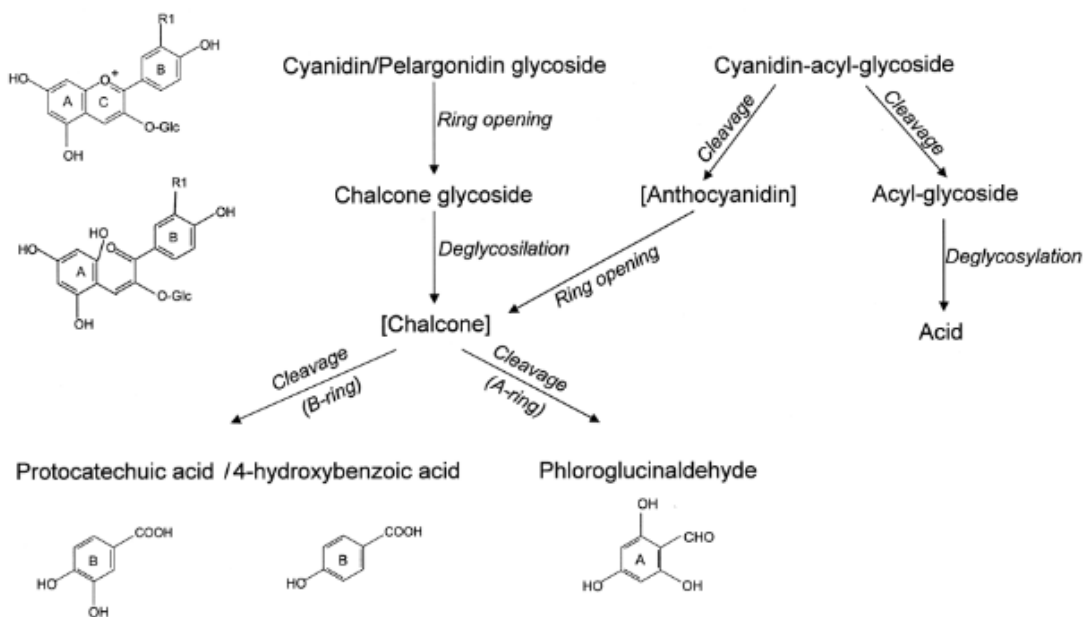


Figure 22. La dégradation d'un anthocyane à pH = 3,5⁸⁷.

2.2.2. Les vitamines hydrosolubles

i) La vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique (AA) est une vitamine hydrosoluble sensible à la chaleur et à la lumière jouant un rôle important dans le métabolisme de l'être humain et de nombreux autres

Synthèse bibliographique

mammifères. La vitamine C ou acide L-ascorbique est utilisé aussi comme additif alimentaire noté E300 (Figure 23).

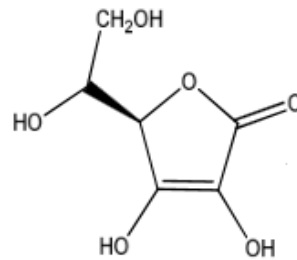


Figure 23. Structure chimique de l'acide L-ascorbique ⁸⁸.

En France, le besoin a été fixé chez l'homme à 90 mg par jour et la référence nutritionnelle pour la population à 110 mg par jour, ce qui rejoint les chiffres proposés par l'EFSA (2001) ⁸⁹. Chez la femme, l'EFSA a proposé un besoin et une référence pour la population plus faible (95 mg/j), considérant que le plateau de concentration plasmatique était obtenu pour un apport légèrement plus faible que chez l'homme. En 2013, l'EFSA confirme sa position publiée en 2006 et estime que les données sont insuffisantes pour proposer une limite de sécurité pour la vitamine C ⁹⁰.

Sachant que le corps humain est incapable de la synthétiser ni de la stocker, les quantités appropriées doivent être fournies régulièrement dans le régime alimentaire. Les fruits frais et surtout les agrumes et les légumes à feuilles vertes sont de bonnes sources d'AA ⁹¹. Cependant, ce dernier se détériore lorsqu'il est exposé à l'humidité, à l'oxygène, à la lumière et à des fluctuations de pH. En raison de son instabilité, la perte d'AA dans les fruits et légumes est accélérée après la récolte, aux températures de stockage et pendant les opérations de transformation ultérieures ⁹². L'oxydation est le principal facteur responsable de la perte d'AA conduisant à la formation de l'acide déhydroascorbique, qui est encore biodisponible. Une oxydation supplémentaire conduit à l'acide dicétogulonique et entraîne une perte complète de la bioactivité (Figure 24).

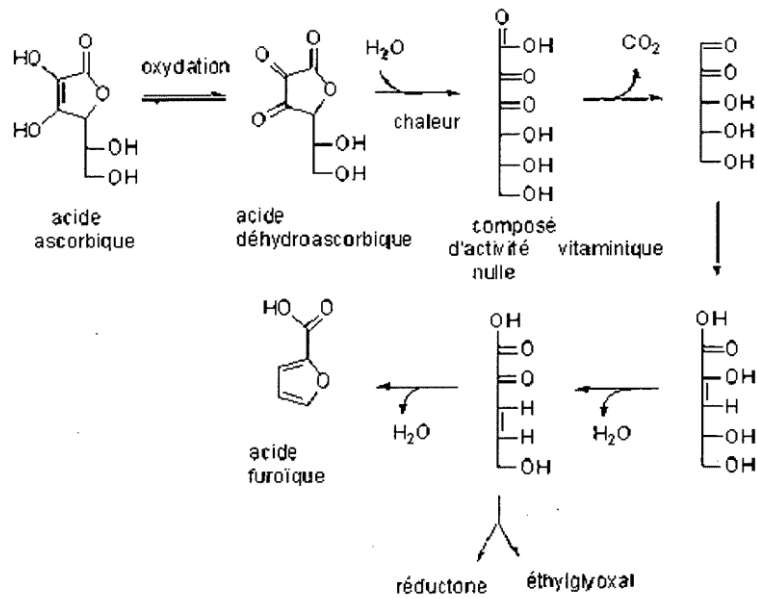


Figure 24. L'oxydation de l'acide ascorbique et ses dérivés de dégradation ⁹³.

ii) Les acides caféiques et chlorogéniques

Les polyphénols les plus connus dans le café sont les acides phénoliques et principalement l'acide caféique (Figure 25). C'est un dérivé de l'acide cinnamique qui a une structure très proche de l'acide férulique.

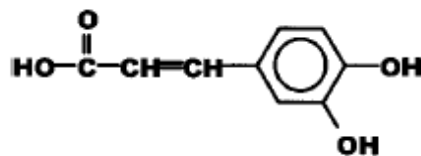


Figure 25. Structure chimique de l'acide caféique ⁹⁴.

En général, il est présent sous forme estérifiée, principalement avec l'acide quinique avec lequel il forme l'acide chlorogénique (Figure 26).

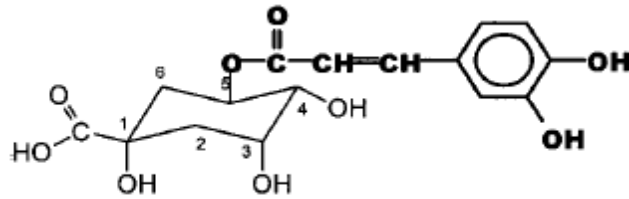


Figure 26. Structure chimique de l'acide chlorogénique ⁹⁴.

Cependant, l'acide chlorogénique présente une instabilité face à de hautes températures et s'épimerise. Il se dégrade ainsi en entraînant les acides caféique et quinique avec lui pour former des mélanoides ⁹⁵. De plus, une forte torrification induit aussi la production de composés carcinogènes et à une perte de composés bioactifs qui sont fortement oxydés en présence de lumière et d'oxygène ⁹⁶.

2.3. Les probiotiques

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants (bactéries ou levures) qui, ajoutés comme compléments à certains produits alimentaires comme les yaourts ou les céréales, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte ⁹⁷. Les bactéries lactiques sont parmi les principaux probiotiques. Leur nom vient du fait qu'elles ont la faculté de produire de l'acide lactique. Elles comprennent, notamment :

- Les lactobacilles (bactéries du genre *Lactobacillus*)
- Les bifidobactéries (bactéries du genre *Bifidus*)
- Les streptocoques (bactéries du genre *Streptococcus*).

Ces bactéries servent généralement à la production du yaourt (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*), de choucroute, de légumes lactofermentés ou encore de salami (*Lactobacillus plantarum*, extrait du levain à pain classique).

Les probiotiques sont administrés par voie orale et sont disponibles dans les produits alimentaires (yaourt) ou sous forme de capsules, sachets ou comprimés. Une fois ingérés, ils doivent survivre dans diverses conditions suite à leur passage dans le tractus gastro-intestinal (GI) telles qu'un pH acide, un

milieu riche en protéases et en sels biliaires ⁹⁸. De plus, certaines bactéries probiotiques sont sensibles à l'oxygène et exigent des nutriments spécifiques pour croître ⁹⁹. Les *Bifidobacterium* qui sont les plus utilisés dans les produits fonctionnels, sont notamment sensibles à l'environnement acide stomacal ^{100,101}. Ainsi, le problème principal de l'incorporation des probiotiques dans les aliments est de conserver ces cellules vivantes pendant les étapes de préparation, de stockage, de consommation et une fois ingérées dans le corps humain afin d'arriver vivantes et efficaces jusqu'aux sites cibles ⁹⁸.

3. L'encapsulation : Définition et matrices

3.1. Définition

L'encapsulation, dont le développement a débuté il y a environ 60 ans, regroupe l'ensemble des technologies permettant l'enrobage ou le piégeage de principes actifs sous forme solide, liquide, ou gazeuse au sein de particules individualisées dites membranes ou matrices et dont la taille s'échelonne entre quelques nanomètres et quelques millimètres ¹⁰².

L'encapsulation d'un principe actif répond à quatre grands objectifs pouvant être combinés :

- l'immobilisation (e.g. les enzymes mis en œuvre dans le cadre de procédés de bioconversion en continu ou en batch)
- la protection ou la stabilisation vis-à-vis de l'environnement (e.g. les antioxydants tels que la curcumine contre l'oxydation, les bactéries probiotiques dans le milieu gastrique)
- la libération contrôlée ou retardée sur le site d'action (e.g. vitamines, arômes, bioactifs à visée thérapeutique)
- la modification des propriétés structurales, organoleptiques et fonctionnelles (e.g. masquage d'odeurs et de goût, amélioration des propriétés d'écoulement ou de réhydratation d'une poudre)

Afin de pouvoir répondre à ces objectifs, cinq critères sont importants pour un système d'encapsulation efficace à visée alimentaire ¹⁰³ :

Synthèse bibliographique

- Le système doit être formulé en utilisant le plus possible des méthodes en accord avec les principes de la chimie verte c'est-à-dire principalement sans solvants organiques toxiques tels que l'eau, les acides organiques, l'acétate, le lactate, l'éthanol ¹⁰⁴.
- Le système doit pouvoir incorporer des composés bioactifs dans des matrices alimentaires présentant une stabilité physico-chimique élevée et avoir un impact minimal sur les propriétés organoleptiques du produit final ¹⁰⁵.
- Le système doit être capable de protéger les composés encapsulés de l'interaction avec d'autres ingrédients alimentaires et de la dégradation due à la lumière, à la température ou au pH ¹⁰³.
- Le système doit maximiser l'absorption des composés encapsulés lors de la consommation et assurer une libération contrôlée en réponse à un stimulus environnemental spécifique ^{103,104}.
- Le système doit être adaptable à une production au niveau industriel ^{105,106}.

Chaque composant possède ses propres caractéristiques qui doivent être prises en compte lors du design d'un nouveau système d'encapsulation. Par exemple, les composés phénoliques présentent une importante activité antioxydante. Cependant, ils sont très faiblement biodisponibles une fois ingérés puisqu'ils se transforment en métabolites méthylés, sulfatés et glucuronés ¹⁰⁷. La micro ou nano encapsulation s'avère être une bonne solution afin d'augmenter leur absorption au niveau des cellules épithéliales ^{108,109}. Plus précisément, McClements en 2014 démontre que la microencapsulation du resvératrol augmente sa biodisponibilité quand il est encapsulé dans des liposomes ou dans des systèmes à base de biopolymères à base de polysaccharides tels que le chitosane ou la pectine ¹¹⁰.

La stabilité et le relargage du bioactif sont également des propriétés importantes des micro- ou nano-vecteurs ; elles sont dépendantes de la nature et de la composition de la matrice. Ces composants peuvent être des ingrédients non laitiers tels que les sucres, les cyclodextrines, les maltodextrines, l'amidon natif ou modifié, les gommes, les protéines végétales ou marines, les protéines animales (gélatine), les systèmes à base de lipides (huiles, beurres, phospholipides) ou des ingrédients laitiers

tels que les caséines sous forme monomérique, micellaire ou sous forme de caséinates, les protéines sériques comme la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine, et enfin la matière grasse laitière anhydre ou MGLA.

3.2. Les matrices d'encapsulation

3.2.1. Les matrices d'origine non laitière

3.2.1.1. Les émulsions

i) Définition

Une émulsion est, selon la définition courante, une dispersion d'un liquide en fines gouttelettes dans un autre liquide, les deux liquides étant non miscibles ¹¹¹ :

- le liquide sous forme de gouttelettes est qualifié de phase dispersée, phase discontinue ou phase interne ;
- l'autre liquide est appelé phase dispersante, phase continue ou phase externe.

L'une des deux phases est hydrophobe ou lipophile et est qualifiée couramment de phase huileuse (mais elle n'est pas forcément lipidique). L'autre est hydrophile ou phase aqueuse.

La phase lipophile, comporte des huiles, des cires et des graisses (respectivement liquides, solides ou semi-solides à température ambiante) d'origine végétale ou animale. Des substances synthétiques dérivées ou non de substances naturelles sont aussi utilisées. La phase huileuse d'une émulsion est généralement composée d'un mélange d'ingrédients. Le tableau 4 donne quelques exemples d'ingrédients de la phase huileuse.

Tableau 4. Exemples des ingrédients naturels d'origines animale ou végétale de la phase huileuse ¹¹².

Origine	Cires	Graisses	Huiles
Animale	Cire d'abeille Blanc de baleine	Lanoline	Huile de baleine, foie de requin, tête de saumon
Végétale	Cire de Carnauba	Beurre de cacao Beurre de karité	Huile d'arachide, d'olive, d'amande, de soja...

Synthèse bibliographique

La phase aqueuse ou phase hydrophile contient l'eau et divers composants hydrosolubles (solutés) ou dispersés tels que les hydrocolloïdes. Les solutés de la phase aqueuse sont de nature diverse : ions minéraux, acides, bases, vitamines, glucides, etc.

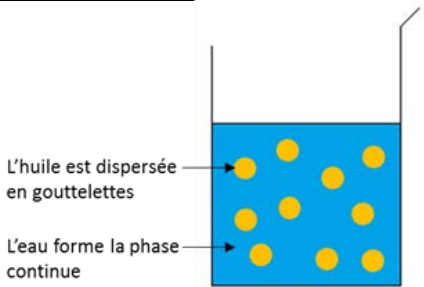
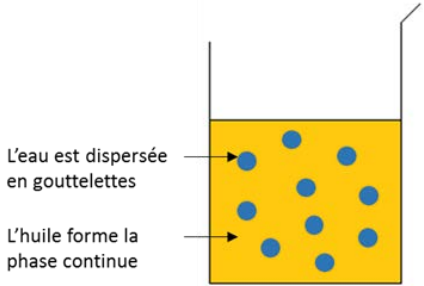
ii) Les divers types d'émulsions

Selon la taille des gouttelettes, les émulsions peuvent être classées en macroémulsion (1 à 10 μm), mini-émulsion et nano-émulsion selon la taille des particules de la phase dispersée (0,1 à 1 μm).

- Les émulsions simples

Une émulsion simple est une émulsion composée d'une phase hydrophile, d'une phase lipophile et d'un émulsifiant. Les différents types d'émulsions simples sont représentés dans le tableau 5.

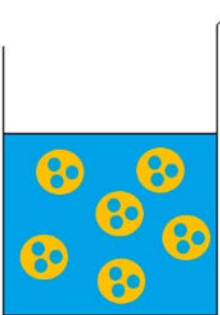
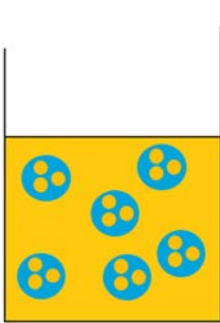
Tableau 5. Les différents types d'émulsion simple.

Sens de l'émulsion	Phase dispersée	Phase dispersante	Représentation
Emulsion Huile dans Eau = émulsion directe	Lipophile	Hydrophile	
Emulsion Eau dans huile = émulsion inverse	Hydrophile	Lipophile	

- Les émulsions multiples

Il s'agit d'émulsions ou de dispersions d'une émulsion dans une phase dispersante. Les émulsions doubles représentées dans le tableau 6 correspondent au cas le plus simple des émulsions multiples mais qui sont les plus utilisés en tant que matrices d'encapsulation ¹¹³ (Tableau 6).

Tableau 6. Les deux types d'émulsions doubles.

Sens de l'émulsion	Emulsion dispersée	Phase dispersante	Représentation
Dispersion d'une émulsion directe dans une phase aqueuse	directe	Hydrophile	
Dispersion d'une émulsion inverse dans une phase huileuse	inverse	Lipophile	

L'encapsulation des bioactifs dans les émulsions permet de surmonter les problèmes liés à leur faible solubilité et biodisponibilité dans les solutions aqueuses mais aussi à leur instabilité face à l'oxydation. La concentration en curcumine en phase aqueuse alors qu'elle est encapsulée dans une émulsion a ainsi été augmentée de près de 10 000 fois à $2.93 \pm 0.09 \text{ mg.mL}^{-1}$ par rapport à sa concentration en phase aqueuse qui est de $1.003 \times 10^{-3} \pm 3.84 \times 10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$ ¹¹⁴. Des émulsions solides dont la phase hydrophobe est composée de lipides solides à température ambiante (beurres) sont également utilisées en tant que matrices d'encapsulation. Les nanoparticules solides à base de lipides ou SLN (Solid Lipid Nanoparticles) permettent aussi d'augmenter la biodisponibilité de bioactifs ¹¹⁵. Des études

Synthèse bibliographique

ont aussi démontré que l'encapsulation de polyphénols, extraits de marc de raisin, par des émulsions doubles huile/eau/huile composées d'huile de palme et d'eau a permis d'éviter la dégradation de ces polyphénols ¹¹⁶. Les émulsions sont aussi utilisées afin de protéger les biocomposés sensibles à l'oxydation pendant la période de stockage et d'optimiser la durée de relargage. Le relargage des polyphénols encapsulés par ces émulsions doubles a été prolongé par exemple de 15 jours supplémentaires ¹¹⁷ dans des conditions de stockage à pH acides.

3.2.1.2. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules sphériques formées par des bicouches lipidiques concentriques, emprisonnant entre elles des compartiments aqueux ¹¹⁸. Ils peuvent être obtenus à partir d'une grande variété de lipides amphiphiles, dont les plus couramment utilisés sont les phospholipides ¹¹⁸. Basé sur la taille et le nombre de bicouches, les liposomes peuvent être classés comme suit ¹¹⁸:

- Les liposomes multilamellaires ou MLV (multilamellar vesicle) (composés de plusieurs bicouches) ;
- Les petits liposomes unilamellaires ou SUV (small unilamellar vesicle) (taille < 0,1 µm) ;
- Les gros liposomes unilamellaires ou LUV (large unilamellar vesicle) (taille > 0,1 µm) ;
- Les liposomes unilamellaires géants ou GUV (giant unilamellar vesicle) (taille > 0,5 µm).

Les liposomes ont connu trois générations durant leur évolution en vecteursfurtifs et spécifiques (Figure 27).

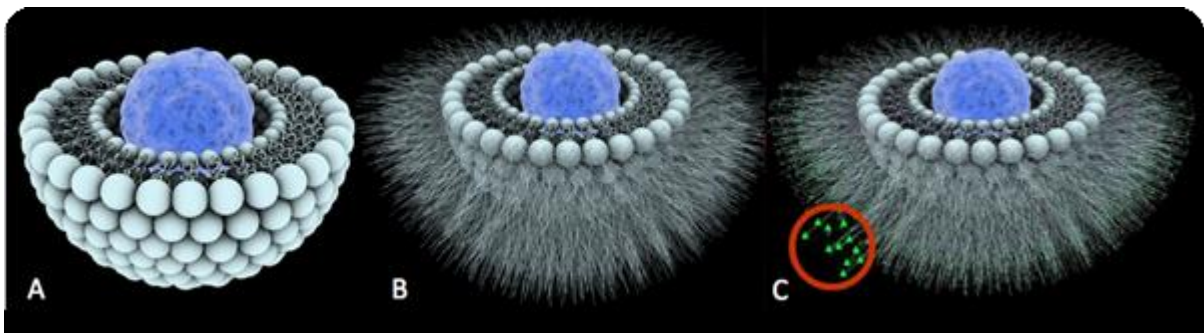


Figure 27. Les trois générations de liposomes. A. Première génération. B. Deuxième génération pour un ciblage passif. C. Troisième génération avec des ligands pour un ciblage actif (entourés en rouge) ¹¹⁹.

Les liposomes permettent de transporter des bioactifs hydrophiles et lipophiles grâce à leur noyau aqueux et à leur bicouche phospholipidique. Ces bioactifs sont protégés face aux diverses conditions du milieu (pH, température, présence d'oxygène, force ionique) ¹¹⁸. Le relargage du bioactif peut être retardé en ajoutant du cholestérol qui améliore la rigidité de la structure et la résistance du système liposomal à la dégradation *in vivo* ou *in vitro* : le bioactif est protégé contre la digestion stomacale et est fortement absorbé au niveau gastro-intestinal ce qui implique l'amélioration de sa biodisponibilité ¹²⁰. En effet, la biodisponibilité de la curcumine et son absorption au niveau intestinal ont été améliorées suite à son encapsulation dans des liposomes à base de lécithine commerciale ¹²¹. D'autre part, la stabilité du resvératrol encapsulé dans un liposome à base de phosphatidylcholine de soja, de cholestérol et d'un co-émulsifiant, est plus importante comparée à celle du resvératrol natif ou sous forme libre non encapsulée ^{122,123}. Les liposomes permettent aussi la protection des enzymes protéolytiques dans la production fromagère ¹²⁴⁻¹²⁶ : les enzymes encapsulées permettent de produire un fromage à texture et saveur optimales et en moins de temps. Les liposomes permettent aussi de protéger la vitamine C de la température de pasteurisation une fois incorporée dans le lait ¹²⁷.

3.2.1.3. Les systèmes d'encapsulation à base de polysaccharides

i) L'amidon

L'amidon, glucide de réserve, est constitué de 98-99 % de D-glucose et d'une fraction non glucidique constituée essentiellement de protéines, de lipides, et de matière minérale (phosphore en particulier). Elle est composée principalement de 70-80 % d'amylopectine (Figure 28) et de 20-30 % d'amylose (Figure 29).

Synthèse bibliographique

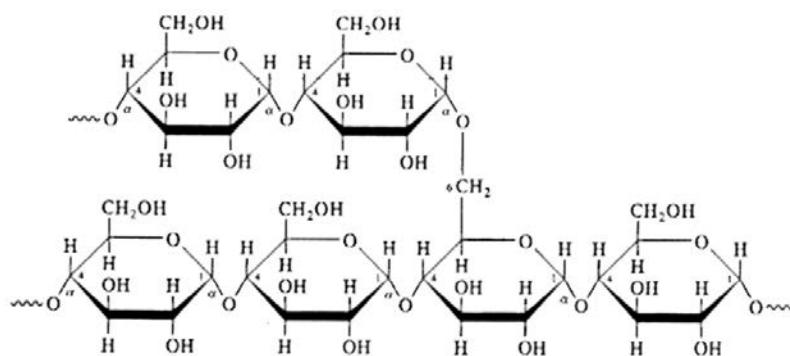


Figure 28. Structure chimique de l'amylopectine ¹²⁸.

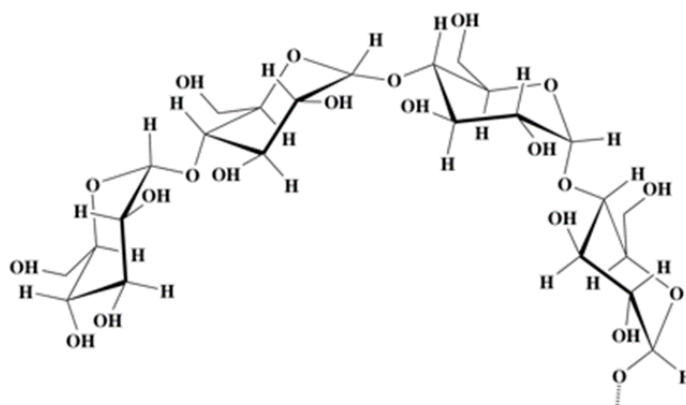


Figure 29. Structure chimique d'amylose ¹²⁸.

L'amidon (principalement l'amylose) a la capacité grâce à sa structure en hélice d'encapsuler des biomolécules et ce par inclusion ^{129,130}. Cette encapsulation permet à l'amidon de maïs d'effectuer un relargage contrôlé des bioactifs tels que les acides gras (oméga 3), l'acide α -linoléique etc ^{129,131}. L'amidon est en général utilisé dans les matrices d'encapsulation mixte. L'incorporation de l'amidon dans les billes d'alginate améliore la sphéricité, la densité, la rigidité et la qualité de ces billes. En effet, les microgranules d'amidon ont la capacité de renforcer le réseau hydrogel et de remplir les cavités du réseau interstitiel ¹³². Ces hydrogels renforcés par l'amidon permettent un relargage contrôlé et une meilleure protection de l'activité antioxydante des polyphénols extraits d'*Ilex paraguariensis* ¹³³.

Les amidons modifiés E 1400 ⁵, sont des amidons indigènes qui ont été changés soit chimiquement soit physiquement afin d'améliorer leurs propriétés fonctionnelles (viscosité, apparence et morphologie, résistance aux enzymes, etc.) pour un usage spécifique. Les modifications chimiques peuvent se faire par réduction ou augmentation de la masse molaire et ce par hydrolyse ou

désesterification, par stabilisation en greffant des groupements chimiques à la place des fonctions hydroxyles, et par fonctionnalisation en greffant des groupements hydrophobes ¹²⁸. Les modifications physiques, elles, font suite à une induction de réarrangements moléculaires ou suite à la cristallisation de l'amidon dans des conditions environnementales d'humidité relative et de température entre les températures de transition vitreuse et les températures de fusion : ce sont l'*annealing* et le *Heat Moisture Treatment* (HMT) ¹²⁸. Suite à ces traitements thermiques, les amidons présentent des températures de gélatinisation plus élevées (2 à 5 °C par rapport à l'amidon natif) et un gonflement moins important. Des amidons modifiés résistants à l'alpha- amylase sont utilisés dans les formulations alimentaires diététiques telles que les cookies ou les muffins. De plus, les amidons modifiés ont servi de matrice d'encapsulation d'arômes tels que l'oléorésine ¹³⁴, le cumin ¹³⁵ et les arômes de poulet rôti (benzaldehyde, dimethyl trisulfide, acide 2-mercaptopropionic et benzothiazole) ¹³⁶.

ii) Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CD) sont des molécules-cage ou cages moléculaires d'origine naturelle qui permettent d'encapsuler diverses molécules ¹³⁷. Ce sont des oligomères cycliques composés de n chaînes de glucopyranose liés en α -(1,4). Trois familles sont principalement utilisées ou étudiées les α - , β - et γ -cyclodextrines formées respectivement de 6, 7 et 8 chaînes $C_6H_{10}O_5$ ¹³⁸ (Figure 30).

Synthèse bibliographique

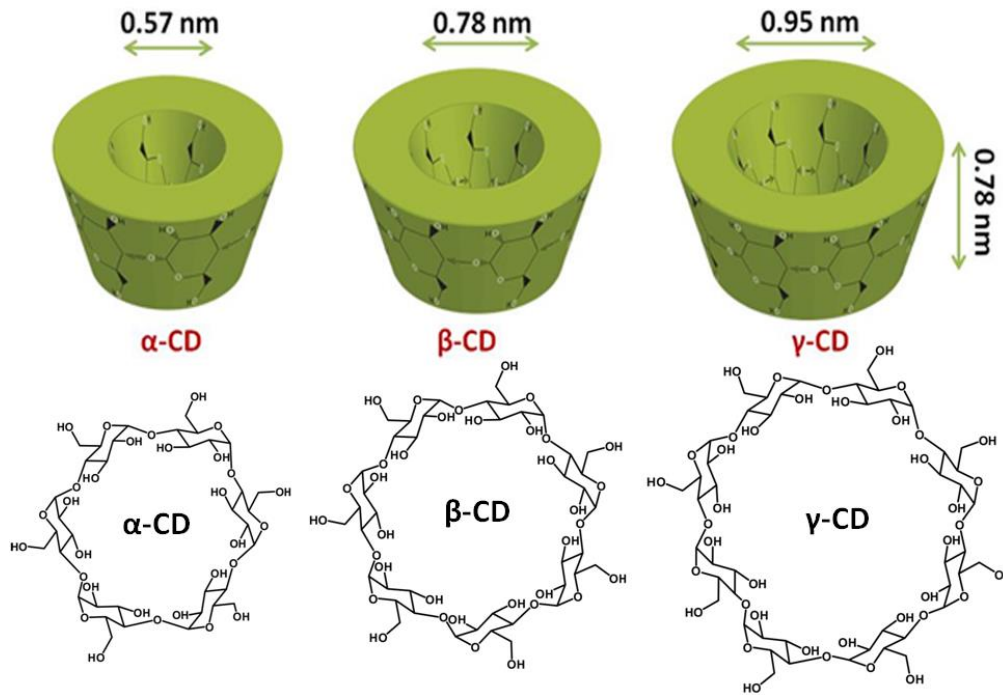


Figure 30. Les structures des trois familles principales de cyclodextrines classées selon le nombre d'unités de glucose présentes : α -, β - γ -CDs (avec 6, 7, 8 unités de glucose respectivement) ¹³⁹.

Les cyclodextrines possèdent une structure en tronc de cône, délimitant une cavité en leur centre. Cette cavité présente un environnement carboné apolaire et plutôt hydrophobe (squelette carboné et oxygène en liaison éther), capable d'accueillir des molécules peu hydrosolubles, tandis que l'extérieur du tore présente de nombreux groupements hydroxyles, conduisant à une bonne solubilité (mais fortement variable selon les dérivés) des cyclodextrines en milieu aqueux. Grâce à cette cavité apolaire, les cyclodextrines sont capables de former des complexes d'inclusion en milieu aqueux avec une grande variété de molécules-incorporées hydrophobes ¹⁴⁰. Une ou plusieurs molécules peuvent être encapsulées dans une, deux ou trois cyclodextrines. La formation de complexe suppose une bonne adéquation entre la taille de la molécule à incorporer et celle de la cyclodextrine. Les liaisons hydrogène et de Van der Waals ainsi que les interactions hydrophobes facilitent la formation de complexes stables entre les molécules peu hydrophiles et la cavité hydrophobe apolaire de la CD ¹⁴¹. L'intérieur de la cavité apporte un microenvironnement lipophile dans lequel peuvent se placer des molécules non polaires. L'industrie agroalimentaire se sert communément (et depuis plus de 20 ans au Japon) des cyclodextrines en tant que matrices d'encapsulation. Des CD ont été utilisées comme agents

d'encapsulation à diverses fins telles que la stabilisation d'arômes^{142,143}, de l'acide docosahexaénoïque (DHA), des vitamines¹⁴⁴ mais aussi pour la stabilisation des émulsions telles que la mayonnaise ou la margarine en tant qu'additif émulsifiant noté E459. Ne présentant pas d'effets secondaires, l'utilisation des CD en tant qu'additif se fait en quantum satis. Les CD sont aussi utilisées comme exhausteur de goût en permettant un ajout facile en leur sein de composés gustatifs ou pour fixer des molécules trop volatiles^{145,146} et prolonger par exemple la durée de perception des arômes des chewing-gums. L'inclusion des polyphénols tels que le resvératrol¹⁴⁷⁻¹⁴⁹, la quercétine¹⁵⁰, l'hespérétine¹⁵¹ et la curcumine¹⁵² dans les CD leur permet d'atteindre des concentrations plus élevées dans les solutions aqueuses et protège leur activité antioxydante de l'oxydation. Les CD permettent aussi d'encapsuler les acides caféiques afin d'améliorer la concentration en phase aqueuse de ces derniers, leur photostabilité et de réduire leur dégradation¹⁵³. Les CD peuvent constituer avec les SLN des matrices d'encapsulation mixtes permettant par exemple d'améliorer la stabilité et la résistance de la curcumine face à l'oxydation¹¹⁵.

Les cyclodextrines peuvent être modifiées afin d'améliorer leurs propriétés physicochimiques (augmenter leur solubilité dans un solvant donné) et/ou le pouvoir de complexation de leur cavité avec une molécule hôte. C'est également un moyen de créer des molécules originales avec des fonctions spécifiques, trouvant des applications variées au-delà des frontières de la chimie classique (une activité catalytique de type enzymatique, des propriétés de vectorisation, etc.) (Figure 31).

Synthèse bibliographique

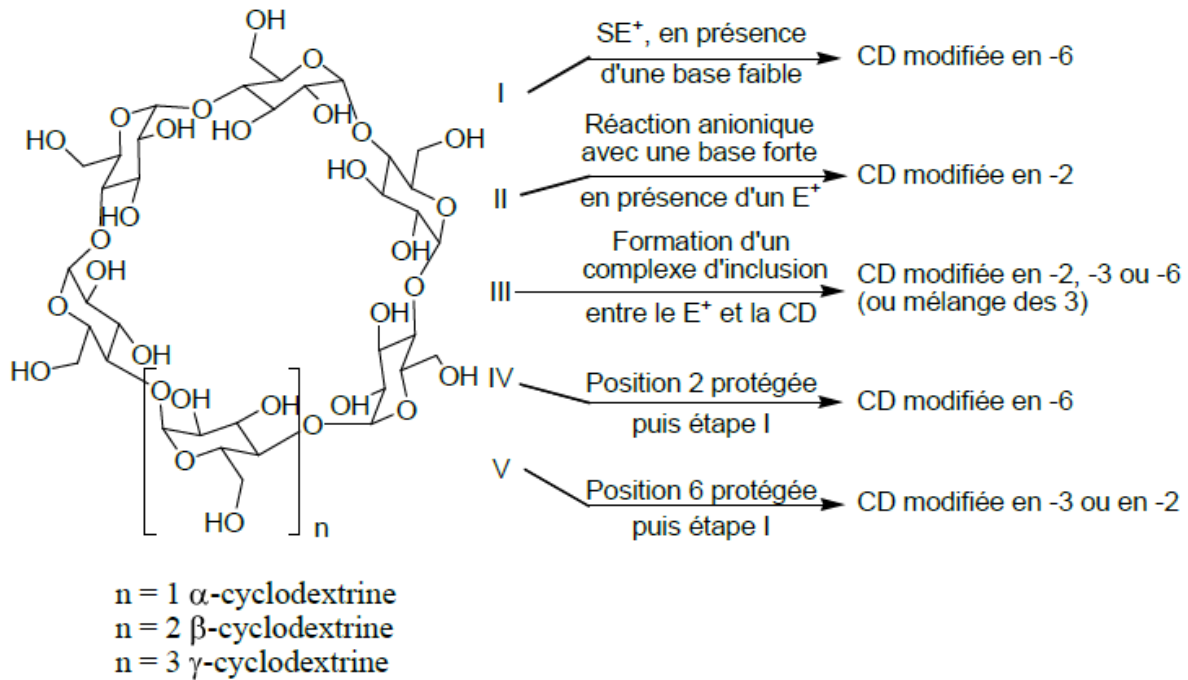


Figure 31. Présentation générale des modifications sélectives des CDs ¹⁵⁴.

Les facteurs qui influencent les modifications sélectives d'une CD sont liés à sa nature structurale, les principaux étant la nucléophilie des groupements hydroxyles et la capacité de la cyclodextrine à former des complexes d'inclusion avec les réactifs et les solvants utilisés ¹⁵⁴. En effet, les cyclodextrines possèdent trois types de groupes hydroxyles situés sur les positions 2, 3 et 6 des unités glucoses. Les hydroxyles en position 6 sont les hydroxyles primaires, ce sont les plus nucléophiles et les plus accessibles, ceux en position 2 sont les plus acides et ceux en position 3 sont les plus inaccessibles et donc les moins réactifs. La structure des CDs est, en partie, rigidifiée par les liaisons hydrogènes intramoléculaires établis entre les groupes hydroxyles en position 2 et 3 des unités glucose adjacentes. La présence de nombreux hydroxyles et leurs différences de réactivité offrent de nombreuses possibilités de réaction. En effet, il existe des réactions de per-substitutions, de mono-substitutions, et de poly-substitutions, qui peuvent modifier un, deux ou trois hydroxyles ¹⁵⁴.

iii) Les alginates

Les alginates sont des polysaccharides obtenus à partir d'une famille d'algues brunes : les laminaires ou les fucus. Ce sont des polymères formés de deux monomères liés ensemble : le mannuronate ou

acide mannuronique dont certains sont acétylés et le guluronate ou acide guluronique. La liaison osidique est en β (1 \rightarrow 4) (Figure 32).

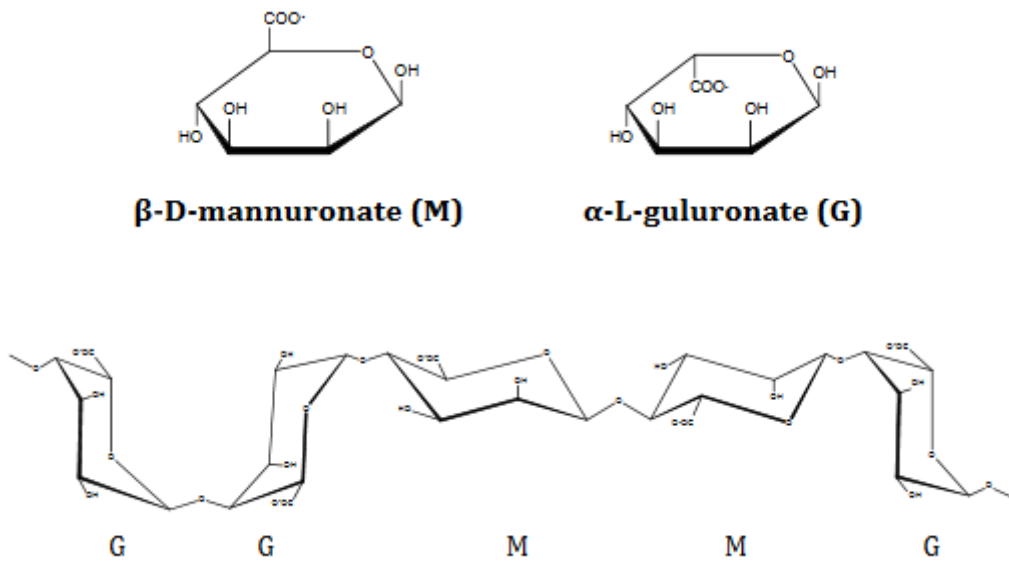


Figure 32. Les structures chimiques des monomères d'acides uroniques (M) et (G) formant l'alginate copolymère à blocs composé de régions homopolymériques M et G ¹⁵⁵.

La proportion et la distribution de ces deux monomères sont déterminantes sur les propriétés physiques et chimiques de l'alginate ¹⁵⁶. La composition chimique de l'alginate varie selon les diverses espèces d'algues, les différentes parties de la même plante et fluctue avec les changements saisonniers. Néanmoins par sélection de matières premières aux différentes propriétés, il est possible de fabriquer une variété d'alginate aux caractéristiques constantes ¹⁵⁵. Les alginates peuvent former des gels durs et thermostables utilisés comme additifs alimentaires (E400 à E405) permettant la reconstruction des aliments (enveloppe du saucisson, jambon, cordons bleus, poisson pané, etc.). Ils donnent une texture onctueuse à nombre d'aliments tels que les crèmes glacées ⁵. Les alginates sont utilisés comme épaississants, gélifiants, émulsifiants et stabilisants de produits industriels les plus variés depuis les gelées alimentaires, les desserts lactés gélifiés etc. Les billes d'alginates sont également utilisées en tant que matrices pour encapsuler des médicaments ou des substances biologiques fragiles (enzymes, microorganismes, cellules animales ou humaines) ^{157,158}. En effet, l'encapsulation des probiotiques dans les billes d'alginate permet d'augmenter leur viabilité ¹⁵⁹⁻¹⁶². Elle

Synthèse bibliographique

permet aussi un relargage contrôlé des polyphénols telle que la curcumine ¹⁶³. Généralement les billes d'alginate sont associées au calcium, au chitosane et forme des matrices mixtes plus résistantes ^{133,164} aux contraintes mécaniques .

Les alginates de sodium se dissolvent dans l'eau en formant des solutions colloïdales visqueuses à comportement pseudoélastique et ce pour de faibles concentrations. L'addition progressive de cations divalents (Ca^{2+} par exemple) provoque la formation d'un gel élastique, non thermoréversible: les segments guluroniques à conformation plissée retiennent les ions calcium par coordination, en coopérant avec une chaîne parallèle. Les ions calcium s'associent préférentiellement aux fragments poly-guluronate plutôt qu'aux fragments poly-mannuronate (Figure 33) ¹⁶⁵.

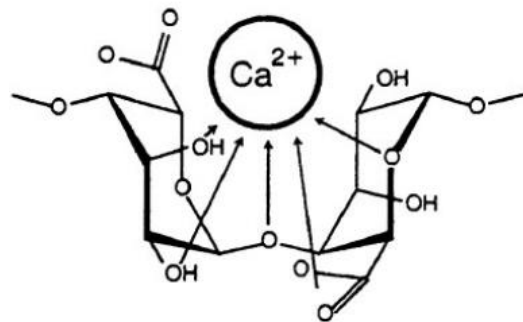


Figure 33. Liaisons covalentes des ions calcium avec les résidus poly-G des polymères d'alginate ¹⁶⁵.

En effet, les blocs poly-guluronate, en raison de leur conformation spatiale, permettent une chélation plus énergétique des ions. Ces derniers sont retenus dans une « cage » et interagissent avec les fonctions carboxylates et les atomes d'oxygène des fonctions hydroxyles. Les ions calcium sont beaucoup mieux retenus que par de simples liaisons ioniques. Cet enchaînement régulier de type « egg box » (Figure 34) se reproduit périodiquement : il se forme un réseau tridimensionnel à zones organisées reliées par les segments poly-M ou poly-(M-G).

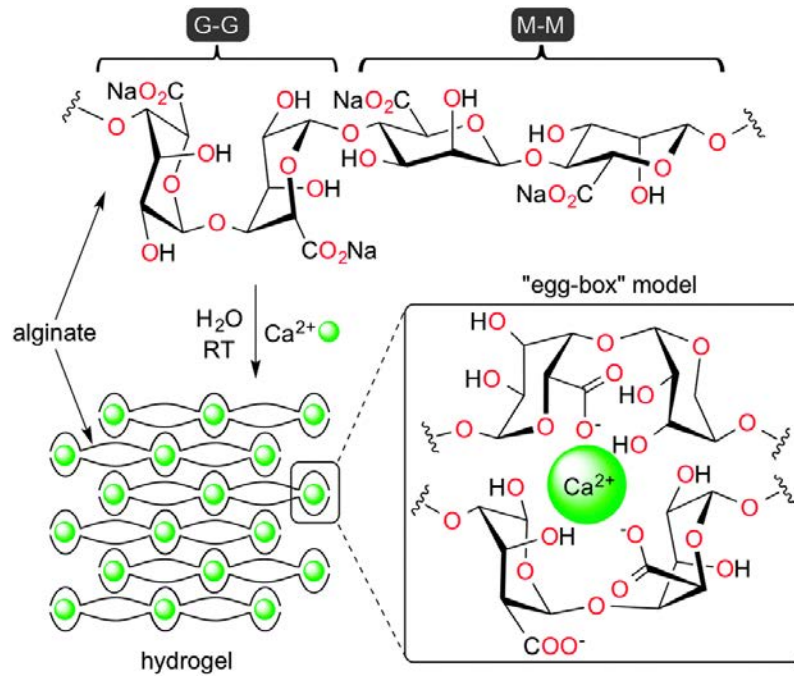


Figure 34. Rétention du calcium par un réseau tridimensionnel de segments poly-M ou poly-G définissant une structure de type « egg-box »¹⁶⁶.

La structure du polymère est donc l'élément déterminant du comportement rhéologique des gels d'acide alginique : la proportion des blocs poly-G et leur longueur conditionnent la formation et la force des gels obtenus en présence de calcium¹⁶⁷.

iv) Le chitosane

Le chitosane, est un copolymère linéaire flexible de 2-acétamido-2-déoxy-β-D-glucopyranose et 2-amino-2-déoxy-β-D-glucopyranose liés en β (1-4) (Figure 35). C'est un polysaccharide tel que la cellulose.

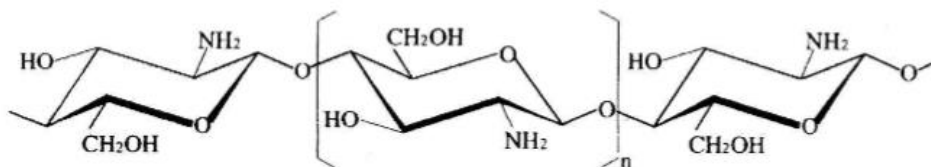


Figure 35. Structure chimique du chitosane¹⁶⁸.

Cette macromolécule est obtenue par N-déacétylation d'un des polymères naturels les plus abondants, la chitine, extraite des carapaces de crustacés tels que les crabes et les crevettes¹⁶⁹. Le pKa du

Synthèse bibliographique

chitosane est approximativement 6,3. Ainsi, lorsque le degré d'acétylation ou DDA est peu élevé c'est-à-dire lorsque les groupements amine sont en petite quantité, le chitosane est peu soluble. En général, on utilise du chitosane avec un DDA supérieur à 70 % pour avoir une grande partie soluble ¹⁷⁰. Il est utilisé dans les produits diététiques et est connu au Japon pour sa remarquable capacité à développer un gel protecteur dans l'estomac. Les hydrogels de chitosane peuvent se former par liaisons covalentes ou ioniques ¹⁷¹. Le chitosane peut être réticulé par exemple en augmentant la concentration du polymère. Il y a alors formation de liaisons hydrophobes dues aux groupements acétamide conduisant à la formation d'un gel réversible. Les propriétés physiques et chimiques des gels de chitosane sont modulables. Elles peuvent être contrôlées en particulier par le degré de désacétylation ^{172,173}, l'acide utilisé pour dissoudre le polymère ¹⁷⁴ ou par l'ajout de POE (poly(oxyéthylène) pour former des réseaux semi-interpénétrés de chitosane/POE ¹⁷⁵.

De plus, le chitosane a des affinités chimiques avec les lipides, avec lesquels il interagit spontanément. Etant un polysaccharide cationique, il interagit avec des polymères chargés négativement, des macromolécules et des polyanions dans un milieu aqueux. Grâce à ces propriétés d'interactions et à sa capacité à former des gels, le chitosane est fréquemment utilisé comme matrice d'encapsulation pour des relargages contrôlés de bioactifs ^{176,177}. Il permet d'améliorer la solubilité de la lutéine ¹⁷⁸ et d'inhiber l'oxydation des antioxydants présents dans le thé vert ¹⁷⁹ ou les catéchines extraits du Gambier ¹⁸⁰. Il peut être aussi associé à d'autres polysaccharides tels que l'alginate ^{161,164} et l'amidon ¹⁸¹ ou même à des protéines tels que les protéines sériques comme la β -lactoglobuline ⁴⁶ ou les caséines sous forme de caséinate ¹⁸² pour former des matrices d'encapsulation mixtes plus efficaces.

v) La pectine

Les pectines sont des polysaccharides complexes qui peuvent être extraits de la paroi primaire des dicotylédones et en particulier des parois végétales de nombreux fruits et légumes par de l'eau chaude, des acides dilués ou des chélateurs de calcium. Elles sont présentes dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des cellules végétales. Ce sont des polysaccharides caractérisés par un squelette d'acide α -D-

galacturonique et de faibles quantités de α -L-rhamnose plus ou moins ramifiés ¹⁸³. Le modèle généralement accepté décrit les pectines comme un enchaînement de deux structures majoritaires, présentant une chaîne principale homogalacturonique (zone lisse nommée HG) et une chaîne rhamnogalacturonique (zone hérissée nommée RG) présentant des ramifications ¹⁸⁴ (Figure 36).

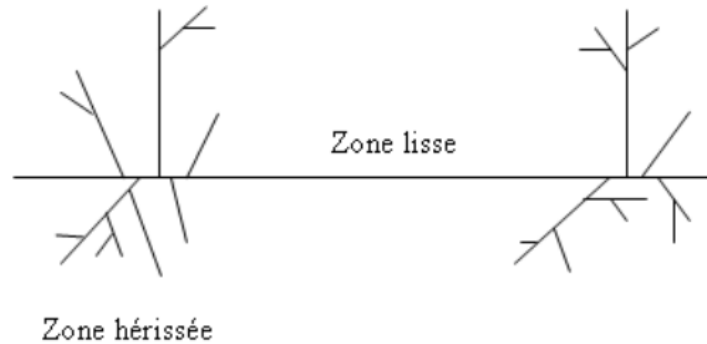


Figure 36. Structure schématique d'une molécule de pectine ¹⁸⁵.

Les pectines sont capables de former des gels par différents mécanismes quel que soit leur degré de méthylation :

- Les pectines hautement méthylées (HM) sont capables de former un gel dans les conditions de faible activité de l'eau, typiquement obtenues par de fortes concentrations de sucre (par exemple le saccharose) et à pH acide (entre 2,2 et 2,8). Le mécanisme de gélification dans ce cas correspond à la formation d'interactions hydrophobes entre les groupements méthyles et de liaisons hydrogènes entre les groupements carboxyliques des résidus d'acide galacturonique non estérifiés et les alcools secondaires ¹⁸⁶. Les sucres limitent l'activité de l'eau ce qui favorise les interactions pectines-pectines par rapport aux interactions pectines-eau ¹⁸⁷.
- Les pectines faiblement méthylées (LM) sont capables de former un gel en présence de cations multivalents et plus particulièrement avec le calcium (Ca^{2+}). Ce mécanisme de gélification est basé sur les interactions entre les cations et les groupements carboxyliques déprotonés des acides galacturoniques. Cette association forme un gel de type «boîte à oeuf» des liaisons de Van der Waals, des liaisons hydrogènes et des liaisons électrostatiques ¹⁸⁸. La capacité des pectines LM à s'associer avec le calcium dépend du degré de méthylation mais aussi de la

Synthèse bibliographique

distribution des acides galacturoniques non-estérifiés. Après dé-estérification des pectines de façon enzymatique (formation de blocs), la formation de liaisons avec le calcium est plus élevée qu'après dé-estérification chimique (aléatoire) ^{189,190}.

Ces gels de pectine ont servi de matrice d'encapsulation pour les anthocyanes les protégeant de l'oxydation ^{191,192}. L'encapsulation et le piégeage de la thiamine par un complexe WPI-pectine est aussi efficace surtout dans les conditions acides empêchant ainsi la dégradation ¹⁹³. Les probiotiques et plus précisément *Lactobacillus acidophilus* encapsulés par revêtement sur lit fluidisé composé de pectine ont vu leur viabilité augmenté jusqu'à 90 jours de stockage à 7 °C ¹⁹⁴.

A l'instar de plusieurs additifs alimentaires aux noms « empruntés », il ne faut pas confondre la pectine E440 avec la pectine naturelle, que l'on trouve par exemple en abondance dans la pelure blanche des oranges et autres agrumes ⁵. La pectine E440 reste une production de l'alimentation transformée avec son lot de résidus chimiques. Elle est souvent utilisée pour épaissir les confitures et les gelées, et est extraite de marc de pommes desséchées, d'écorces séchées (tous deux résidus de la fabrication du jus de fruit ou du cidre) ou de mésocarpes d'agrumes, par addition chaude ou d'acide dilué. L'additif est listé au Codex alimentarius sous Pectines 440 comme émulsifiant, gélifiant et stabilisant; il peut selon sa vision être ajouté à une large gamme d'aliments sans limite de dosage autre que celle estimée nécessaire par le producteur (norme GSFA) ⁵.

vi) La gomme arabique

La gomme arabique est un exsudat de sève descendante solidifié, produit naturellement ou à la suite d'une incision, sur le tronc et au pied d'arbres de la famille des acacias. Comestible, elle est récoltée principalement en Afrique saharienne (Maghreb, Mali, Sénégal, Tchad, Égypte, Soudan, etc.). D'un point de vue biochimique, c'est un polysaccharide acide fortement ramifié qui se présente sous la forme de mélanges de sels de potassium, de magnésium et de calcium. Les éléments monomères de l'acide libre (acide arabique) sont le D-galactose, le L-arabinose, le L-rhamnose et l'acide D-glucuronique. La gomme arabique se compose de trois fractions de polysaccharides de structures

différentes et d'une fraction protéique. Elle est constituée d'un assemblage de blocs polysaccharidiques autour de la chaîne peptidique qui donne une structure dite « wattle-blossom » et qui confère à la gomme un caractère amphiphile favorisant son adsorption à l'interface air-eau ou huile-eau (Figure 37).

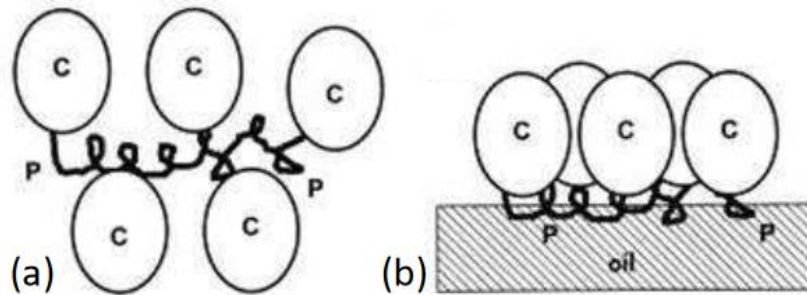


Figure 37. Représentation schématique du modèle « wattle blossom ». GA (a) en solution, (b) adsorbée à l'interface huile-eau. C : blocs polysaccharidiques, P : chaîne polypeptidique ¹⁹⁵.

Les propriétés de la gomme arabique sont principalement utilisées dans l'industrie agroalimentaire ¹⁹⁶. Elle fixe l'eau sans augmenter la viscosité et est donc utilisée en confiserie mais aussi pour gommer les dragées et éviter la sortie de l'huile d'amande. De plus, elle a deux fonctions importantes : elle inhibe la cristallisation du sucre dans les produits qui en contiennent en grande quantité et elle agit en tant qu'émulsifiant ^{197,198}. La gomme arabique se combine à d'autres polysaccharides ou à des protéines pour former des matrices mixtes. En effet, une combinaison ternaire de maltodextrines, gomme arabique et d'amidon modifié a permis d'augmenter la stabilité de la curcumine ¹⁹⁹ et de l'acide ascorbique ²⁰⁰ une fois encapsulés. Elle peut être aussi associée à des protéines lactières tels que la β -lactoglobuline afin d'obtenir des émulsions et même des coacervats plus stables et une résistance accrue face à des conditions de pH acides et de milieux fortement salins ^{201,202}. Elle peut faire aussi partie d'une matrice qui comporte de la β -lactoglobuline ainsi que de la gomme de xanthane afin d'obtenir des émulsions plus stables ²⁰³. Finalement, son association avec des isolats de protéines de soja et du sucrose améliore le taux d'encapsulation de l'huile essentielle d'orange en tant qu'arôme et protège ce dernier de l'oxydation lors des étapes de production et de stockage ²⁰⁴.

Synthèse bibliographique

3.2.1.4. Les systèmes à base de levure

La première étude concernant l'application potentielle de levure comme matrice d'encapsulation de petits composants lipophiles date des années 70²⁰⁵. Depuis, de nombreuses recherches ont montré qu'il est possible d'utiliser les levures comme capsules afin de stabiliser les molécules bioactives pendant le stockage sous une humidité relative élevée ou dans des conditions de température élevée²⁰⁶⁻²¹⁰. *Saccharomyces cerevisiae* est la levure la plus utilisée pour l'encapsulation de bioactifs surtout dans le domaine alimentaire. La structure de cette matrice permet l'encapsulation des biomolécules²¹¹. En effet, en premier, les levures subissent l'autolyse (NaCl 5%, agent de plasmolyse) pour être vidées de leur contenu puis les bioactifs sont incorporés²⁰⁶. La perméabilité des levures augmente avec la température et la pression après lyophilisation. Cela permet donc l'encapsulation des antioxydants hydrophiles, des acides chlorogéniques, du resvératrol afin d'améliorer leur stabilité face aux conditions de température et de pression importantes^{206,212,213}. Ainsi, puisque les levures sont thermorésistantes (jusqu'à 250 °C)²⁰⁶, elles protègent les composés surtout antioxydants et volatils de l'oxydation et de l'évaporation^{208,214}. Des études ont démontré que le relargage des biomolécules encapsulées dans les levures se fait suivant l'activité d'eau libre du milieu. Quand l'activité d'eau libre est élevée, le relargage des bioactifs encapsulés est favorisé²¹⁴. Dans le cas de certains arômes, le relargage est déclenché lorsque l'activité d'eau libre dans le milieu est de 0,7. Au-dessus de cette valeur, le composé reste encapsulé. Cela permet donc de qualifier les levures en tant que matrice à relargage contrôlé²¹⁵.

3.2.1.5. Les protéines non laitières

i) La zéine

La zéine est une classe de protéine prolamine du grain de maïs. Elle est en général produite sous forme de poudre à partir du gluten de maïs²¹⁶. C'est l'une des protéines végétales les plus étudiées qui a un grand nombre d'applications industrielles et alimentaires²¹⁷. La zéine s'auto-assemble en microsphères pour former des structures d'enveloppe et de noyau, potentiellement utiles dans un système d'encapsulation et de relargage contrôlé²¹⁸. Les nanoparticules de zéine sont également

considérées comme matrices d'encapsulation de bioactifs ²¹⁹. L'encapsulation de lysozyme et de nisine par la zéine par atomisation est efficace pour la mise en place de systèmes de relargage à libération contrôlée et prolongée ^{220,221}. La zéine pourrait aussi s'associer au chitosane pour former des matrices mixtes. Ces dernières sont efficaces pour l'encapsulation d'ingrédients hydrophiles ayant une importante activité biologique. En effet, le relargage de ces bioactifs à partir des nanoparticules de chitosane est fortement amélioré lorsque la zéine y est associée ^{222,223}. La zéine en tant que particules colloïdales stabilisées par les caséines constitue une matrice de protection pour la curcumine contre l'oxydation ²²⁴. L'encapsulation de l'oléorésine de tomate par la zéine a permis de protéger le lycopène et de le libérer au niveau stomacal pour y être relargué ²²⁵.

ii) Protéine de soja

Les protéines de soja texturées (PST) ou protéines végétales texturées (PVT) sont des protéines alimentaires fabriquées à partir de farine de soja déshuilée. Depuis quelques dizaines d'années, l'extrait protéique de soja produit à partir de cette farine est largement utilisé comme additif dans l'alimentation humaine, notamment dans les régimes végétariens ²²⁶.

Les isolats de soja (SPI) sont utilisés en tant que matrices d'encapsulation de bioactifs. En effet, l'encapsulation de la curcumine par les SPI a amélioré sa concentration en phase aqueuse, sa biodisponibilité et sa stabilité pendant le stockage ²²⁷. Cette stabilité a aussi été observée lors de l'encapsulation de *Bifidobacterium*. En effet, les SPI protègent ces probiotiques et augmentent leur viabilité ²²⁸. La matrice à base de protéines de soja permet aussi d'améliorer la stabilité des acides chlorogéniques du café : les interactions hydrophobes et électrostatiques entre protéine et polyphénol résisteraient à la digestion protéolytique ²²⁹. Les SPI peuvent être aussi associés à des polysaccharides pour former des matrices d'encapsulation mixtes. L'encapsulation de l'huile essentielle d'orange par les SPI associés à la gomme arabique par coacervation protège l'arôme de la dégradation en présence d'oxygène, de lumière et à haute température pendant les étapes de préparation et de stockage ²⁰⁴. L'encapsulation de l' α -tocophérol par les extraits de soja augmente la stabilité du bioactif en présence

Synthèse bibliographique

d'oxygène, d'irradiation UV et de la chaleur ²²⁶. Enfin, l'encapsulation de l'acide ascorbique permet d'augmenter la stabilité vis-à-vis de la dégradation du principe actif pendant le stockage, de moduler les propriétés de libération en fonction des conditions opératoires et de masquer son goût acide dans les préparations ²²⁶.

iii) Protéine de pois

Les protéines de pois sont extraites des graines où elles sont présentes à des taux variant de 20 % à 30 %. Elles sont principalement constituées de globulines (65-80 %) et de deux fractions minoritaires, les albumines et les glutélines. Les globulines sont constituées de trois protéines différentes – légumine, viciline et convicine ²³⁰. Les extraits protéiques de pois possèdent des propriétés gélifiantes ²³¹ et interfaciales ²³². Cependant, dans les études traitant de microencapsulation, ces dernières sont généralement associées à des polysaccharides ²³³⁻²³⁷. En effet, les interactions polysaccharides/protéines permettent l'amélioration de certaines propriétés fonctionnelles, telles que les propriétés moussantes et émulsifiantes, sans modification chimique ou enzymatique ²³⁸. Elles permettent également de créer une émulsion stable et donc d'avoir une meilleure distribution de taille des particules et une efficacité du procédé améliorée. L'utilisation du mélange protéine/polysaccharide augmente la solubilité totale de la matière enrobante grâce à la solubilité élevée des sucres.

iv) La gélatine

La gélatine est une protéine d'origine animale, obtenue par hydrolyse partielle du collagène contenu dans les os et la peau des animaux (Figure 38). Elle est constituée de 84 à 90 % de protéines et de 1 % environ de sels minéraux, le reste étant de l'eau ²³⁹.

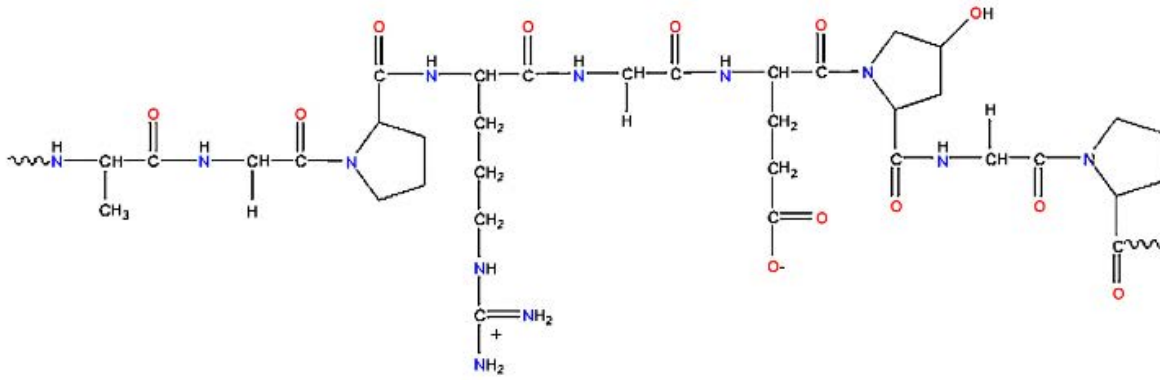


Figure 38. Structure de la gélatine -Ala-Gly-Pro-Arg-Gy-Glu-4Hyp-Gly-Pro-²⁴⁰.

La gélatine est vitreuse, fragile, légèrement jaunâtre ou blanchâtre et quasiment sans goût et sans odeur. Elle est obtenue par l'ébullition prolongée de tissus conjonctifs (peaux) ou d'os d'animaux (principalement porc, bœuf, poisson)²⁴¹. Elle est fournie sous différentes formes : gros granulés, poudre fine ou feuilles. Elle est classée parmi les additifs alimentaires en tant que stabilisant, gélifiant, émulsifiant, épaississant et support d'additifs et est notée E428⁵. Elle est présente dans des produits comme les confiseries, les crèmes glacées, les confitures, les yaourts, la margarine et les gâteaux et est également utilisée dans les produits allégés pour simuler la sensation de gras en bouche et créer de la texture sans ajouter de calories. Elle est présentée comme non toxique et est consommée en quantum satis⁵. La gélatine s'utilise dans des doses qui varient entre 5 et 12 % du produit final. La gélatine est utilisée pour stabiliser les mousses de produits laitiers²⁴². Elle permet d'augmenter la concentration du β -carotène dans l'eau, ce qui permet également d'obtenir une couleur jaune pour de nombreuses boissons²⁴¹. L'encapsulation de la curcumine par la gélatine permet d'augmenter sa concentration dans l'eau et son activité antimicrobienne contre *L. monocytogenes*, *S. enterica*, *S. aureus*, et *E. coli*. De plus, l'encapsulation préserve l'activité antioxydante de la curcumine qui ne l'est pas lorsqu'elle est libre sous forme de poudre commerciale²⁴³.

3.2.2. Les matrices laitières

3.2.2.1. Les protéines laitières

En France, les protéines du lait constituent une part importante de l'alimentation humaine. Leur haute qualité nutritionnelle repose sur leur forte digestibilité et une composition particulièrement bien

Synthèse bibliographique

équilibrée en résidus d'acides aminés indispensables ²⁴⁴. La concentration en protéines du lait varie suivant différents facteurs d'origine physiologique, génétique ou alimentaire.

Le lait contient en moyenne 30 à 35 g/L de protéines. Celles-ci se répartissent en deux catégories : les caséines et les protéines solubles ou sériques qui représentent respectivement environ 80 % et 20 % des protéines du lait de vache ²⁴⁵.

Les protéines laitières sont des matrices efficaces d'encapsulation de bioactifs. En effet, elles possèdent généralement une bonne solubilité (protéines sériques) ou dispersibilité (caséines) dans les solutions aqueuses, des propriétés émulsifiantes, de viscosité et la capacité à former des gels et des films ²⁴⁶. En outre, les propriétés fonctionnelles des protéines laitières peuvent être modifiées ou améliorées par des procédés appropriés élargissant ainsi leurs domaines d'application surtout en tant que matrices d'encapsulation ²⁴⁶.

i) Les caséines

Les caséines sont caractérisées par la présence de groupements phosphates estérifiés essentiellement sur les résidus sérine et permettant la fixation du calcium. Elles partagent certaines propriétés comme la richesse en acides aminés de type Glu, Leu, Pro et Ser, une insolubilité et une dénaturation à pH 4,6, la présence de résidus hydrophobes tels que les résidus proline ainsi que la faible proportion de structures ordonnées qui leur confère une certaine résistance à la chaleur ^{247,248}. L'organisation des acides aminés polaires et apolaires donne aux caséines leur caractère amphiphile. La faible présence de structure secondaire et l'absence d'une structure tertiaire permanente et bien définie confèrent aux caséines une conformation flexible et désordonnée qui peut s'adapter aux changements de conditions de leur environnement et apporter une certaine plasticité ²⁴⁹. Ces protéines sont d'une grande importance en technologie laitière et sont en grande partie responsables des propriétés technologiques du lait. Les quatre fractions caséiques naturellement présentes dans le lait sont les caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ à un ratio massique respectivement de 4 :1 :4 :1. Les quatre caséines sont amphiphiles ²⁵⁰ ; leur poids moléculaire est compris entre 19 et 25 kDa et leur point isoélectrique (pI)

est compris entre 4,6 et 4,8. La richesse de la structure en proline les rend plus ouvertes et accessibles au clivage protéolytique. Cette caractéristique ainsi que la liaison avec le calcium soluble par ponts phosphates permettent aux caséines d'être considérées comme matrice d'encapsulation de bioactif à excellente efficacité de relargage au niveau stomacal ²⁵¹. En effet, les caséines peuvent former des matrices d'encapsulation sous forme monomérique, sous forme de caséinates ou sous forme de micelle de caséines. Dans cette partie, plusieurs exemples d'encapsulation de monomères caséiques et de caséinates seront détaillés. La micelle de caséine sera présentée plus en détail dans une section spécifique.

- La caséine α_{s1}

La fraction la plus abondante des caséines est la caséine α_{s1} qui représente 40 % de la totalité des caséines. Elle comporte 199 acides aminés pour une masse moléculaire de 23 kDa et est constituée de deux régions hydrophobes séparant une région hydrophile composée de 8 résidus sérine phosphorylés (Figure 39).

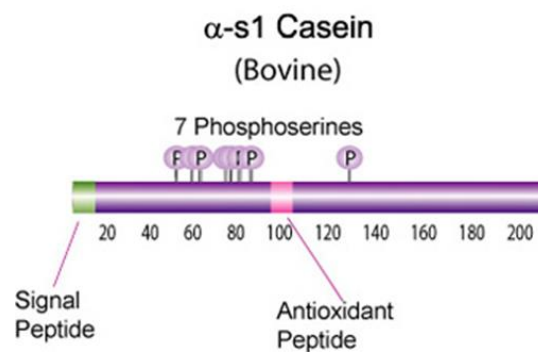


Figure 39. Structure de la caséine α -S1 ²⁵².

Sa richesse en proline lui confère un caractère hydrophobe important contribuant à son auto-assemblage et lui permettant d'interagir avec des bioactifs hydrophobes tels que la curcumine, augmentant ainsi la stabilité du polyphénol ²⁵³. En outre, elle protège les bioactifs thermosensibles à l'exposition aux températures élevées ²⁵⁴. Elle peut également interagir avec d'autres polyphénols tels que la génistéine de soja et le resvératrol ²⁵⁵.

- La caséine β

Synthèse bibliographique

La caséine β comporte 209 acides aminés pour une masse moléculaire moyenne de 24 kDa. Elle se caractérise par une région N-terminale hydrophile fortement chargée contenant 5 résidus de sérine phosphorylés et une partie C-terminale hydrophobe riche en proline. Avec 35 résidus proline, elle présente l'hydrophobicité la plus élevée. Elle possède deux résidus de tryptophane permettant l'interaction avec les bioactifs hydrophobes et plus précisément les polyphénols (Figure 40).

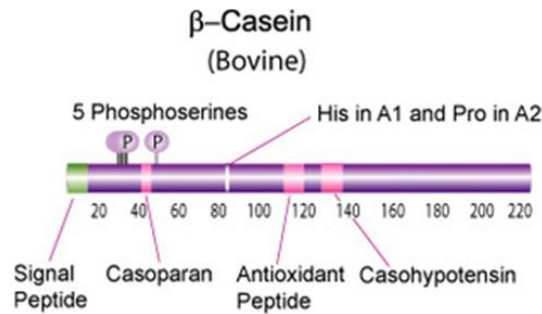


Figure 40. Structure de la caséine β ²⁵².

La caséine β interagit avec la curcumine, le resvératrol et la génistéine de soja et les stabilise mieux que la caséine α ²⁵⁵. Des études ont démontré que la caséine β interagit aussi avec la vitamine D *via* des interactions hydrophobes ²⁵⁶. D'autre part, les caséines en général, et les caséines β en particulier, permettent de stabiliser des émulsions dues à leurs activités de surface élevée. Leur hydrophobie facilite leur adsorption à l'interface eau/huile pendant l'émulsification. Ainsi, les gouttelettes sont stabilisées, la floculation et la coalescence sont évitées ²⁵⁷. Une nanoémulsion basée sur la caséine β , en présence de lactose et le tréhalose a montré une stabilité accrue et une viscosité plus élevée avec l'augmentation de la concentration en caséine β dans l'émulsion ²⁵⁸. D'autre part, la caséine β peut former des films protéiques rigides à résistance élevée. Ces films présentent une faible perméabilité à l'eau, une haute résistance à la traction. Ces propriétés leur confèrent la capacité d'interagir avec des molécules hydrophobes. La caséine β peut aussi se présenter sous forme de micelle due à ses propriétés d'auto assemblage ²⁵⁹. Des études ont démontré que la caséine β (de lait de chamelle) auto-organisée sous forme micellaire possède d'excellentes propriétés de protection et de transport de la curcumine ²⁶⁰. Elle améliore aussi la biodisponibilité des molécules hydrophobes telle que le célécoxib ²⁶¹ (anti-inflammatoire non stéroïdien). Finalement, la caséine β et les

caséinophosphopeptides (CPP) peuvent interagir avec le fer afin d'améliorer sa digestion et son absorption au niveau gastro-intestinal ²⁶².

- La caséine κ

La caséine κ constitue environ 11% des caséines. Elle comporte 169 acides aminés pour une masse moléculaire moyenne de 19 kDa. Il est possible de distinguer une partie N-terminale hydrophobe et une partie C-terminale hydrophile. La molécule contient 20 résidus proline situés en majorité dans la première partie ainsi que deux résidus cystéine pouvant donner un pont disulfure (Figure 41).

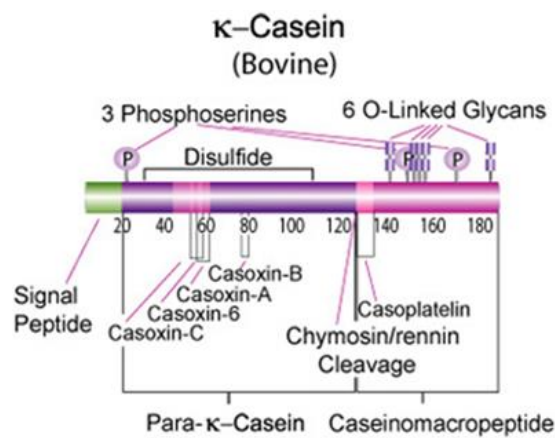


Figure 41. Structure de la caséine κ ²⁵².

La partie hydrophile contient un seul site de phosphorylation, ce qui explique la très faible sensibilité au calcium et la capacité à stabiliser les autres caséines. La caséine κ a la capacité de s'associer en micelles et se distingue par la présence de résidus glycosylés, liés au niveau des 6 résidus thréonine situés dans la partie C-terminale de la protéine. Cette zone forme une chevelure hydrophile, chargée négativement, jouant un rôle primordial dans la stabilité de la micelle de caséine. Cette stabilité peut s'expliquer par les forces de répulsion électrostatique et stérique induites par les chaînes caséiques ainsi que par la présence d'une couche d'hydratation en interaction avec l'enveloppe « chevelue ». La caséine κ a une grande sensibilité à l'action de la chymosine au niveau de la liaison Phe105-Met106 conduisant à la libération d'un fragment hydrophile chargé négativement appelé caséinomacropeptide (CMP) et de la fraction résiduelle hydrophobe appelé paracaséine κ ²⁶³.

Synthèse bibliographique

- Les caséinates

Les caséinates, eux, sont obtenus à partir d'une solution basique de caséines. Le caractère amphiphile, leur excellente solubilité dans l'eau, et les propriétés émulsifiantes des caséinates leur offrent des avantages physiques et fonctionnels caractéristiques, nécessaires à l'encapsulation de bioactifs ²⁶⁴. En effet, les caséinates de sodium interagissent avec la vitamine D *via* des interactions hydrophobes ²⁶⁵. De plus, les caséinates sont utilisés dans les émulsions directes en tant qu'agent de stabilisation et d'encapsulation ^{266,267}. Ils permettent la protection de l'huile de poisson contre l'oxydation ^{267,268}. Ils peuvent s'associer aux oligosaccharides tel que les fructo-oligosaccharides par conjugaison et former une véritable matrice d'encapsulation de probiotiques tels que les *Bifidobacterium* et les *Lactobacillus casei* afin de les protéger de la digestion gastrique et de les relarguer au niveau intestinal ^{269,270}. Ils peuvent aussi être conjugués au dextrane pour encapsuler le β -carotène afin de le protéger de l'oxydation en présence de FeCl_3 ²⁷¹. Ils peuvent être associés à la pectine pour former des nanocapsules résistantes au pH acide ²⁷². Les caséinates peuvent former avec la gomme arabique ou avec le chitosane des matrices d'encapsulation ^{182,273}. Avec la gomme arabique, ils protègent l'huile essentielle d'orange encapsulée de l'oxydation ²⁷⁴. Ils sont aussi utilisés pour protéger des composés volatils tels que des arômes. Ils forment avec le carboxyméthylcellulose un coacervat permettant de protéger le β -pinène ²⁷⁵.

ii) Les protéines sériques

Les protéines du lactosérum ou protéines sériques représentent 20 % des protéines totales du lait ²⁴⁵. Elles sont présentes dans la phase aqueuse du lait sous forme globulaire, et sont particulièrement sensibles au traitement thermique. Les protéines majeures du lactosérum tant d'un point de vue quantitatif que technologique comprennent deux protéines : la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine.

Ces deux protéines peuvent être considérées comme matrices d'encapsulation à elles seules ou associées aux autres protéines du lait, au lactose et à la matière grasse laitière et se présentent alors sous forme de concentrés WPC, d'isolats WPI ou d'hydrolysats WPH.

La β -lactoglobuline est une protéine globulaire comprenant 162 acides aminés et dont la masse moléculaire avoisine les 18 KDa (Figure 42). En fonction du pH, de la température, de la concentration ou encore de la force ionique du milieu, elle peut exister sous différents états oligomériques allant du dimère au pH naturel du lait à l'octamère^{276,277}. Au voisinage de son point isoélectrique estimé à pH 5,2 elle est très peu soluble dans l'eau²⁷⁸. Par contre, sa solubilité augmente de façon importante avec la concentration saline du milieu. Sa structuration est importante du fait de l'empilement de feuillets β et d'une structure très compacte de type β - α - β bloquée par deux ponts disulfures. 45% des acides aminés sont impliqués dans les calices β et 15% dans les hélices α ²⁷⁹. Cette structuration conduit à une structure tertiaire extrêmement compacte.

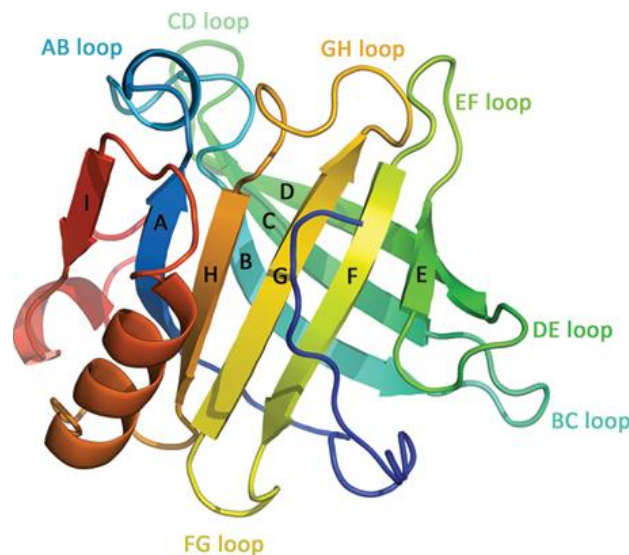


Figure 42. Structure tridimensionnelle de la β -lactoglobuline²⁸⁰.

De nombreuses études ont permis de définir la β -lactoglobuline comme matrice d'encapsulation de bioactifs hydrophobes tels que les arômes, les vitamines, les acides gras et les polyphénols. Cette encapsulation de bioactifs tels que les catéchines²⁸¹ et les acides gras²⁸² se produit majoritairement *via* des interactions hydrophobes mais aussi *via* des liaisons hydrogènes. Il a été proposé que cette liaison hydrophobe s'établit au niveau du calice interne mais aussi au niveau des cavités proches de l'hélice α et de la surface externe du feuillet β ²⁸³. La β -lactoglobuline permet d'encapsuler l'acide folique et diminue sa photodégradation suite à l'exposition aux rayons UV de 40 % à 6 % au bout d'une heure²⁸⁴. Elle permet aussi d'augmenter la photostabilité et la solubilité du resvératrol²⁸⁵ et de l' α -

Synthèse bibliographique

tocophérol^{286,287}. Elle améliore la concentration de la curcumine dans l'eau et augmente son temps de demi-vie²⁸⁸. Elle limite aussi la dégradation de l'épigallocatechine gallate (EGCG) lors de la digestion gastrique pour un relargage ultérieur au niveau intestinal²⁸⁹. Elle peut être associée à la pectine et former des particules permettant une encapsulation efficace et un relargage contrôlé de lipides²⁹⁰⁻²⁹². Combinée au chitosane, elle améliore la stabilité colloïdale d'émulsions²⁹³ et forme des hydrogels qui sont considérés comme matrices d'encapsulation efficaces pour le transport de bioactifs²⁹⁴. Elle encapsule des enzymes telles que l'alcool déshydrogénase par atomisation afin de conserver l'activité enzymatique²⁹⁵. L'encapsulation des vitamines telles que la vitamine D par la β -lactoglobuline permet de la stabiliser et d'augmenter sa biodisponibilité surtout une fois incorporée dans des produits laitiers²⁵⁶.

L' α -lactalbumine, elle, est une petite protéine globulaire compacte de 123 acides aminés et d'une masse moléculaire de 14 kDa (Figure 43). Cette métalloprotéine présente une structure stabilisée par 4 ponts disulfures et un ion calcium²⁹⁶. Son pH isoélectrique est de 4,8²⁹⁷. Le degré d'organisation de cette protéine est relativement faible par rapport à celui de la β -lactoglobuline ; seulement 30 % des acides aminés sont structurés en hélice α et 9 % en feuillets β ²⁹⁸. Sa structure tertiaire est rigidifiée par la présence d'un ion calcium au cœur de celle-ci. De plus, cet ion lui confère une meilleure résistance aux traitements thermiques que la β -lactoglobuline.

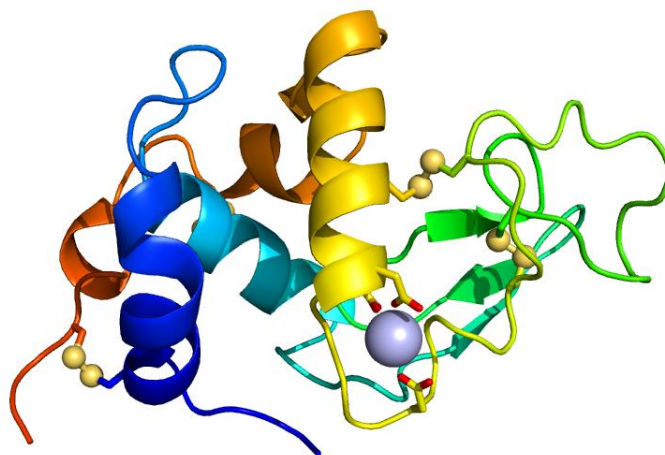


Figure 43. Structure tridimensionnelle de l' α -lactalbumine²⁹⁹.

De nombreuses études ont permis de définir l' α -lactalbumine comme matrice d'encapsulation de bioactifs. Elle peut interagir avec l'acide palmitique et le rétinol³⁰⁰. Son hydrolyse enzymatique lui permet de s'auto-assembler et de former des nanotubes plus rigides que l' α -lactalbumine seule et résistants aux températures de pasteurisation et de lyophilisation³⁰¹. En effet, ces nanotubes peuvent constituer des matrices d'encapsulation et de relargage contrôlé : les extrémités des nanotubes se déstabilisent de manière inversement proportionnelle à la concentration en Ca^{2+} ³⁰¹. L'abaissement de la concentration de Ca^{2+} entraîne une fragilisation accrue des nanotubes. En faisant varier simplement la concentration de Ca^{2+} dans le solvant, il est possible contrôler le relargage du bioactif en question³⁰².

Sachant que la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine peuvent faire partie aussi des concentrés, d'isolats et d'hydrolysats de protéines sériques en tant que matrices d'encapsulation, leur rôle dans l'encapsulation de bioactifs est détaillé ci-après.

Les protéines de lactosérum sont principalement commercialisées sous trois différentes formes :

- Les concentrés ou WPC contenant entre 35 et 80% de matière azotée totale sur matière sèche;
- Les isolats ou WPI contenant plus de 90% de matière azotée totale sur matière sèche;
- Les sérums délactosés contenant entre 24 et 40% de matière azotée totale sur matière sèche.

Les WPC sont fortement utilisés pour l'encapsulation en industrie alimentaire. En effet, l'encapsulation de l' α -tocophérol par les WPC améliore sa stabilité pendant le stockage²⁸⁷. Les WPC permettent aussi l'encapsulation des huiles essentielles d'origan et des arômes extraits de *citronella* et de *majoram* (Arôme extraite de *Majorana hortensis*) en stabilisant les émulsions inverses³⁰³ mais aussi des arômes acides tels que le sumac³⁰⁴. Grâce à leur capacité à former des hydrogels, ils peuvent encapsuler des molécules hydrophobes telles que la caféine en la protégeant des procédés de lyophilisation et de séchage³⁰⁵. La protection du β -carotène de l'oxydation est améliorée en l'encapsulant par les WPC³⁰⁶. Ces derniers peuvent former avec les polysaccharides des matrices d'encapsulation plus efficaces. Ils améliorent, en association avec les maltodextrines, la rétention volatile pendant l'atomisation et le stockage de l'huile essentielle de carvi et, de plus, augmente sa

Synthèse bibliographique

stabilité face à l'oxydation ³⁰⁷. D'autre part, associés au carboxymethylcellulose, ils retardent le relargage de la caféine dans le yaourt et dans le tractus gastro-intestinal ³⁰⁸.

Les WPI constituent de véritables matrices d'encapsulation dans l'industrie laitière. En effet, ils permettent de protéger les arômes volatils et d'augmenter leur rétention tel que l'hexanoate d'éthyle ³⁰⁹. Ils protègent aussi les lipides de l'oxydation tels que l'huile d'orange ²⁷⁴, l'huile de lin ³¹⁰, l'huile d'avocat ³¹¹ et l'huile essentielle de gingembre ³¹². Les WPI maintiennent aussi la stabilité des doubles émulsions surtout au niveau gastrique et ont montré un relargage contrôlé efficace des anthocyanines ³¹³⁻³¹⁵. L'encapsulation de la curcumine par les WPI *via* des interactions hydrophobes améliore sa stabilité et protège son activité antioxydante face aux conditions de séchage ³¹⁶. Sachant que la viabilité des probiotiques est sensible aux différentes procédures d'incorporation dans les aliments et de digestion gastro-intestinale, son encapsulation par les WPI par lyophilisation est très efficace ^{317,318}. Ces isolats de protéines peuvent aussi se présenter sous forme de gels et peuvent encapsuler des anthocyanines ³¹⁹ et le rétinol en les protégeant des conditions de séchage ³²⁰. Ils améliorent aussi la stabilité du zinc pendant le stockage ³²¹ et protègent le fer de l'oxydation ³²². En outre, les WPI peuvent s'associer aux polysaccharides tels que la gomme arabique, les maltodextrines, la pectine, le chitosane afin d'améliorer la stabilité des composés bioactifs volatils surtout lors de l'atomisation et pendant le stockage ³⁰⁷, de protéger les lipides ^{323,324} et les polyphénols ³²⁵ contre l'oxydation, de transporter la thiamine en la protégeant des procédés de lyophilisation ¹⁹³, de protéger les anthocyanines contre les traitements thermiques ³²⁶.

En résumé, le tableau 7 présente des exemples de différents bioactifs ainsi que les matrices associées d'origine laitière ou non laitière et les techniques d'encapsulation utilisées.

Tableau 7. Exemples de bioactifs encapsulés dans des matrices laitières et non laitières et les techniques d'encapsulation correspondantes.

Bioactifs ou Cœur	Matrices d'origine laitière	Matrices d'origine non laitière	Techniques d'encapsulation	Avantages d'encapsulation	Références
<i>Bioactifs hydrophobes</i>					
-Catéchine -Epicatéchine -Epicatéchine gallate	-β-Lactoglobuline - Monomère de Caséine	-Gélatine -Tween20 -Huile d'olive -Liposomes -Emulsions	-Coacervation -Inversion de phase	-Stabilité accrue -Relargage contrôlé -Goût amélioré	289,327–333
Curcumine	-WPI : isolat de protéines sériques -β caséine -Micelle de caséines	-Amidon modifié -β-cyclodextrines -Gomme arabique - Zéine -Lipides -Liposomes -Chitosane	-Atomisation -Lyophilisation -Dispersion ou conjugaison	-Amélioration de l'activité anticancéreuse -Stabilité dans le milieu aqueux -Biodisponibilité accrue	198, 315, 333– 337
Quercétine	WPI : isolat de protéines sériques	-Liposomes -Particules nano ou micro solides à base de lipides : SLN ou SLM	-Inversion de phase -Homogénéisation à haut pression -Dispersion ou conjugaison	-Relargage contrôlé - Absorption améliorée due la présence de phospholipides dans la formulation -Augmentation de la solubilité et de la stabilité -Activité antioxydante accrue	339–342

Synthèse bibliographique

Resveratrol	-β-Lactoglobuline -Caséines	-β-cyclodextrine -Chitosane - Liposomes - Emulsions -SLN	-Inclusion -Sonication -Homogénéisation à haut pression - Dispersion ou conjugaison	-Amélioration de la concentration dans l'eau, de la stabilité, de la biodisponibilité et du relargage contrôlé	104, 109, 147, 254, 342–348
Lycopène	<i>ND</i>	-Cyclodextrines -Gomme arabique -Sucrose -Amidon -Zéine -Gélatine -Emulsions	-Lyophilisation -Atomisation -Dispersion ou conjugaison	- Stabilité contre l'oxydation améliorée - Relargage contrôlé	225,350–355
Lutéine	WPI : isolat de protéines sériques	-Chitosane -SLN	-Homogénéisation à haut pression -Dispersion ou conjugaison	Amélioration de la stabilité face à l'oxydation, l'humidité et la température	177, 355, 356
Huile de maïs	β-Lactoglobuline	-Maltodextrine -Pectine -K-Carraghénane -Lipides enrobés d'un complexe protéine-polysaccharide	Lyophilisation	Amélioration de la stabilité des émulsions par lyophilisation	292
Huile de palme	Caséinate de sodium	Maltodextrine	Atomisation	Surface à faible teneur lipidique	358
Huile de poisson (AGPI ou oméga 3 ou 6) et huile de lin	-Caseinate de sodium -Monomère de Caséine -Micelle de caséine	-Alginate -Chitosane -Maltodextrine -Emulsions	-Sonication -Coassemblage	-Relargage contrôlé -Biodisponibilité améliorée -Saveur et odeur masquées	268,348,359– 366

β-carotène	-Caséine -WPC : concentré de protéines sériques	-Dextrine -Zéine -Protéine de soja	-Séchage à vide -Electrospraying	-Protection du bioactif contre les fluctuations de pH, l'oxydation, la dilution et le stockage. -Relargage contrôlé -Activité antioxydante prolongée	367–374
Vitamine E	-β-Lactoglobuline -Hydrogels	-SLN -Emulsions	-Bottom Up -Gélification -Homogénéisation à haut pression	-Amélioration de l'activité antioxydante -Stabilité accrue face à l'oxydation	77,286,375–377
Vitamine D	-Complexe Caséine-maltodextrine -β-Lactoglobuline	-Maltodextrine -Emulsions	Coassemblage	Protection du bioactif à pH acide	378–382
<i>Bioactifs hydrophiles</i>					
Riboflavine	WPI : isolat de protéines sériques	-Alginate -Emulsions	Lyophilisation	Relargage contrôlé	383
Thiamine	WPI : isolat de protéines sériques	Pectine	-Coacervation -Lyophilisation	Amélioration de l'activité de la thiamine pendant le stockage	193
Vitamine B12	Caséine-Maltodextrine conjugué	-Maltodextrine -Double émulsion	Lyophilisation	Efficacité d'encapsulation améliorée	384,385
Lactoferrine	WPI : isolat de protéines sériques	-Huile de maïs - Polyglycérol	- Double émulsion - Lyophilisation	Amélioration de l'activité antimicrobienne de la lactoferrine	385
Anthocyanes	WPI (gels) : isolat de protéines sériques sous forme de gels	-Maltodextrine -Gomme arabique -Pectine -Alginate	-Atomisation -Lyophilisation -Coacervat -Extrusion	-Augmentation de la durée de vie du bioactif -Protection contre l'oxydation -Relargage contrôlé	31,86,192,386– 390

Synthèse bibliographique

		-Protéines de soja -Emulsions			
Vitamine C ou (AA)	-WPI : isolat de protéines sériques -Micelle de caséine	-Alginate -Chitosane -Amidon -Gomme arabique -Liposomes -SLN	-Atomisation -Revêtement sur lit fluidisé -Atomisation -Immobilisation	-Protection face à l'oxydation -Durée de vie et biodisponibilité améliorée -Stabilité organoleptique	32
Acides caféiques et chlorogéniques	Monomère de caséine	- β -cyclodextrine -Maltodextrine -Gomme arabique -Alginate -Chitosane -Emulsions	-Inclusion -Mini émulsion accompagnée d'une évaporation de solvant	-Amélioration de l'activité antioxydante du bioactif -Durée de vie prolongée -Relargage contrôlé	179,229,391– 393
Les probiotiques					
<i>Bifidobacterium sp.</i>	-Caseinate -Protéines laitières -Micelle de caséine	-Huile de canola -Amidon résistant -Lactose	-Atomisation -Gélification	Amélioration de la viabilité cellulaire pendant les stockages non réfrigérés et in vitro face aux conditions gastro-intestinales	269,394–396
<i>Lactobacillus sp. et Bifidobacterium sp.</i>	Monomère de caséine	Pectine	Atomisation	Amélioration de la viabilité cellulaire pendant le séchage et le stockage	194,397
<i>L.casei</i>	Caséinate	Gomme gellane	Gélification induite par le pH	Protection dans les conditions gastriques	270

<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	Micelle de caséine	Alginate	Extrusion Atomisation	Protection dans les conditions gastriques	398,399
--	--------------------	----------	--------------------------	--	---------

Synthèse bibliographique

Comme il a été décrit précédemment, les matrices d'encapsulation de bioactifs sont nombreuses et diverses. Cependant, ces matrices, qu'elles soient laitières ou non, peuvent présenter des limites d'utilisation que ce soit au niveau technique ou au niveau de leur incorporation dans les produits alimentaires. Ainsi, le tableau 8 ci-contre résume les différents inconvénients et limites d'utilisation de chaque matrice d'encapsulation.

Tableau 8. Limites d'utilisation des diverses matrices d'encapsulation.

Matrices d'encapsulation	Limites d'utilisation	Références
Matrices à base de polysaccharides		
Polysaccharides	<ul style="list-style-type: none"> - Faible activité de surface impliquant une association essentielle à d'autres ingrédients aux propriétés d'émulsification importantes tels que des protéines ou des sucres à faible poids moléculaire. - Tendance à la cristallisation de la matrice pouvant induire une lyse cellulaire et donc influençant la viabilité des probiotiques 	102,400
Cyclodextrines	<ul style="list-style-type: none"> - Faible solubilité comparativement à celle des autres oligosaccharides : la β-cyclodextrine est neuf fois moins soluble que les autres cyclodextrines. - Coût élevé de l'utilisation des cyclodextrines. 	401–403
Maltodextrine	<ul style="list-style-type: none"> - Faible capacité d'émulsification. 	404–406
Gomme arabique	<ul style="list-style-type: none"> - Irrégularités de surface des particules de gomme entraînant un problème d'écoulement - Bioactif résiduel en surface et non protégé. - Encapsulation de certains bioactifs (sumac) non efficace. 	304,407
Gomme arabique- Maltodextrine	<ul style="list-style-type: none"> - Protection contre la dégradation et le brunissement enzymatique non efficace. 	408
Tréhalose	<ul style="list-style-type: none"> - Sucre à faible poids moléculaire aboutissant à la formation de poudres collantes due à sa basse température de transition vitreuse. - Non efficace en tant que protecteur d'enzyme tel que l'ADH (Alcool désyhydrogénase). 	295,409
Microgels d'alginate	<ul style="list-style-type: none"> - Barrière non efficace et taux d'encapsulation faible pour les bioactifs hydrophiles. - Faible stabilité chimique et mécanique (sensible aux changements de pH et à la présence de cations mono et divalents). - Ajout de Ba^{2+} favorisant un crosslinking non homogène entre les chaînes polymériques des acides manuronique et guluronique. 	113,410
Chitosane Ca - Alginate	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de protection suffisante des probiotiques durant les étapes de préparation. - Faible solubilité du complexe dans les solutions aqueuses limitant son application industrielle. 	411

Matrices à base de lipides		
Emulsions	<ul style="list-style-type: none"> - Préparation des émulsions à partir d'huiles comestibles problématique due à leur viscosité élevée. - Choix délicat des huiles surtout dans le cadre d'une alimentation allégée et saine : les huiles ne doivent pas contenir un taux élevé de cholestérol et d'acides gras libres. Cependant ce genre d'huile n'est pas stable à des températures élevées ce qui limite l'utilisation des émulsions en tant que matrice dans les aliments qui doivent subir de hautes températures lors des étapes de préparation. - Instabilité thermodynamique et séparation de phases. - Application limitée due à la toxicité des surfactants et co-surfactants utilisés pouvant aussi altérer les propriétés organoleptiques du produit fini. - Cas où le bioactif est cristallin : concentration incorporée limitée due à des risques de précipitation lors du stockage entraînant la perte de protection offerte par cette matrice d'encapsulation. - Coût élevé de leur utilisation nécessitant des équipements spéciaux tels que les homogénéisateurs. 	<p>102,103,110,410,412–</p> <p>416</p>
Liposomes	<ul style="list-style-type: none"> - L'incorporation des liposomes dans les aliments limitée par le temps long de préparation et le coût élevé de la manufacture. - L'utilisation de solvants organiques et toxiques souvent nécessaires à leur fabrication mais indésirables dans les aliments. - Sensibles une fois ingérés par voie orale aux fluctuations de pH, aux enzymes telles que la bile et les lipases. - Taux d'encapsulation du resvératrol par les liposomes faible : le problème avec ce système est l'incapacité à localiser le resvératrol (emprisonné dans les bicouches phospholipidiques pendant les étapes de préparation ?) - Les liposomes non efficaces si incorporés dans des milieux aqueux dilués. - Instabilité des liposomes face à l'exposition aux rayons ultra violets. - L'encapsulation par les liposomes non efficace à de hautes températures par exemple lors de la stérilisation. 	<p>110, 127, 410,417,418</p>
SLN (nanoparticules solides à base de lipides)	<ul style="list-style-type: none"> - Non incorporés dans les aliments à forte teneur en eau. - Barrière non efficace pour les bioactifs hydrophiles. - Risque d'exclusion du bioactif de la nanoparticule due à la cristallisation de la phase lipidique. 	<p>110, 410,419–421</p>

- Production délicate surtout au niveau de l'étape de refroidissement afin d'éviter la formation d'agrégats et la perte de bioactifs.

Matrices à base de microorganismes

Levure	-Il est nécessaire que le bioactif (< 700 Da)) puisse traverser par diffusion l'enveloppe de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	422
---------------	--	-----

Matrices à base de protéines

Protéines sériques	<ul style="list-style-type: none"> - Hydrolyse excessive aboutissant à la formation de peptides aux sites hydrophiles et hydrophobes mal organisés/distribués conduisant à la perte des propriétés émulsifiantes. - Leur hydrolyse augmente l'amertume. - Incapacité des peptides à former des films cohésifs contrairement aux peptides de taille plus importante tels que les protéines sériques avant hydrolyse. - Sensibles aux températures élevées de préparation et donc taux d'encapsulation faible (anthocyanines). - Encapsulation de bioactifs volatils faible pour des protéines sériques seules ; complexation avec des di ou polysaccharides tels que le lactose nécessaire. - Formation de gels stables nécessitant une association avec des émulsions. 	102,314,319
---------------------------	--	-------------

SMP (Skim Milk Powder)	Encapsulation de bioactifs volatiles non efficace ne conférant pas une protection contre l'oxydation.	307
-------------------------------	---	-----

Synthèse bibliographique

En s'attardant sur les limites des matrices d'encapsulation listées ci-dessus, nous constatons que les polysaccharides et les lipides nécessitent des techniques d'encapsulation délicates et complexes pour pouvoir former une matrice efficace et rigide pouvant être incorporée dans les aliments. Les protéines, elles, nécessitent des procédés d'encapsulation plus simples mais les protéines sériques du lait par exemple sont sensibles à l'hydrolyse enzymatique et aux hautes températures.

La micelle de caséine, naturellement présente sous forme de nanoparticules, qualifiée de GRAS ou Generally Recognized As Safe est stable thermodynamiquement et est peu polydisperse. L'encapsulation du bioactif dans la micelle de caséine peut être très facilement réalisée par un simple mélange de la dispersion de micelles de caséines avec une solution contenant la molécule à encapsuler, comme une solution de curcumine dans l'éthanol par exemple ; contrairement à l'encapsulation par les polysaccharides nécessitant des techniques d'extraction ou l'encapsulation par les liposomes nécessitant des techniques d'émulsification et de réduction de taille jusqu'à l'échelle micrométrique. Pour ce, les propriétés de la micelle de caséine seront détaillées dans la partie qui suit.

4. La micelle de caséine

La fraction protéique majeure du lait est représentée par les micelles de caséine. La micelle de caséine contient des milliers de monomères caséiques et des nano-agrégats de phosphate de calcium assemblés sous forme de particules colloïdales thermodynamiquement stables dans un milieu de force ionique élevé et de pH proche de la neutralité.

4.1. Composition, taille et forme

Les propriétés physico-chimiques des monomères de caséines (α_{s1} ; α_{s2} ; β et κ) constitutives de la micelle sont données dans le tableau 9. Il est important de noter que le pH isoélectrique de la micelle de caséine (pH 4,6) diffère des points iso-ioniques des caséines constitutives⁴²³. Ceci traduit l'importance de la structuration des sous-unités sur le comportement des caséines. La micelle de caséine contient 92 % de protéines et une fraction minérale de 8 %. Les minéraux sont constitués de 90 % de phosphate de calcium et de 10 % d'ions citrate et magnésium. Leur diamètre moyen est

d'environ 180 nm mais peut varier de 30 à 600 nm ⁴²⁴. Ces variations dépendent de la saison, du stade de lactation ou encore du traitement subi par le lait mais également des conditions environnementales physicochimiques ⁴²⁵.

Tableau 9. Propriétés physico-chimiques des caséines ^{423,426}.

	Caséine α_{s1}	Caséine α_{s2}	Caséine β	Caséine κ
Nombre de résidus d'acides aminés	199	207	209	169
Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	23 612	25 228	23 980	19 005
pH iso-ionique	6,0	5,3	5,2	5,6
Hydrophobie totale (kJ.résidu ⁻¹)	4,89	4,64	5,58	5,12
Nombre de résidus Tryptophane	2	2	1	1

4.2. Techniques permettant l'étude de la structure micellaire

La structure de la micelle de caséine est très complexe et n'est pas encore clairement déterminée malgré de nombreuses études dans la littérature. Quelques techniques spécifiques sont utilisées afin d'étudier son organisation supramoléculaire et notamment l'arrangement des différentes protéines et de la fraction minérale au sein de la structure. Les principales sont la microscopie électronique à transmission ainsi que les méthodes de diffusion de rayonnements aux petits angles (rayons X et neutrons).

4.2.1. La microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique en transmission (MET ou TEM pour Transmission Electron Microscopy) permet une analyse morphologique, structurale et chimique d'échantillons solides à l'échelle atomique ⁴²⁷. Cette technique repose sur l'interaction des électrons avec la matière et la détection des électrons ayant traversé l'échantillon. Les échantillons étudiés doivent donc être préalablement amincis afin d'être suffisamment transparents pour le passage des électrons ⁴²⁸.

Synthèse bibliographique

Une multitude d'informations peuvent être obtenues par TEM telles que l'épaisseur des couches dans des empilements complexes, la morphologie de matériaux en coupe, leur structure (amorphe ou organisée), la nature des défauts cristallins, l'orientation cristalline, la taille des grains pour les échantillons polycristallins⁴²⁹. Le TEM couplé à une analyse chimique permet d'accéder à la nature des couches et des interfaces ainsi qu'à la distribution d'un élément dans une couche.

L'échantillon est le siège de différents phénomènes physiques résultant de l'interaction des électrons avec la matière. Comme son nom l'indique, la microscopie électronique à transmission est basée sur la détection des électrons ayant traversé l'échantillon (électrons transmis et diffusés). Un diaphragme placé à la sortie de l'échantillon, appelé diaphragme objectif ou de contraste, permet de sélectionner le faisceau transmis (champ clair ou bright field) ou un faisceau diffracté selon une direction particulière (champ sombre ou dark field). Un ensemble de lentilles magnétiques (de diffraction, intermédiaire et de projection finale), constituant le système de projection, permet ensuite de transférer l'image de l'échantillon (ou le diagramme de diffraction) vers l'écran d'observation⁴²⁹. L'acquisition d'images numériques est réalisée par une caméra CCD placée sous l'écran d'observation. En interagissant avec l'échantillon, une partie des électrons perd de l'énergie. Cette perte d'énergie peut être exploitée pour réaliser des analyses chimiques, par spectrométrie de perte d'énergie (EELS) par exemple.

4.2.2. Diffusion de rayonnements aux petits angles

Les techniques de diffusion de rayonnements, qui peuvent être des rayons X, des neutrons ou de la lumière, sont basées sur une déviation d'un faisceau incident par un échantillon et permettent de recueillir des informations structurales sur un échantillon. Cette diffusion, qui est qualifiée d'élastique car sans perte d'énergie et sans modification de la longueur d'onde du rayonnement, peut être intense (diffusion cohérente) dans le cas d'un échantillon présentant une structure organisée de manière périodique sur de grandes distances (échantillons cristallins). Dans ce cas, le terme diffraction de rayonnement est utilisé et est un cas spécifique du phénomène de diffusion. Dans le cas d'échantillons

présentant une structure locale non répétée, il est également possible d'obtenir des informations sur l'organisation de cette structure par simple diffusion.

i) Rappel sur la diffraction de Bragg

Le phénomène de diffraction d'un rayonnement par un cristal parfait conduit à l'apparition de pics de forte intensité (pics de Bragg) détectés à des angles de plusieurs dizaines de degrés par rapport au trajet défini par le faisceau incident ⁴³⁰. La relation entre l'angle de diffraction 2θ et des distances de répétition caractéristiques de l'organisation périodique de l'échantillon est donnée par la loi de Bragg :

$$2d \sin\theta = n \lambda \quad \text{équation 1}$$

avec θ le demi-angle de diffraction, d la distance de répétition entre deux plans atomiques diffractant le rayonnement de longueur d'onde λ de l'ordre de l'Angström et n l'ordre de diffraction. Cette loi indique simplement que plus les plans d'atomes diffusants sont proches (d petit) et plus le signal diffusé/diffracté est émis à des grands angles ($\sin \theta$ grand donc θ grand) par rapport au faisceau incident.

ii) Principes de diffusion de rayonnements aux petits angles (SAS – Small Angle Scattering)

La diffraction de rayonnement est généralement utilisée afin de caractériser une structure cristalline définie par un arrangement périodique des atomes d'un cristal avec des distances de répétitions de l'ordre de l'Angström donc en enregistrant le signal de diffraction à des grands angles. Il est également possible de détecter le signal émis à des angles beaucoup plus faibles et qui émerge de l'échantillon pratiquement dans l'axe du faisceau incident. Ces signaux proviennent du fait de l'organisation de l'échantillon à des échelles beaucoup plus grandes que celles séparant les atomes et les plans atomiques consécutifs. A des angles de diffusion si faibles, le signal enregistré provient de l'organisation des atomes et des molécules sondée sur des échelles allant du nanomètre à la centaine de nanomètres ⁴³¹. L'étude de la structure de cristaux liquides formés par des tensioactifs dans l'eau, de bicouches de phospholipides ou d'argile par exemples, matériaux structurés à l'échelle de quelques

Synthèse bibliographique

nanomètres, nécessite donc de travailler en configuration "petits angles" afin de détecter les signaux relatifs à l'organisation de l'échantillon.

Le phénomène de diffraction correspond en fait à un phénomène de diffusion cohérente dans lequel une partie importante du faisceau est déviée par l'échantillon selon certains angles définis conduisant à l'apparition de pics de diffraction ou pics de Bragg. Un échantillon cristallin, donc présentant une organisation périodique de la matière, conduit à des diffractogrammes faits de différents pics dont les positions et intensités relatives permettent de déterminer la structure cristalline de l'échantillon. A l'opposé, un échantillon non cristallin, mais pouvant présenter une certaine structure à l'échelle locale (ne se répétant pas sur de grandes distances comme un cristal), ne permet pas l'obtention d'un signal de diffraction mais seulement d'un signal de diffusion à partir duquel il est néanmoins possible d'obtenir des informations structurales. Ainsi la diffusion de rayonnement, phénomène de déviation du rayonnement mais non cohérente, donc moins intense que la diffraction, permet également de caractériser de manière structurale un échantillon non cristallin mais présentant une certaine structure tel que des micelles de tensioactifs, des nanoparticules, des polymères, etc.

L'intensité diffusée est ainsi collectée en fonction de l'angle de diffusion θ . Néanmoins, dans le cas de la diffusion de rayonnement aux petits angles, l'intensité est généralement représentée en fonction du vecteur d'onde q (équation 2) qui permet d'accéder directement aux distances de répétitions correspondantes (équation 3) indépendamment de la longueur d'onde du rayonnement utilisé.

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (\text{équation 2}) \quad ; \quad q = 2\pi/d \quad (\text{équation 3})$$

où θ est le demi-angle de diffusion et λ la longueur d'onde du faisceau incident et d la distance correspondante. L'intensité diffusée $I(q)$ est généralement mesurée à des angles faibles permettant d'étudier des tailles caractéristiques allant des distances cristallographiques (quelques Angströms) à des distances colloïdales (0,1 micron).

L'intensité diffusée par des particules dispersées dans une phase continue telle que des micelles de caséines dans l'eau est donnée par l'équation suivante :

$$I(q) = \Delta\rho^2 \phi_V V_p P_q S_q \quad (\text{équation 4})$$

où $\Delta\rho^2$ est défini comme le terme de contraste entre la phase dispersée et la phase continue dont les valeurs dépendent du rayonnement utilisé, ϕ_V est la fraction volumique des particules et V_p le volume d'une particule sèche. P_q est appelé facteur de forme et ne dépend que de la géométrie d'une particule isolée (sphère, cylindre, disque, etc). S_q est appelé facteur de structure et décrit les interactions entre les particules. Le facteur de structure est ainsi égal à 1 pour de faibles fractions volumiques lorsque les particules n'interagissent pas entre elles à cause d'une dilution importante et n'influence ainsi pas l'intensité diffusée.

D'après l'équation 3, plus la longueur d'onde du rayonnement utilisé est grande, plus le vecteur d'onde correspondant est petit, donc plus les distances caractéristiques sont grandes (équation 4). Ainsi, la diffusion de la lumière ($400 < \lambda \text{ (nm)} < 800$) est utilisée pour l'étude d'objet relativement grand alors que la diffusion des rayons X et des neutrons (λ de l'ordre de l'Angström) permet de sonder la matière à des échelles plus petites, notamment colloïdales à partir de quelques nanomètres. Ainsi, la diffusion des rayons X et des neutrons sont des méthodes de choix pour étudier la structure interne des micelles de caséines. Ces deux techniques diffèrent par le rayonnement utilisé qui interagit différemment avec l'échantillon modifiant ainsi la valeur du terme de contraste $\Delta\rho^2$ de l'équation 4.

La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS - Small Angle X-ray Scattering) est basée sur les différences de densités électroniques entre les objets diffusants et le milieu continu. Les rayons X interagissant en effet avec les électrons des atomes constituant l'échantillon, le terme de contraste $\Delta\rho^2$ est défini comme la différence des densités électroniques entre les atomes formant la phase dispersée et ceux formant la phase continue.

Synthèse bibliographique

Dans le cas de la diffusion des neutrons aux petits angles (SANS- Small angle neutron Scattering), les neutrons arrivant sur l'échantillon interagissent avec les noyaux des atomes formant les phases dispersée et continue. Le terme de contraste $\Delta\rho^2$ de l'équation 4 est définie comme la différence des densités de longueur de diffusion inhérentes au noyau des atomes composant les phases en présence, notée b , dont les valeurs pour chaque atome sont connues et disponible dans des tables.

Dans les deux cas, les courbes de diffusion intensité = $f(q)$ permettent d'accéder à l'aide de modèles théoriques à la géométrie et à la taille de particules colloïdales, à la fraction volumique en particules, aux interactions entre particules, aux conformations des chaînes hydrophiles et hydrophobes pour des polymères amphiphiles par exemples ainsi qu'à d'autres paramètres décrivant le système ⁴³⁰. Elles permettent d'étudier également l'organisation en volume de ces systèmes, mais aussi en couches minces, sur des couches adsorbées ou greffées et même dans des milieux confinés ⁴³¹.

Les courbes de diffusion expérimentales sont une combinaison entre une composante reliée à la forme de la particule (facteur de forme) décrivant sa morphologie (taille et géométrie) et une composante d'interaction (facteur de structure) qui n'est pas négligeable lorsque la fraction volumique dispersée n'est pas faible. Le calcul de l'intensité diffusée pour des particules modèles permet, par ajustement des courbes théoriques et expérimentales, d'accéder aux différents paramètres structuraux. Selon les contrastes utilisés, il est possible d'obtenir les mêmes informations par SAXS.

La majeure partie des expériences de diffusion de rayonnement aux petits angles sont réalisées par SAXS de par le nombre de montages existant à l'échelle du laboratoire. Il est également possible de réaliser des expériences en utilisant le rayonnement synchrotron qui est beaucoup plus intense qu'un montage de laboratoire afin d'effectuer des expériences nécessitant des temps d'acquisition courts par exemple. Néanmoins, le point faible des rayons X réside dans le terme de contraste qui est difficile à faire varier pour étudier un échantillon dans différentes conditions (en l'illuminant différemment). Il est en effet difficile de faire varier la densité électronique des différents composants d'un système sans modifier ses propriétés. Il est ainsi possible de modifier la densité électronique d'une phase continue

aqueuse en y rajoutant des sels, mais ceux-ci risquent de modifier le système. La diffusion des neutrons, étant basée sur l'interaction neutrons/noyau, est plus facilement modulable en jouant sur les différents isotopes d'un atome. Il est ainsi possible de faire varier la densité de longueur de diffusion (b) d'une phase tout en gardant des propriétés physiques et chimiques proches. La principale utilisation de la technique de "variation de contraste" consiste à effectuer des expériences de diffusion de neutrons en remplaçant la phase aqueuse constituée généralement d'eau légère (H_2O) par de l'eau lourde (D_2O) ou par un mélange eau lourde/eau légère. La différence importante entre les valeurs de b pour l'hydrogène ($b_H = -0,374 \text{ cm}$) et pour le deutérium ($b_D = 0,667 \text{ cm}$) permet de facilement modifier la densité de longueur de diffusion de la phase aqueuse. Par ailleurs, la majorité des éléments présents dans la matière organique présente une valeur de b comprise entre celle de l'hydrogène et celle du deutérium. Il est également possible de deutérer une partie de l'échantillon afin de modifier le contraste global. Il est ainsi possible "d'effacer" ou de rendre invisible une particule ou une partie d'une particule en égalisant les valeurs de b , donc en rendant nul le terme de contraste $\Delta\rho^2$. L'inconvénient des expériences SANS est qu'elles nécessitent un réacteur nucléaire pour la production de neutron. Il n'existe ainsi que peu de montages disponibles. Le flux de neutron est aussi beaucoup plus faible qu'un flux de rayons X, les expériences nécessitent donc plus de temps d'acquisition.

Cette méthode de variation des contrastes est donc souvent mise à profit. En modifiant la densité de longueur de diffusion du solvant, il est possible d'éclairer une population particulière de particules ou une partie spécifique des particules. Par exemple, en choisissant le solvant de façon à masquer la partie hydrophile d'une micelle dans l'eau, il est possible d'en observer le cœur hydrophobe. Dans le cas des micelles de caséines, il est ainsi possible de détecter seulement le signal de diffusion des nanoclusters de phosphate de calcium en utilisant en tant que phase continue un mélange H_2O/D_2O présentant une même valeur de densité de longueur de diffusion que la fraction protéique de la micelle. Cette dernière apparaîtra ainsi invisible aux neutrons et le signal enregistré ne dépendra que des nanoclusters.

4.3. Les modèles de structure de la micelle de caséine

L'existence des micelles de caséines a été convenue au dix-neuvième siècle mais ce n'est qu'à partir des années 1960 que l'intérêt de définir la structure interne et externe de la micelle voit le jour ⁴³². Définir la structure de cette micelle permettra de comprendre son rôle pendant les divers traitements tels que la coagulation lors de l'acidification et son effet sur la structure et sur les propriétés du coagulum. Malgré l'abondance des études sur le sujet, la structure interne et celle de la surface de la micelle ne sont pas encore parfaitement connues et font l'objet de débats. Plusieurs modèles ont ainsi été proposés. La plupart peuvent être classés en cinq catégories : le modèle cœur enveloppe, le modèle à sous-unités, le modèle à dualité de lien, le modèle des nanoclusters et enfin le modèle poreux.

4.3.1. Les modèles cœur-enveloppe

Ce modèle a été développé par Waugh et Nobel en 1956 suite à des études sur la solubilité des caséines en présence de calcium ⁴³³. Les auteurs se sont basés sur la présence des caséines sensibles au calcium, α_s et β , au cœur de la micelle et sur la stabilisation de ces dernières par une couche de caséine κ sur la surface (Figure 44).

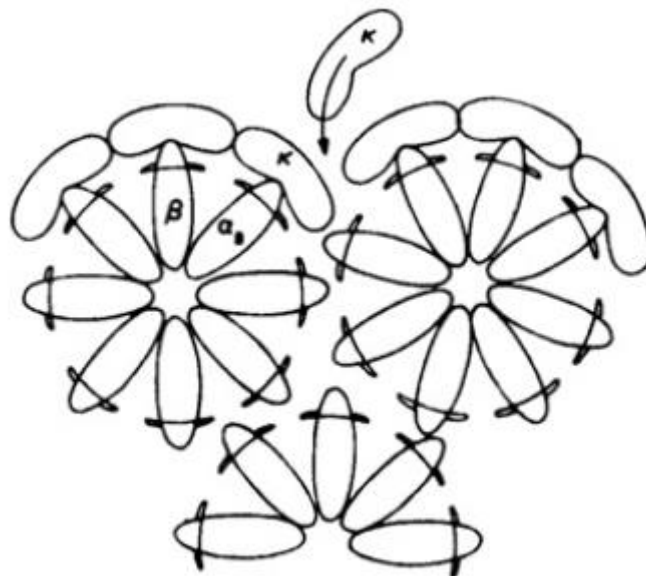


Figure 44. Modèle de la micelle de caséine « cœur-enveloppe » proposée par Waugh et al 1965 ⁴³³.

4.3.2. Le modèle à sous-unités

Ce modèle proposé par Schmidt en 1982 suppose que la micelle est constituée de sous-unités ou sous-micelles (sub-micelles) de caséines liées entre elles par des ponts de phosphate de calcium (Figure 45). Dans cette proposition de structure, le phosphate de calcium sous forme colloïdal (CaP) couvre en partie la surface des sous-micelles et joue le rôle de ciment pour relier ces unités entre elles. La composition en caséines des sous-micelles a déterminé leur positionnement dans la micelle. Les sous-unités situées au cœur de la particule sont plus riches en caséines β et α_{s1} et pauvres en caséine κ alors que celles en surface sont plus riches en caséine κ comme dans le modèle proposé par Waugh *et al.* (1965). Des arguments en faveur d'une structure sous-micellaire reposent principalement sur des observations en microscopie électronique : des sous-unités petites et sphériques sont ainsi observées

434,435.

Modèle des sous-micelles

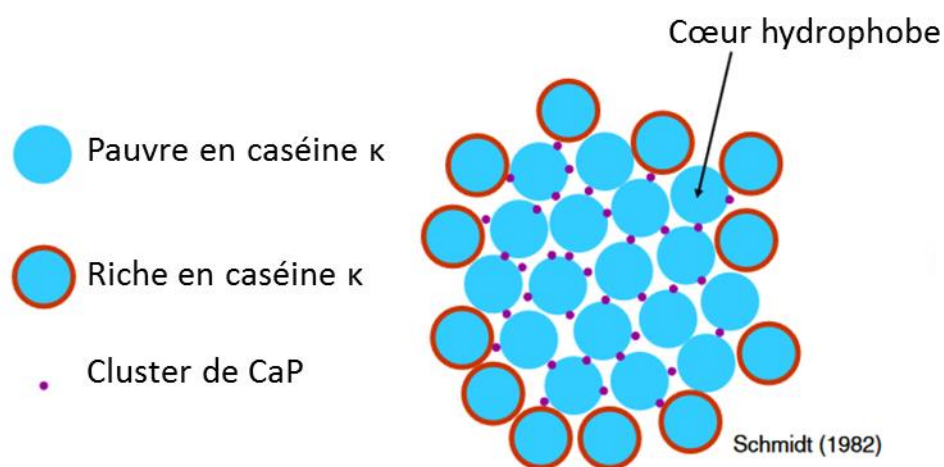


Figure 45. Modèle « à sous-unités » de micelle de caséine proposée par Schmidt en 1982⁴³⁴: représentation schématique de la micelle composée de deux types de sous-unités reliées par le phosphate de calcium colloïdal.

Ce modèle a été modifié par Walstra *et al.* en 1990 notamment sur la fraction CaP qui s'internalise dans les submicelles (Figure 46)⁴³⁵.

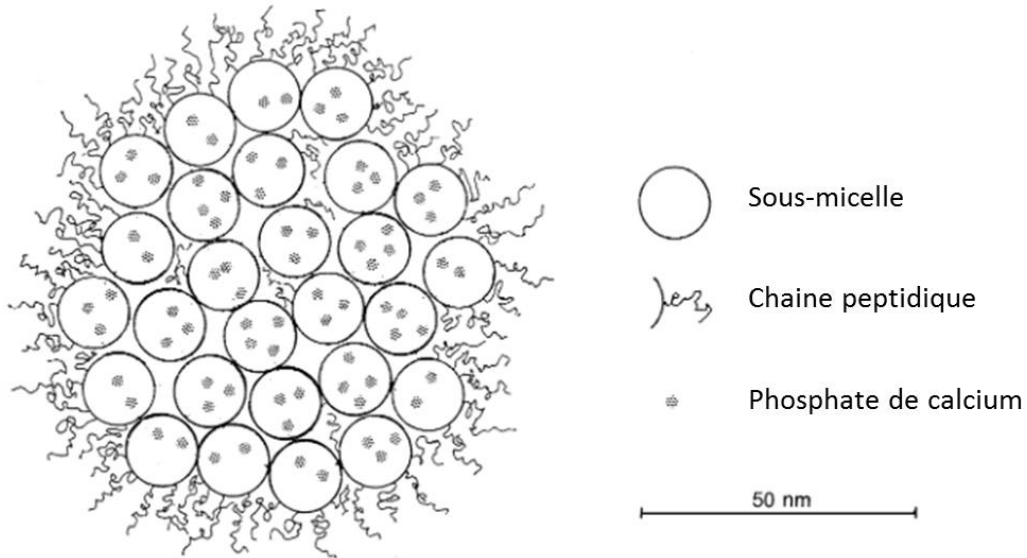


Figure 46. Modèle « à sous-unités » de micelle de caséine corrigé par Walstra en 1990 ⁴³⁵.

L'existence de deux types de sous-micelles et leur assemblage sont nécessaires dans ce modèle à sous-unités pour expliquer la localisation des caséines κ en surface, or l'existence de ces deux formes et les mécanismes expliquant leur formation n'ont jamais été établis ²⁴⁹. De plus, séparer les caséines du phosphate de calcium durant le processus d'assemblage n'est pas possible sachant que la phosphorylation des protéines est une étape post-traductionnelle (étape après la traduction de l'ARNm en protéine) immédiate et qui précède l'auto-assemblage des chaînes protéiques en sous-unités micellaires.

C'est grâce aux observations réalisées par SEM (Scanning Electron Microscopie, microscopie électronique à balayage) et par TEM effectuées par McMahon et McManus en 1998 que le modèle de sous-micelle a été complètement rejeté ⁴³⁶. En effet, ces observations microscopiques soulignent une structure interne micellaire hétérogène. Les sous-unités s'avèrent être non sphériques mais tubulaires et la surface non lisse mais contenant des gaps entre les différentes sous structures (Figure 47).

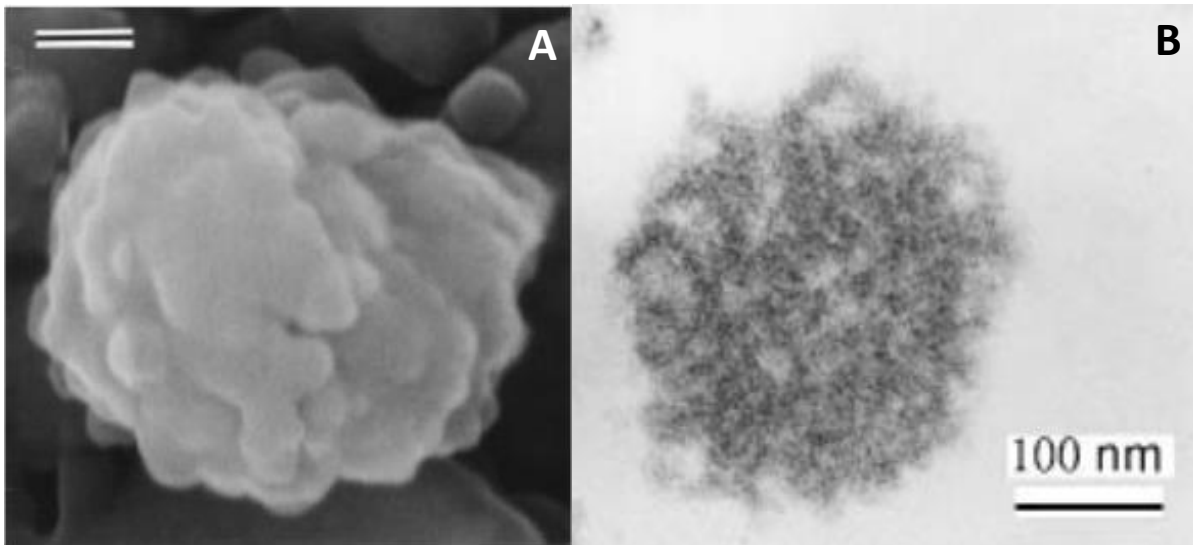


Figure 47. Photographies en microscopie électronique de la micelle de caséines : (A) micelle de caséine adsorbée sur une membrane de céramique observée par microscopie électronique à balayage ou SEM. L'échantillon a été recouvert par une couche d'iridium de 2 nm avant observation avec un grossissement de X 70 000. Barre d'échelle = 100 nm. (B) La micelle de caséine observée par microscopie électronique à transmission avec un grossissement de X 85 000. Barre d'échelle = 100 nm. (d'après McMahon, 1998) ⁴³⁶

4.3.3. Modèle à dualité de lien (dual bonding model)

Le modèle à dualité de lien proposé par Horne en 1998 stipule que les caséines s'associent par des interactions hydrophobes et par des ponts phosphocalciques aux niveaux des fragments hydrophiles en utilisant le phosphate de calcium colloïdal (CaP) (Figure 48). Dans ce modèle existe un véritable équilibre entre les interactions hydrophobes attractives et les interactions électrostatiques répulsives ⁴³⁷, d'où le nom de "dualité de lien". L'attraction hydrophobe serait le moteur de la formation des micelles et les répulsions électrostatiques limiteraient la croissance des micelles. Le phosphate de calcium colloïdal neutralise les charges négatives du phosphate des résidus de sérine phosphorylés. Il en résulte une diminution des répulsions électrostatiques et l'association de nouvelles protéines par l'effet hydrophobe dominant. Les caséines κ interagissent avec la structure par effet hydrophobe et ne peuvent pas fixer le phosphate de calcium. Elles sont donc incapables de prolonger les chaînes de caséines et stoppent ainsi la croissance de la micelle ⁴³⁷.

Synthèse bibliographique

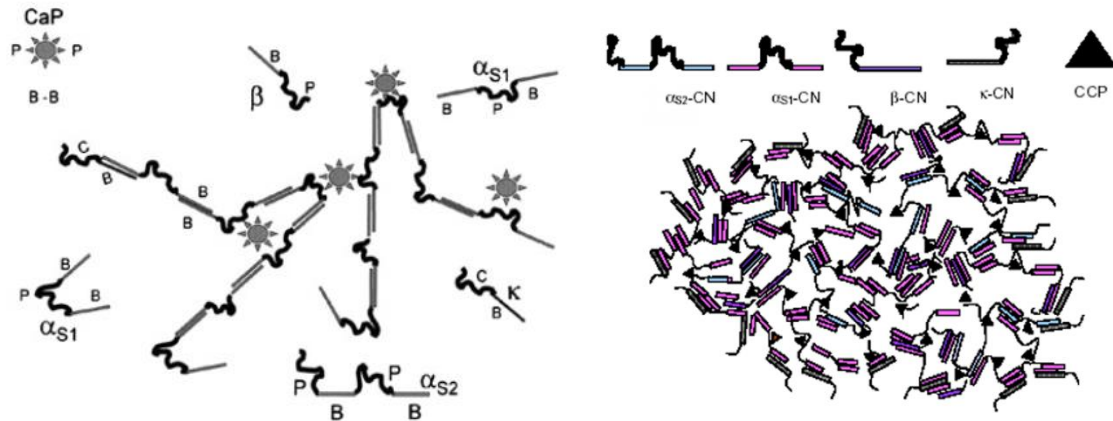


Figure 48. Modèle à dualité de lien proposé par Horne et al. en 1998⁴³⁷ et repris par Livney en 2010⁴³⁸ : les caséines sont reliées au niveau des fragments hydrophobes représentés par les barres rectangulaires et sont liées par les nanoclusters de calcium colloïdal phosphate (CCP)⁴³⁷.

La base de ces trois premiers modèles repose sur l'observation de l'auto-assemblage des caséines et des structures micellaires même en absence de calcium. Le phosphate de calcium colloïdal permettrait d'assurer la cohésion de la structure. Ces idées s'accorderaient avec la notion de biologie structurale : la structure suit la fonction⁴³⁹.

Plus tard, des expériences de diffusion des rayons X et des neutrons aux petits angles mettent en évidence un signal spécifique sur les courbes de diffusion pour des valeurs de vecteur d'ondes q proches de $0,35 \text{ nm}^{-1}$. "L'inflexion" ou "l'épaulement" de l'intensité en fonction de q apparaissant sur les spectres SAXS devient plus marqué en SANS en utilisant la méthode de variation de contraste pour "effacer" le signal de diffusion des protéines (en utilisant une proportion de D_2O de 41%) et donc observer uniquement le signal relatif au CaP (Figure 49). Les résultats mettent ainsi en évidence des profils de diffusion dans lesquels un maximum est repéré à des valeurs de $q = 0.35 \text{ nm}^{-1}$ correspondant à une distance de corrélation de 18 nm (Figure 49) dû à la contribution du facteur de structure des nanoparticules de CaP⁴⁴⁰.

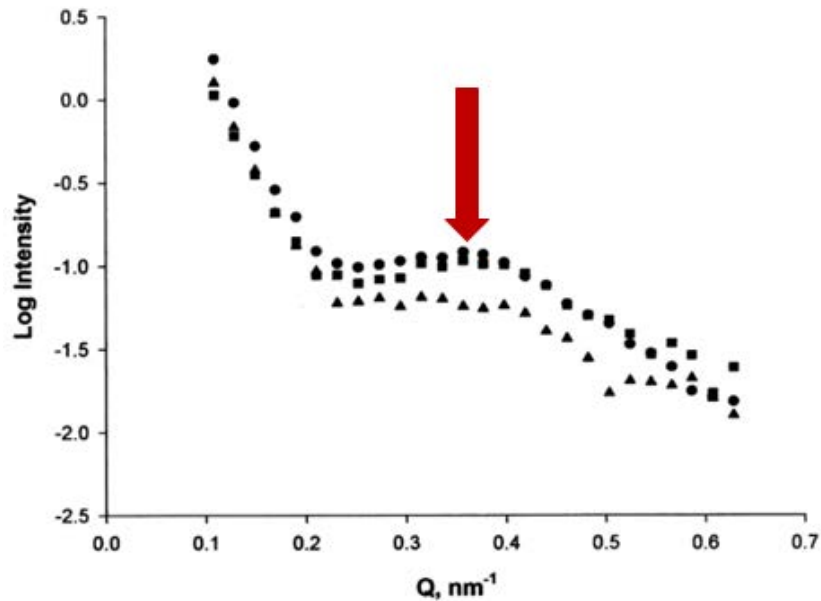


Figure 49. Profil SANS (diffusion des neutrons à petits angles) d'une dispersion de caséines micellaires proposé par Holt et al. (2002). Le pic à $q = 0,35 \text{ nm}^{-1}$ met en évidence le phosphate de calcium colloïdal (CaP) correspondant à une distance de corrélation de 18 nm

L'organisation des nanoparticules de CaP semble ainsi ne pas être totalement désordonnée avec une distance de corrélation entre les CaP d'environ 18 nm, ce qui est mal pris en compte dans les modèles des sous-micelles ou à dualité de liens.

4.3.4. Modèle des nanoclusters

Le modèle des nanoclusters proposé par Holt en 2003⁴⁴¹, correspondant bien aux résultats TEM de McMahon et McManus⁴³⁶, repose sur les interactions entre les caséines et le CaP afin de maintenir une entité micellaire (Figure 50). Il suggère que la micelle peut être assimilée à un gel protéique poreux intégrant des nanoparticules de phosphate de calcium colloïdal, un véritable moyen de pontage. Ces nanoparticules sont dispersées dans le réseau à une distance moyenne de 18 nm en relation avec le pic de corrélation observé en SANS. Elles sont par ailleurs liées aux caséines au niveau des résidus phosphorylés. L'association des caséines est le résultat d'un ensemble d'interactions de faible énergie (effet hydrophobe, liaison hydrogène, liaison ionique, interaction électrostatique et de Van der Waals). La matrice formée est caractérisée par plusieurs fluctuations mineures de la densité protéique locale. Comme dans les autres modèles, les caséines κ limitent l'association des caséines et exposent leurs

Synthèse bibliographique

extrémités C-terminales vers l'extérieur de la particule pour former une enveloppe « chevelue ». Ce modèle implique une répartition plus homogène des caséines au sein de la micelle ⁴³⁹.

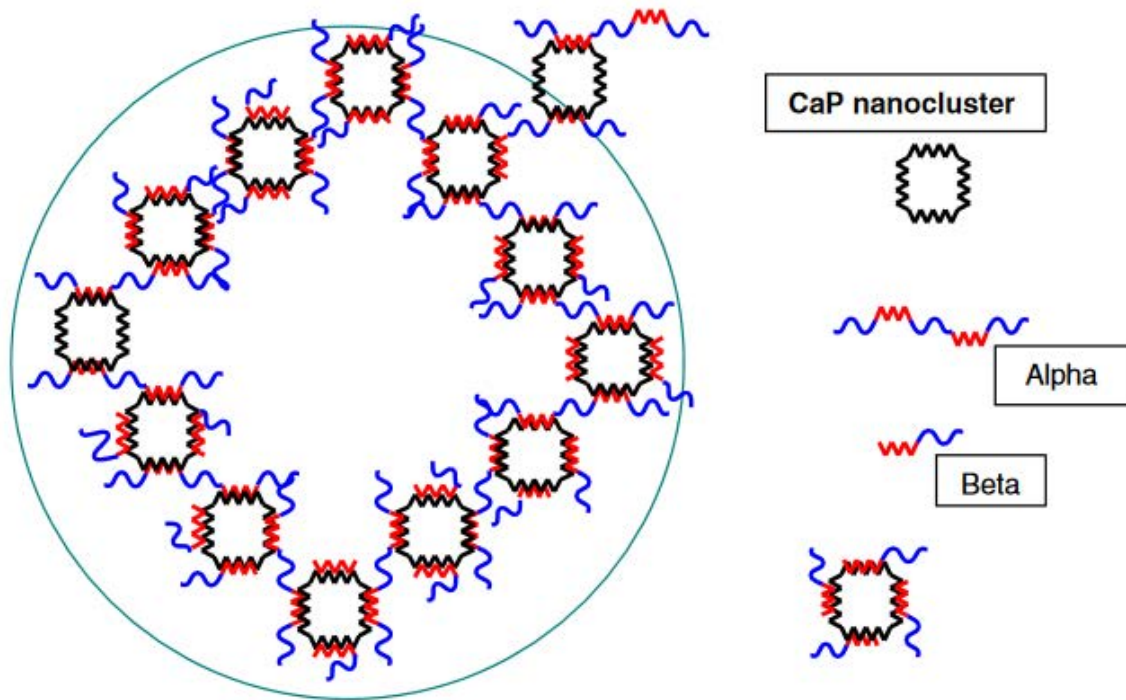


Figure 50 Modèle des nanoclusters proposé par Holt et al. en 1994 puis en 2003 : structure formée par un réseau homogène de chaînes protéiques réticulées par les nanoclusters de phosphate de calcium colloïdal et une région externe chevelue de faible densité . ^{440,441}.

Ce modèle semble le mieux adapté pour expliquer les résultats obtenus par diffusion de neutrons et de rayons X ²⁴⁹ (Figure 51).

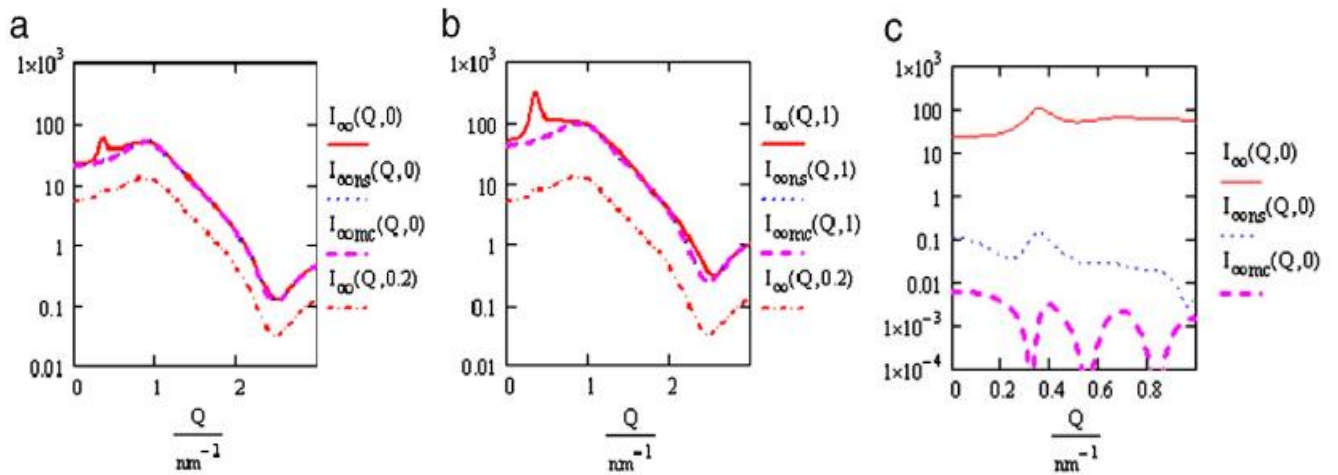


Figure 51. Profils SANS calculés selon différents modèles de dispersions de caséines micellaires dans (A) de l'eau et (B) de l'eau lourde D₂O. C) Profils SAXS (diffusion des rayons X à petits angles). Le signal SAXS des nanoclusters est représenté par un trait plein rouge ⁴³⁹.

En couplant des profils SANS modélisés où les caséines sont dispersées dans de l'eau légère et dans de l'eau lourde avec les profils SAXS, le modèle décrivant le CaP comme distribué en tant que nanocluster (trait plein rouge sur la figure 51) est le meilleur permettant d'expliquer les pics observés sur les profils de diffusion. Dans la figure 51.c, le profil SAXS met clairement en évidence le pic à $q = 0.35 \text{ nm}^{-1}$ relatif au CaP nanocluster ou à des sous micelles. Pour pouvoir trancher, les expériences SANS par variation de contraste et de normalisation du facteur de forme afin de mettre en évidence la contribution du facteur de structure sont essentielles. Il est évident dans la figure 8.b que le pic à $q = 0.35 \text{ nm}^{-1}$ est plus marqué quand les caséines sont dispersées dans un milieu majoritairement composé de D₂O. Si ce pic correspondait aux sous micelles, il disparaîtrait une fois les micelles de caséines dispersées dans le mélange 40 % H₂O et 60 % D₂O (proportion permettant d'annuler le contraste entre les protéines et la phase continue). Ainsi, ce pic correspondrait bien au signal relatif aux CaP nanoclusters et non pas une sous structure micellaire.

De plus, sachant que le rayon d'un CaP nanocluster est de 2,6 nm et que la distance séparant les deux résidus sérines de la caséine α_{s1} est de 4 nm, la distance séparant le centre du premier CaP lié du deuxième est donc de 9 nm et non pas de 18 nm comme relevé précédemment. Cela peut être expliqué par la structure de la caséine α_{s1} qui grâce à son deuxième résidu sérine phosphorylé se lie au même

Synthèse bibliographique

nanocluster et forme une boucle. La caséine β , elle, ne possédant qu'un seul résidu sérine phosphorylé permet donc de limiter la croissance de la micelle. En effet, la taille de cette micelle est contrôlée par un parfait équilibre entre la formation des boucles ou « loop formation », le cross-linking des caséines α_{s1} et α_{s2} avec le CaP nanocluster et la limitation de croissance imposée par la caséine β . La taille sera donc dépendante du nombre de caséines α et β présentes dans le système ; cette hypothèse reste cependant sans preuve de confirmation, ce qui présente donc la limite principale du modèle de Holt.

4.3.5. Le modèle poreux

L'étude de la structure supramoléculaire de la micelle de caséine a été poursuivie par McMahon et Oommen en 2007 à partir d'observations TEM des échantillons de protéines adsorbées sur une grille en cuivre recouverte par une couche de poly-L-Lysine et de parlodion⁴⁴². Les caséines et le phosphate de calcium ont été marqués par de l'oxalate d'urée, congelés instantanément et séchés sous vide. Les images obtenues en microscopie électronique à transmission à haute résolution révèlent une structure complexe entrelacée dans laquelle les agrégats de phosphate de calcium et de caséines d'une part et les chaînes de polymères de caséines d'autre part interagissent ensemble pour former une entité micellaire stable. Les chaînes de caséines linéaires et ramifiées sont entrelacées par les nanoclusters de phosphate de calcium et des interactions multiples régissent ces structures. Cette combinaison de structures et d'interactions permet d'introduire un modèle micellaire à structure ouverte et poreuse résistante aux modifications du milieu (Figure 52). Les interactions hydrophobes entre les caséines entourant le nanoclusters de phosphate de calcium empêchent la dissociation de la micelle quand ce nanocluster est solubilisé. De plus, les interactions électrostatiques entre caséines empêchent la déstabilisation micellaire une fois le lait réfrigéré pouvant entraîner la déplétion de la caséine β ou suite à l'addition d'urée.

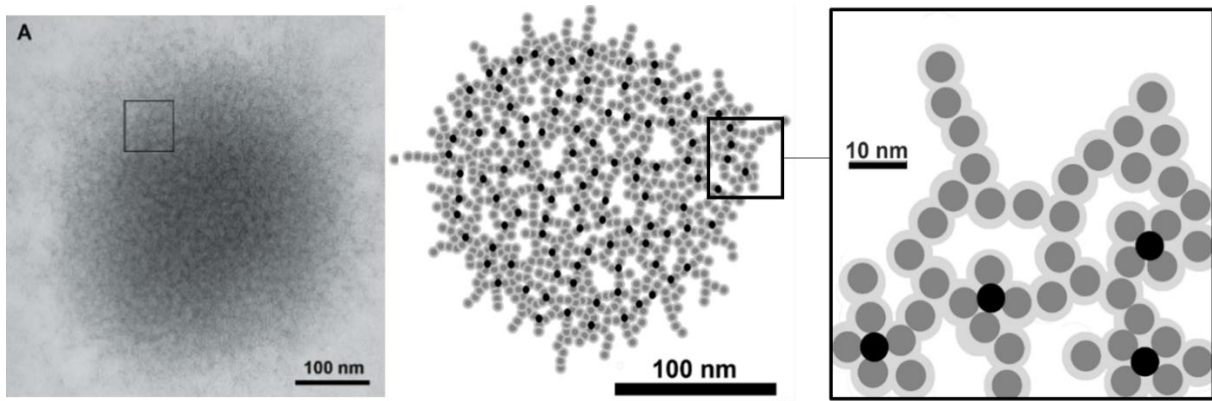


Figure 52. La micelle de caséine immobilisée et observée par Cryo-TEM. A sa droite, un schéma illustrant le modèle poreux de la micelle de caséine entière définie par McMahon et al. (2007). Un zoom sur la périphérie de la micelle montre les nanoclusters de phosphate de calcium (boule noire) de 4,8 nm de diamètre avec un espace intermicellaire de 18 nm. Les caséines sont aussi illustrées avec un diamètre hydrodynamique de 8 nm (boule grise) ⁴⁴².

Bouchoux en 2010 étudie l'évolution de la structure de la micelle en cours de contraction par déshydratation osmotique par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ⁴⁴³ (Figure 53)

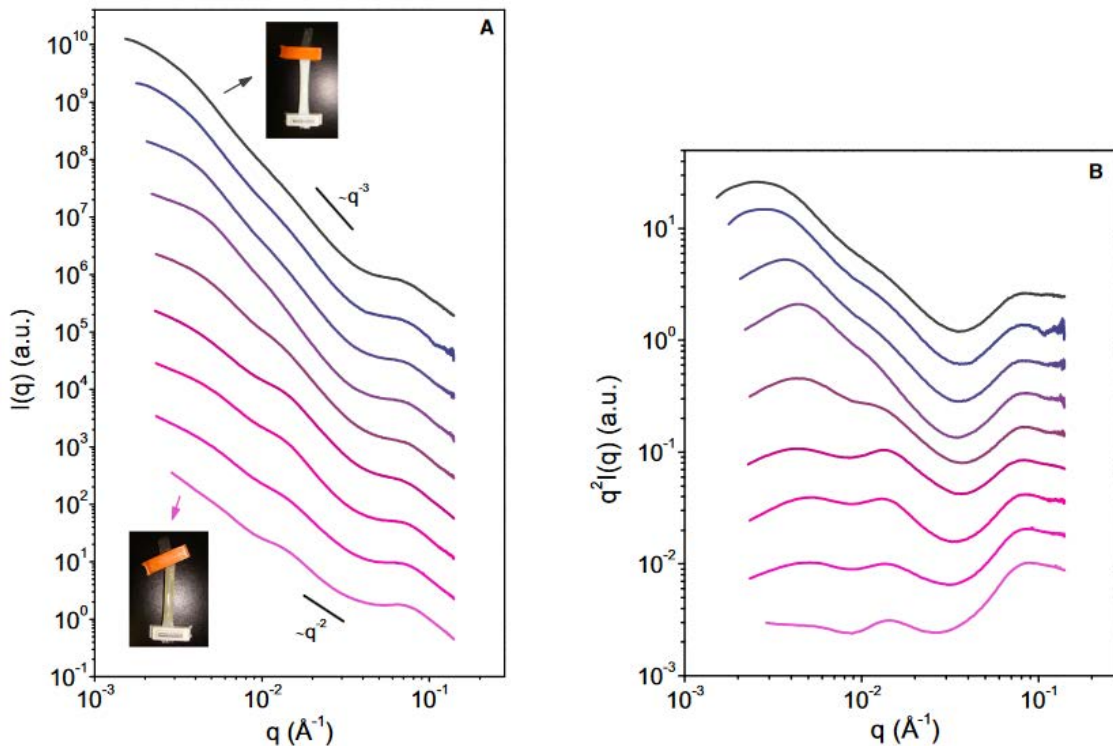


Figure 53. (L'évolution de la structure de la micelle en cours de contraction par déshydratation osmotique par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) (A) Profils SAXS des dispersions de caséines micellaires à des concentrations (de haut en bas) de 25, 33, 100, 150, 167, 206, 337, 365, et 400 g.L-1. Les données ont été décalées le long de l'axe des ordonnées pour une meilleure observation. A 25 g.L-1, les dispersions sont turbides et liquides alors qu'à une concentration de 400 g.L-1, elles ont l'aspect d'un gel transparent. La transition entre le liquide et le gel se fait à des concentrations entre 150 et 200 g.L-1 de caséines. (B) représentation log-log de Kratky ($q^2I(q) = f(q)$) avec q , le vecteur d'onde et I , l'intensité de lumière diffusée.

Synthèse bibliographique

La figure 53 représente les profils de diffusion SAXS obtenus pour des concentrations de dispersions caséiques allant de 25 à 400 g.L⁻¹. Pour un premier intervalle de concentration allant de 25 à 150 g.L⁻¹, les changements observés sont limités aux petits angles q où l'épaulement correspondant aux distances entre micelles se déplace vers des plus grands angles indiquant un rapprochement intermicellaire. Dans cette même gamme de concentration, les dispersions sont liquides et turbides. Les mesures de viscosité et de pression osmotique prouvent que les micelles interagissent en tant que sphères qui se repoussent et dont la compression ne fait que modifier leurs positions relatives. Cela a été aussi confirmé par le facteur de structure $S_{eff}(q)$ obtenu en divisant l'intensité de diffusion $I(q)$ d'une concentration caséique par l'intensité de diffusion de la plus faible concentration (25 g.L⁻¹) dans laquelle seule la contribution du facteur de forme apparaît (Figure 54)

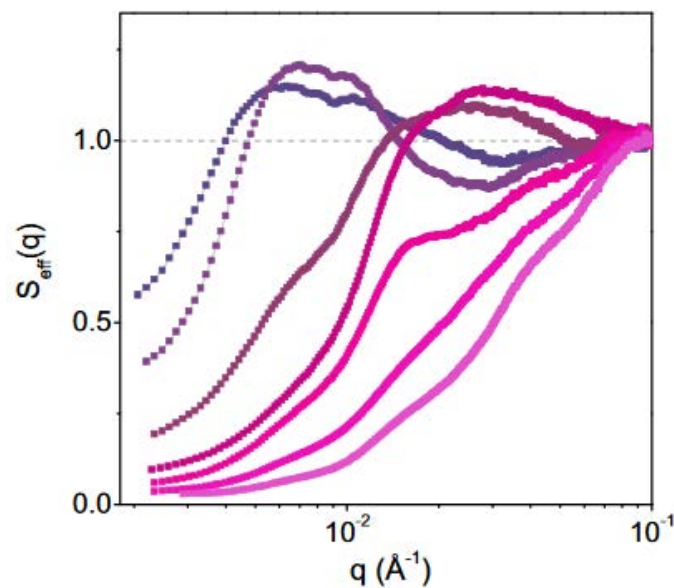


Figure 54. Le facteur de structure $S_{eff}(q)$ mesuré pour les dispersions de caséines micellaires à des concentrations (de haut en bas) de 100, 150, 167, 206, 337, 365, et 400 g.L⁻¹.

Le facteur de structure ressemble beaucoup à celui des dispersions concentrées de particules solides ou de nanoémulsions. Cela confirme alors qu'il n'y a pas de changement de la structure interne micellaire.

Pour le deuxième intervalle de concentrations ($C > 150$ g.L⁻¹), l'augmentation de la concentration conduit à un changement beaucoup plus significatif. Le changement principal est le fait que les profils

SAXS ont tendance à s'aplatir avec l'augmentation de la concentration caséique. Un deuxième changement est observé au niveau des vecteurs d'ondes q intermédiaires où les oscillations deviennent de plus en plus importantes contrairement à l'épaule observé aux faibles angles qui devient de moins en moins prononcé avec l'augmentation de la concentration caséique. Le facteur de structure $Seff$ devient de plus en plus large et se déplace vers des grandes valeurs de q et donc vers la structure interne micellaire. En effet, au début du deuxième intervalle, pour des concentrations de 150-200 g.L⁻¹, la pression osmotique augmente soudainement et les micelles de caséines interagissent fortement et se rapprochent. Les dispersions ne sont plus considérées comme liquides mais comme des solides mous poreux. A des concentrations encore plus importantes, les micelles sont très proches et ont tendance à se contracter et à se relâcher. Ces dispersions acquièrent les propriétés viscoélastiques des gels. Pour résumer, quand la phase aqueuse séparant les micelles de caséines est extraite, ces structures se comportent en tant que des sphères polydisperses dont la structure interne n'est pas affectée. Quand elles sont comprimées, les micelles perdent de l'eau et leur volume diminue. Les résultats indiquent que la compression n'est pas affine : certaines parties de la micelle sont modifiées alors que d'autres résistent à la déformation. Pour ce, Bouchoux propose un modèle « type éponge » ou modèle poreux de la structure micellaire à trois niveaux hiérarchiques (Figure 55): un niveau bas formé des nanoclusters de phosphate de calcium qui servent de points d'ancrage aux caséines, un niveau intermédiaire constitué de régions rigides de 10 à 40 nm résistantes à la compression et contenant les nanoclusters et le dernier niveau formé de la micelle de caséine elle-même avec une taille moyenne de 100 nm.

Synthèse bibliographique

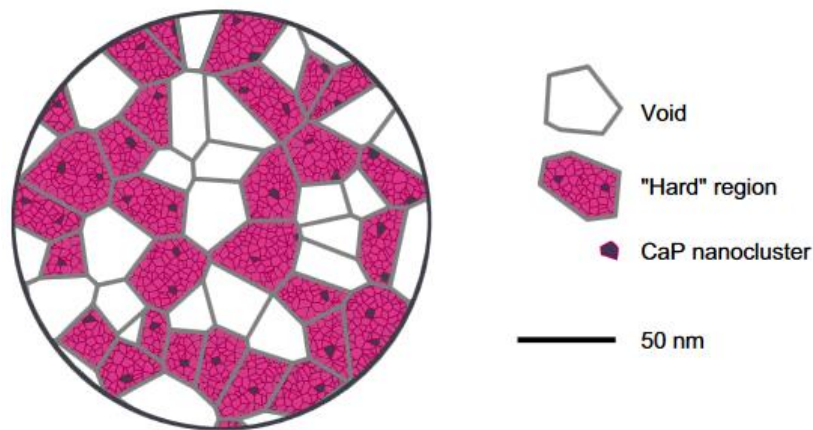


Figure 55. Le modèle poreux proposé par Bouchoux et al en 2010 : la micelle est formée de régions molles composées de vide ou de solvant et de régions rigides contenant les nanoclusters de phosphate de calcium et les molécules de caséines représentées par des boules de 25 nm ⁴⁴³.

Enfin, une description de la micelle prenant en compte le rôle de l'eau dans le maintien de la structure a été proposée par Dalgleish *et al.*, en 2011 ²⁴⁹. La présence de régions protéiques denses avec des domaines hydrophobes serait en contradiction avec une distribution uniforme de l'eau à l'intérieur de la micelle. L'eau serait présente à l'intérieur de la micelle sous forme de canaux ou de domaines stabilisés par les caséines β .

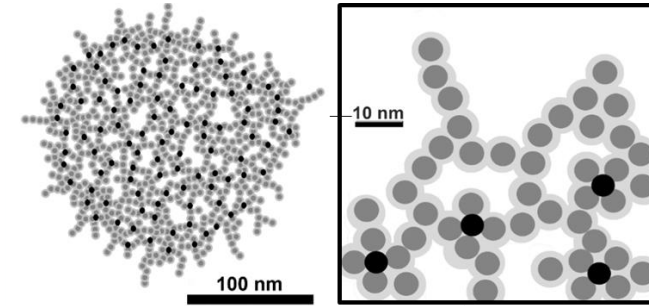
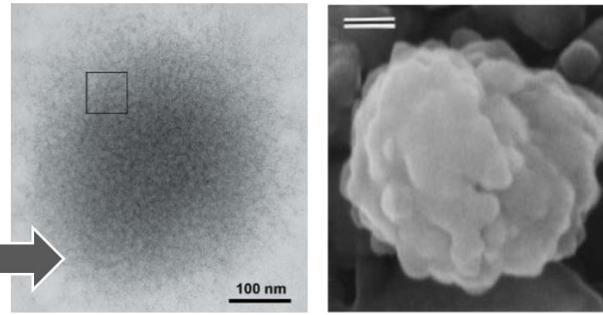
Un schéma récapitulatif résumant l'évolution de la structure micellaire est représenté par la figure 56.

Étude sur la solubilité de la caséine en présence de calcium

Sous-unités sphériques et surface étanche observées par TEM



McMahon *et al.*
Cryo-TEM :
structure
hétérogène



<p>Waugh <i>et al.</i> 1956 Modèle Cœur Enveloppe</p>	<p>Schmidt <i>et al.</i> 1982 Modèle des sous-unités</p>	<p>Horne <i>et al.</i> 1998 Modèle à double dualité</p>	<p>Holt <i>et al.</i> 1994-2003 Modèle des nanoclusters</p>	<p>McMahon, Bouchoux, Dalgleish, De Kruiif 2007-2017 Modèle poreux</p>



Figure 56. Schéma récapitulatif illustrant l'évolution de la structure micellaire depuis 1956 avec les différents modèles suggérés par les auteurs suivants: Waugh *et al* (1956), Schmidt *et al* 1982, Horne *et al* 1998 et 2005, Holt *et al*, 2003, McMahon *et al*, 1998 et 2007, Bouchoux *et al*, 2010, Dalgleish *et al*, 2011, Mata *et al*, 2011, De Kruiif *et al*, 2012 et 2014. Les différentes observations de microscopie électronique à transmission (TEM) et SAXS sont aussi évoquées ^{249,433,434,436,437,439,440,442-446}.

Synthèse bibliographique

En se basant sur tous ces modèles, la structure complexe de la micelle de caséine fait aussi sa force en tant que matrice de vectorisation et d'encapsulation de bioactifs. Ces propriétés de structure, de surface, d'auto-assemblage seront plus détaillées dans la section qui suit en plus de ces propriétés d'interaction, de protection, de relargage contrôlé et surtout de ses propriétés technofonctionnelles qui font d'elle une matrice d'encapsulation de bioactifs remarquable.

4.4. La micelle de caséine : vecteur de biomolécules

Parmi les nombreux systèmes d'encapsulation disponibles, les nanoparticules à base de protéines ont joui d'un intérêt considérable ces dernières années. Les caséines du lait sont considérées comme des vecteurs naturels de composés bioactifs. Leur structure et leurs propriétés physicochimiques permettent leur utilisation à des fins d'encapsulation et de libération contrôlée de composés d'intérêt dans des applications alimentaires ²⁵¹. Leur caractère non toxique et leur stabilité au cours des procédés de transformation les rendent d'autant plus intéressantes ²⁶⁵.

4.4.1. Propriétés de surface et d'auto-assemblage

Les caséines se distinguent par des propriétés de surface et d'assemblage particulières. En effet, les micelles de caséine sont des auto-assemblages à caractère amphiphile disposant d'une structure ouverte très hydratée contenant 3,7-4 g d'eau/g de protéine ^{442,447,448}. Elles sont stabilisées par une couche de κ -caséines qui permettent une stabilisation stérique ⁴⁴⁹ et électrostatique. Elles possèdent une structure poreuse à travers laquelle peuvent diffuser des petites molécules bioactives ²⁴⁹. Leur caractère amphiphile leur permet de se placer aux interfaces huile/eau et de jouer le rôle d'émulsifiant dans des systèmes d'encapsulation ⁴⁵⁰. L'assemblage des caséines sous forme de micelles ou l'auto-assemblage de caséines individuelles comme la β -caséine génère des nanovecteurs qui peuvent être chargés par divers composés. L'encapsulation et la stabilisation de composés thérapeutiques hydrophobes tels que la curcumine par la β caséine ont été déjà étudiées ^{260,451}. D'une part, la capacité des caséines à s'auto-assembler a permis aussi l'encapsulation du beta carotène le protégeant ainsi de la dégradation pendant les procédés de traitements industriels tels que la stérilisation, la

pasteurisation et le traitement à haute pression hydrostatique ³⁶⁷. D'autre part, il a été démontré qu'il était possible d'encapsuler la vitamine liposoluble D2 en utilisant l'aptitude des caséines à se réassembler en micelles. Les micelles de caséines réassemblées autour de la vitamine ont permis de la stabiliser dans un environnement aqueux et d'augmenter sa biodisponibilité ²⁶⁵.

4.4.2. Propriétés d'interaction avec d'autres molécules

Les caséines ont la capacité de former des complexes avec diverses molécules de petite taille et peuvent se lier à des composés hydrophobes (vitamines liposolubles, polyphénols, acides gras, colorant...) principalement *via* des interactions hydrophobes et de Van der Waals ^{452,453}. La micelle de caséine elle-même peut véhiculer le calcium⁴⁴¹ et ce dernier peut être même substitué par le fer afin de le stabiliser ⁴⁵⁴⁻⁴⁵⁶. En effet, les nanoparticules d'oxyde de fer interagissent avec les micelles de caséines pour former des agrégats linéaires (je crois ce qui indique que le fer est internalisé) de 615 nm de taille ⁴⁵⁶. En outre, les régions hydrophobes des caséines sont de véritables sites d'interaction avec les bioactifs hydrophobes. L'encapsulation de la curcumine par les micelles de caséines a été étudiée dans le but de créer des vecteurs qui permettraient de délivrer des composés à effets thérapeutiques et à activité antioxydante intéressante ^{438,451}. L'interaction de la curcumine avec la micelle de caséines a été étudiée par Benzaria et al, 2013 par spectroscopie de fluorescence ; les résidus tryptophane de la micelle de caséines et la curcumine interagissent *via* des interactions hydrophobes ⁴⁵⁷. L'interaction des caséines avec d'autres polyphénols, en particulier les polyphénols du thé, a été décrite par plusieurs auteurs ^{328,458}. Les polyphénols du thé sont capables de se fixer sur les caséines α et β *via* essentiellement des interactions hydrophobes. Ces interactions modifient la structure secondaire des caséines et contribuent à leur dépliement ⁴⁵⁹.

4.4.3. Propriétés de protection

L'acide docosahexaénoïque (DHA), un acide gras polyinsaturé oméga-3 permettant de réduire le risque des maladies cardiovasculaires et autres pathologies, a été encapsulé dans des micelles de caséines réassemblées ⁴⁶⁰. L'encapsulation a montré un pouvoir de protection remarquable contre l'oxydation du DHA. Cette protection peut être expliquée par l'incapacité des agents d'oxydation de pénétrer la

Synthèse bibliographique

barrière stérique des micelles. D'autre part, les micelles absorbent et diffusent la plus grande partie de la lumière reçue et l'empêche ainsi d'atteindre les molécules de DHA encapsulées ⁴⁶⁰. Les capacités protectrices des caséines contre l'oxydation et leur propriété d'absorption des rayons UV peuvent servir pour stabiliser des composants bioactifs sensibles. Ces études suggèrent la possibilité d'utiliser les micelles comme vecteurs pour des composés nutraceutiques hydrophobes tels que la vitamine D ^{265,461}, le beta carotène ³⁶⁷ et la curcumine face à la photodégradation ^{55,111,462}. Une étude sur l'encapsulation des lipides polyinsaturés (PUFA oils) par des micelles de caséines a démontré que l'utilisation du pH alcalin et du traitement à l'ultrason permettent d'augmenter la taille des micelles chargées et d'améliorer leur stabilité et leur capacité d'encapsulation ³⁵⁹.

4.4.4. Propriétés de relargage contrôlé

L'un des aspects les plus importants dans l'encapsulation est le contrôle du relargage des composés encapsulés. Quand les produits encapsulés sont des composés thérapeutiques ou nutraceutiques sensibles, le vecteur ou la matrice doit permettre de les protéger contre la dégradation mais doit pouvoir aussi les transporter et les libérer sur des cibles particulières afin d'optimiser leur biodisponibilité et leur efficacité. La matrice d'encapsulation doit donc fournir une barrière contre la diffusion et la fuite des composés bioactifs vectorisés et doit empêcher l'accès des enzymes digestives à ces composés. La sensibilité des caséines au clivage protéolytique, due à la richesse de la structure en proline, et la solubilité des ponts phosphocalciques en conditions acides dotent les micelles de caséines d'un mécanisme de relargage activable dans le système digestif ²⁵¹. Des études ont démontré que des complexes de curcumine et phosphocaséines peuvent montrer une résistance à la digestion au niveau de l'estomac permettant la libération de la curcumine principalement dans les intestins ⁴⁵⁷.

4.4.5. Propriétés d'interaction avec des polymères

Il a été démontré qu'il était possible de créer des systèmes d'encapsulation par la formation de complexes entre les caséines et d'autre polymères chargés *via* des interactions électrostatiques. A des pH inférieurs à leurs pH isoélectriques les caséinates portent des charges positives et peuvent interagir avec des polysaccharides chargés négativement. Les nanoparticules qui résultent de cette interaction

peuvent servir pour vectoriser des composés bioactifs et contrôler leur relargage ¹⁸². En effet, les produits de la réaction de Maillard impliquant des caséines ont été exploités pour former des systèmes d'encapsulation. Un copolymère de caséines et de dextrane a été obtenu par la réaction de Maillard et a servi à l'encapsulation du beta carotène. Les molécules de beta carotène ont interagi avec les fragments hydrophobes des caséines pour former le cœur de la particule. La couche supérieure hydrophile, formée par les molécules de dextrane, permet de stabiliser la particule et la rend dispersible dans l'eau. Le relargage du beta carotène peut se faire par hydrolyse enzymatique par la pepsine ou la trypsine ²⁷¹. Une huile de poisson a également été encapsulée par des produits de la réaction de Maillard. L'huile a été émulsionnée dans une solution aqueuse contenant des caséinates de sodium et des glucides avec un traitement thermique pour déclencher la réaction de Maillard. L'émulsion a été ensuite atomisée pour obtenir une émulsion sèche d'huile encapsulée. Ce procédé a permis la protection de l'huile de poisson résistante à l'oxydation ⁴⁶³.

4.4.6. Propriétés technofonctionnelles : la gélification

Les caséines possèdent d'excellentes aptitudes à la gélification. La gélification peut être réalisée principalement par acidification ou par voie enzymatique. La gélification par acidification est basée sur la précipitation des caséines au pH isoélectrique et la gélification par voie enzymatique se fait par le clivage du fragment Caséino-Macro-Peptide noté CMP de la caséine κ qui provoque l'agrégation des caséines. La gélification des caséines par voie enzymatique a déjà été mise à profit pour encapsuler des bactéries probiotiques ⁴⁶⁴. La gélification peut être obtenue par diverses autres méthodes. Des gels caséiques ont été préparés à partir de micelles de caséines réticulées par des transglutaminases. La gélification par la transglutaminase d'une suspension de caséines contenant des bactéries probiotiques a donné des nanocapsules qui ont permis la protection de ces cellules contre les conditions acides de l'appareil digestif ⁴⁶⁵. Ces méthodes de gélification sans chaleur sont adaptées pour vectoriser les composés thermolabiles. L'étude de l'interaction entre la norbixine, caroténoïde utilisé comme colorant dans certains fromages, avec des caséinates de sodium et les fractions

Synthèse bibliographique

caséiques α , β et κ a démontré qu'il y a formation de complexes induisant des changements dans la conformation des protéines ⁴⁶⁶.

La figure 57 permet de résumer les diverses propriétés qui font de la micelle de caséine une matrice d'encapsulation efficace.

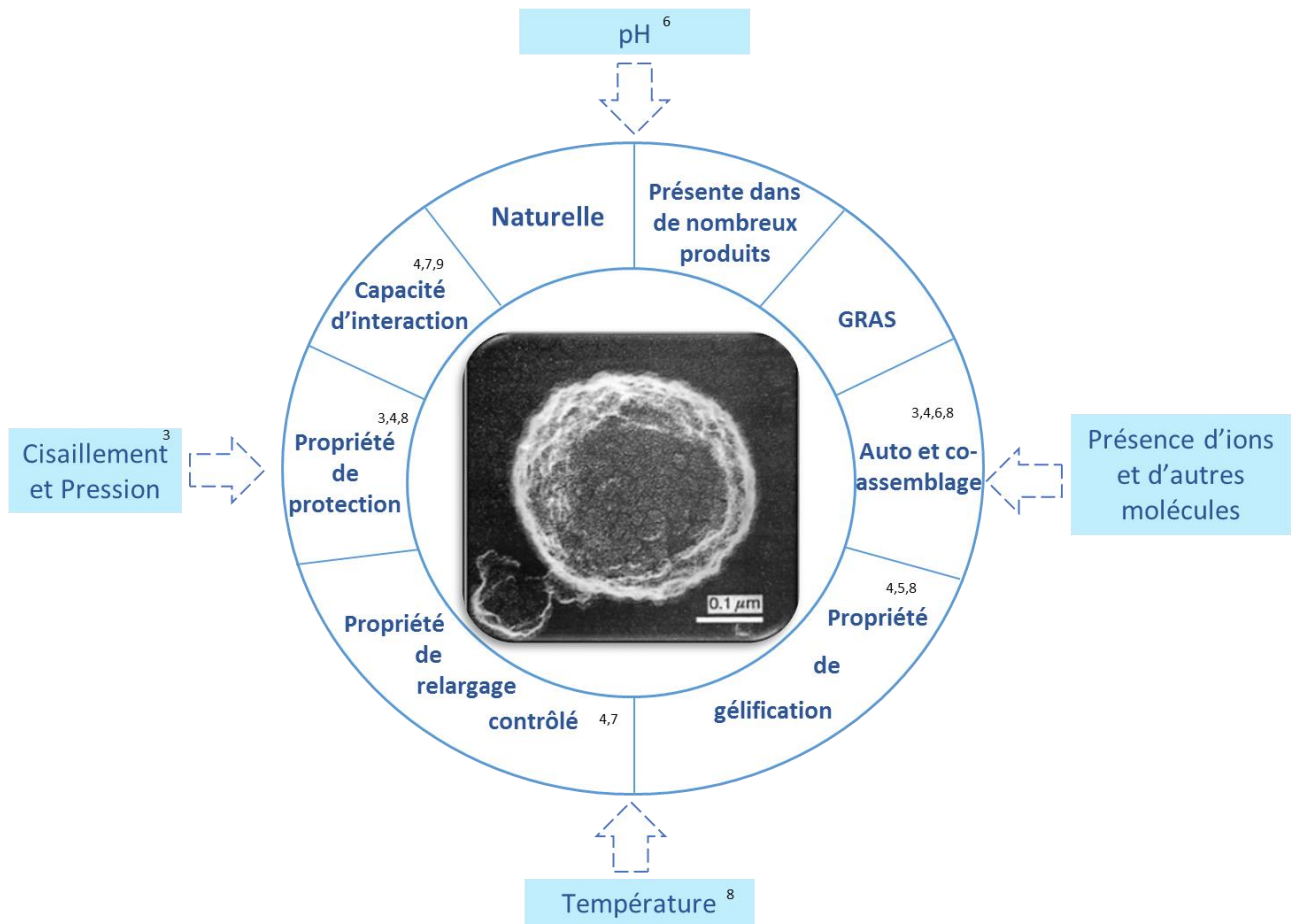


Figure 57. Propriétés de structure et de fonctions des micelles de caséines lui conférant les bases essentielles pour constituer une matrice d'encapsulation de bioactifs sensibles efficace ^{251,265,457,467-470}.

5. Contexte de l'étude

La curcumine est un composé polyphénolique extrait des rhizomes de la plante de curcuma *Curcuma longa*. Elle possède une faible toxicité intrinsèque et de multiples effets bénéfiques sur la santé ¹³. Beaucoup de ses effets thérapeutiques ont été confirmés par des études scientifiques, parmi lesquelles ont été observés notamment des effets antioxydants, anti-inflammatoires et anticarcinogènes ¹². Cependant, à cause de sa faible solubilité en milieu aqueux et de sa faible biodisponibilité, ses applications thérapeutiques sont restées limitées ⁵². L'encapsulation offre une solution efficace pour remédier à ces limitations.

En milieu aqueux, les matrices d'encapsulation naturelles de nature protéique telle que les micelles de caséines sont des candidates intéressantes pour une étude fondamentale et potentiellement appliquée dans le domaine des produits laitiers. Les micelles de caséines sont des particules colloïdales remarquablement stables à des températures et pressions élevées ⁴⁷¹. Elles possèdent des propriétés physicochimiques variées les rendant aptes à stabiliser et transporter des molécules bioactives en milieu aqueux ⁴⁷². Plusieurs études ont récemment démontré la capacité des micelles de caséines natives ou issues d'auto-assemblages de monomères caséiques d'interagir avec des molécules telles que la curcumine ^{260,451,457,470,473}.

La curcumine, bioactif hydrophobe, possède un log P (eau/octanol) de 3,29 ⁴⁷⁴. Cela permet de prédéfinir la distribution de la curcumine entre les deux phases aqueuse et dispersée (micelles de caséines ou bactéries lactiques) en introduisant aussi grâce à l'équation 5 l'effet du pH:

$$\log D = \log P - \log(1 + 10^{pKa-pH}) \text{ (équation 5)}$$

Grâce à cette équation, la variation du log D qui reflète le partage de la curcumine selon le pH du milieu dépend de log P et également des trois valeurs de pKa de la curcumine 7,5, 8 et 8,5 (valeur moyenne de 8) ⁴⁷⁵. Le tableau 3, indiquant les différentes valeurs de log D en fonction du pH, montrent bien que quelque soit le pH du milieu le log D est toujours inférieur au log P et donc la curcumine reste

Synthèse bibliographique

hydrophobe et aura tendance à aller dans les micelles de caséines ou interagir avec les bactéries lactiques en s'adsorbant sur leur paroi.

Tableau10. Variation du log D reflétant le partage de la curcumine en fonction du pH

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
log D	-5,16	-4,49	-3,70	-2,73	-1,48	0,28	2,99	3,29	2,99	0,28	-1,48	-2,73

Pour ce, l'étude des interactions entre curcumine et micelle de caséine et entre curcumine et bactéries lactiques s'avèrent être primordiale pour essayer de mieux comprendre les phénomènes régissant l'ajout de la curcumine dans un milieu de type yaourt.

Le premier objectif de cette thèse est de mettre en évidence les interactions entre les micelles de caséine et une molécule hydrophobe modèle ; la curcumine. L'étude de ces interactions dans différentes conditions physicochimiques permettra d'évaluer le potentiel des micelles de caséines en tant que transporteur de composés hydrophobes en milieux aqueux. Cette première partie portera également sur l'influence de la présence du polyphénol sur la structure de la micelle et sur ses propriétés de gélification acide. Ainsi, les questions scientifiques soulevées dans cette première partie peuvent être :

- La curcumine interagit-elle avec les micelles de caséines et si oui, par quels types d'interactions ?
- La curcumine modifie-t-elle la structure (interne et globale) des micelles de caséines ?
- Les micelles de caséines conservent-elles leurs propriétés de gélification en présence de curcumine ou sont-elles modifiées ?

Sachant qu'il est intéressant d'incorporer la curcumine dans des produits alimentaires courants, peu coûteux et beaucoup consommés en France tels que les produits laitiers de type yaourt, il est également nécessaire de prendre en considération les différentes composantes biotiques et abiotiques

du milieu afin d'obtenir une incorporation efficace pour le consommateur. Une fois la curcumine encapsulée dans les micelles de caséines, son incorporation dans un produit type yaourt doit faire face à la présence de bactéries lactiques qui sont *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. L'étude de l'interaction entre la curcumine et ces bactéries constitue le deuxième objectif de la thèse afin de répondre aux questions suivantes :

- Existe-t-il une interaction entre la curcumine et les bactéries lactiques ?
- Cette interaction risque-t-elle d'entraîner une migration de la curcumine des micelles de caséines vers les bactéries lors de la formation d'un yaourt ?

Une fois la curcumine ajoutée au lait, elle risque de subir des altérations suite aux nombreux traitements de préparation, aux procédés de transformation et aux diverses contraintes que peut imposer le stockage ⁴⁷³. Par ailleurs, les protéines laitières sont souvent utilisées en industrie sous forme de poudre dans diverses formulations. Il semble ainsi nécessaire de tester si les micelles de caséines peuvent permettre de protéger la curcumine d'un tel procédé. Le troisième objectif de cette thèse sera alors la production d'une poudre de caséine dopée en curcumine et de vérifier que son activité antioxydante est préservée. La conservation des propriétés fonctionnelles des micelles de caséines dopées et atomisées sera également étudiée, notamment les propriétés de gélification. Cette étude nous permettra de mettre en place une poudre active contenant un bioactif bien protégé et pouvant être ajoutée aux autres constituants du lait pour produire des produits laitiers à valeur ajoutée de type yaourt. Les questions associées à cette troisième partie sont donc :

- La micelle de caséine est-elle capable de protéger la curcumine contre l'oxydation lors d'une étape de transformation telle que l'atomisation ?
- Est-ce-que la présence de curcumine au sein de la micelle lors de l'atomisation modifie ces propriétés fonctionnelles, notamment de gélification ?
- Est-il possible d'obtenir un ingrédient fonctionnel sous forme de poudre enfermant un antioxydant facilement utilisable dans un procédé de formulation alimentaire.

Matériels et Méthodes

Chapitre II : Matériels et Méthodes

1. Matériels

1.1. Les poudres laitières

La poudre de caséine Promilk 872 B a été fournie par la société Ingredia (Arras, France). Elle a été obtenue par microfiltration de lait écrémé et atomisation et contenait une fraction majeure de caséines sous forme micellaire (protéines sur base sèche 87 %, matière grasse 1,5 %, minéraux 6 %).

La poudre a été conservée à l'abri de l'humidité et à une température de 8 °C.

Le lait écrémé est préparé à 10 % de matière sèche et pasteurisé 15 min à 80 °C.

1.2. Solutions et Réactifs

La curcumine (pureté > 94 % ou pureté > 66 %) a été fournie par Sigma-Aldrich et a été stockée à une température de - 20 °C.

Pour le dosage de Folin-Lowry, les réactifs utilisés étaient NaCO_3 , NaOH , CuSO_4 , Na K tartrate, le réactif de Folin – Ciocalteu et l'albumine de sérum bovin (BSA) fournis par Sigma-Aldrich.

La glucono-delta-lactone (GDL), l'éthanol (96 %), l'azide de sodium, les sels constituant le tampon phosphate (PBS) tels que NaCl , KCl , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , les solvants utilisés pour les manipulations d'adhésion bactérienne (MATS) tels que le diéther, l'hexane, l'éthyl acétate, le chloroforme, le décane et l'hexa-décane, les réactifs de l'ABTS et le FRAP ont été fournis par Sigma-Aldrich.

De l'eau ultrapure a été utilisée pour la préparation du tampon phosphate.

1.3. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ou LAB utilisées étaient *Lactobacillus delbruekii bulgaricus* (DSM 20081) noté (Lb) et *Streptococcus thermophilus* (CNRZ 368) noté (St). Les ferments lactiques sous forme de poudre Yomix- Yogurt ont été fournis par Danisco (France). Le milieu de culture utilisé était le bouillon MRS. Le lavage des culots bactériens s'est fait par de l'eau physiologique (NaCl 9 g/L).

2. Préparation des solutions

2.1. Préparation du tampon phosphate

Le tampon phosphate salin (PBS) a été préparé en utilisant de l'eau ultra pure avec 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ et 0,24 g KH₂PO₄ pour un litre de solution. Le pH est ajusté ensuite à 7,4.

Le tampon PBS est additionné de 0,02% (p/v) en azide de sodium pour éviter tout développement bactérien puis filtré (filtre Millipore de 0,45 µm de porosité) et conservé à 7°C.

2.2. Préparation des suspensions de caséines micellaires

La poudre de micelles de caséines a été réhydratée à des concentrations fixées à chaque manipulation dans du PBS sous agitation (400 rpm) pendant 24 h à 7 °C avant utilisation. La concentration en caséines micellaires dans la solution a été déterminée par la méthode de dosage de Folin-Lowry en utilisant la sérum albumine bovine (SAB) comme protéine de référence ⁴⁵¹. Les concentrations molaires en caséines micellaires ont été exprimées en équivalent BSA : chaque 1 g.L⁻¹ de caséines micellaires équivaut à 16,7 µM de BSA.

2.3. Préparation des solutions de curcumine

La curcumine a été solubilisée dans l'éthanol (96 %). La solution mère est préparée à 2 mg.mL⁻¹ et stockée à 4 °C et à l'abri de la lumière. Les solutions filles allant de 10 à 80 nmol.mL⁻¹ sont préparées dans l'éthanol (96%) avant chaque manipulation. La conservation est également réalisée à 4°C.

2.4. Conditions de culture bactérienne

Les deux bactéries lactiques étudiées *Lactobacillus delbruekii bulgaricus* (DSM 20081) et *Streptococcus thermophilus* (CNRZ 368) ont été conservées dans du bouillon de MRS avec 20 % (v/v) de glycérol à -20 °C. Pour activer les bactéries, elles ont été propagées dans du bouillon de MRS deux fois 48 h à 37 °C et 42 °C pour respectivement, Lb et St.

Après culture et activation, les culots bactériens ont été récupérés après centrifugation 15 min à 4500 g à 20 °C. Les culots ont été lavés trois fois avec de l'eau physiologique puis remis en suspension dans le PBS.

3. Méthodes

3.1. MATS (Microbial Adhesion To Solvents)

3.1.1. Principe

Le caractère hydrophobe/hydrophile, acide/base au sens de Lewis des bactéries peut être déterminé à l'aide de la méthode *Microbial Adhesion To Solvents* « MATS », méthode mise au point par Bellon-Fontaine *et al.*, (1996) ⁴⁷⁶. Cette méthode repose sur l'affinité des micro-organismes pour différents solvants de propriétés physico-chimiques connues (Tableau 11) : un solvant monopolaire acide : le chloroforme, un solvant monopolaire basique : l'acétate d'éthyle, et trois solvants apolaires : le décane, l'hexane et l'hexadécane.

Tableau 11. Caractéristiques énergétiques ou tensions interfaciales (mJ/m^2) des solvants utilisés pour la méthode MATS selon Bellon-Fontaine *et al.* (1996) ⁴⁷⁶.

γ_L^{LW} γ_L^+ γ_L^- correspondent respectivement aux tensions interfaciales des composants de la surface bactérienne responsables des interactions Lifshitz van der Waals, accepteur d'électrons et donneur d'électrons.

	γ_L^{LW}	γ_L^+	γ_L^-
Chloroforme	27,2	3,8	0
Hexadécane	27,7	0	0
Décane	23,9	0	0
Acétate d'éthyle	23,9	0	19,4
Hexane	18,4	0	0

Ainsi, la différence d'affinité d'une souche bactérienne au chloroforme (solvant monopolaire acide) et l'hexadécane (solvant apolaire) nous renseigne sur son caractère électron-donneur (γ_L^-) car les composantes de Van der Waals (γ_L^{LW}) des deux solvants sont identiques à 27 environ. De même, la différence d'affinité entre l'acétate d'éthyle (solvant monopolaire basique) et le décane (solvant apolaire) nous renseigne sur le caractère électron-accepteur de cette même souche bactérienne, les composantes de Van der Waals des deux solvants étant identiques à 23,9. L'estimation des

Matériels et Méthodes

caractéristiques électron-donneur et électron-accepteur ainsi que l'affinité pour les solvants apolaires nous permet de déduire le caractère hydrophile/hydrophobe de la souche.

3.1.2. Protocole

A 1,2 mL de suspension bactérienne dans le PBS de densité optique à 600 nm égale à 0,50 ont été ajoutés 200 µL de solvant. L'ensemble est agité sous vortex pendant 90 secondes de façon à obtenir une émulsion. Les deux phases sont séparées par une décantation de 15 min. La phase aqueuse est alors prélevée et une mesure de la densité optique à 600 nm résiduelle est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre. Le pourcentage d'adhésion au solvant est alors donné par la relation suivante :

$$D_i = \frac{D_i - D_f}{D_i} \times 100 \text{ (équation 6)}$$

D_i représente la densité optique initiale et D_f représente la densité optique de la phase aqueuse après décantation.

3.2. L'atomisation ou spray-drying

3.2.1. Principe

L'atomisation (aussi appelée spray drying ou séchage par pulvérisation) est une technique de séchage très courante. Elle consiste à pulvériser en gouttelettes le produit sous forme liquide, dans un courant d'air chaud. Lorsque le produit humide est placé dans un flux d'air (ou un autre gaz) suffisamment chaud et sec, un gradient de température et de pression partielle en vapeur se produit spontanément entre les gouttelettes et l'air⁴⁷⁷. Ce phénomène cause:

- Un transfert de chaleur de l'air pour le produit en raison de la différence de température.
- Un transfert inverse d'eau dû à la différence de pressions partielles de vapeur entre l'air et la surface du produit.

L'air sert donc à la fois de fluide de transfert de chaleur et de gaz porteur pour l'élimination de la vapeur d'eau. L'air entrant dans la tour est chaud et sec et devient plus froid et humide quand il la quitte. La température de surface du produit c'est à dire la température au niveau de la particule est équivalente

à la température de l'air humide soit environ 45 °C obtenu pour une température en air sec entrant de 200 °C.

Le séchage est une méthode d'évaporation de l'eau de surface, cela entraîne une remontée capillaire de l'eau de l'intérieur de la gouttelette vers la surface. Tant que l'humidité moyenne est suffisante pour maintenir la surface assez humide, la vitesse d'évaporation reste constante.

Ensuite, une diminution de la vitesse est observée alors que la température de surface augmente ⁴⁷⁷.

La vitesse de séchage dépend de trois facteurs:

- a) De la surface d'évaporation, qui augmente au fur et à mesure que le diamètre des gouttelettes diminue; la déshydratation s'accélère en même temps que l'interface augmente en taille. Cette interface obtenue par pulvérisation du liquide et de l'air chaud minimise les altérations du produit par la chaleur ^{478,479}.
- b) De la différence de pressions partielles de vapeur d'eau entre la surface de la particule et l'air, qui dépend de l'humidité absolue et de la température d'entrée de l'air.
- c) De la vitesse de migration de l'eau de l'intérieur vers la surface de la particule, laquelle peut être réduite par la formation d'une croûte à la surface formée en raison de la transformation des composants par la chaleur.

Le séchage par atomisation consiste principalement en cinq étapes ⁴⁷⁹:

- a) La concentration: les matières premières sont concentrées avant l'introduction dans le pulvérisateur.
- b) L'atomisation: l'étape d'atomisation crée les conditions optimales pour l'évaporation de l'eau dans le produit ayant des caractéristiques souhaitées à la fin du processus.

Matériels et Méthodes

c) Le contact gouttelettes-air : dans la chambre, le liquide atomisé est mis en contact avec un gaz chaud entraînant l'évaporation de 95 % de l'eau contenue dans les gouttelettes en quelques secondes.

d) Séchage des gouttelettes: l'évaporation de l'humidité se déroule en deux étapes. Au cours de la première étape, il y a suffisamment d'humidité dans les gouttelettes et il y a une diffusion d'eau continue du cœur de la gouttelette vers la surface pour remplacer le liquide évaporé à la surface. L'évaporation a lieu à une vitesse relativement constante. La deuxième étape commence lorsque l'humidité n'est plus suffisante pour maintenir des conditions de saturation à la surface des gouttelettes, ce qui entraîne la formation d'une croûte sèche en surface. L'évaporation dépend alors de la diffusion de l'eau à travers la croûte, qui devient de plus en plus épaisse pour former des particules.

e) Séparation: des cyclones, des filtres à manches et des conteneurs à précipitation électrostatiques peuvent être utilisés pour l'étape de séparation finale des particules. Des épurateurs humides sont souvent utilisés pour purifier et rafraîchir l'air de sorte qu'il puisse être libéré dans l'atmosphère.

3.2.2. Protocole expérimental

Le PPCN (150 g.L^{-1}) été réhydraté dans du tampon phosphate PBS (pH 7,4) pendant 24 h à 7°C et ce pour une réhydratation protéique maximale et une bonne stabilisation du système. Le concentré a été préparé en mélangeant 8 L d'une dispersion de PPCN réhydraté (15,5 % matière sèche) avec 290 mL d'une solution de curcumine (solution préparée dans l'éthanol à 1 mg.mL^{-1}) pendant 1 h avant atomisation. Ces volumes permettent d'avoir un rapport caséine : curcumine de 10 :1. Le témoin sans curcumine a été préparé dans les mêmes conditions (1 % d'éthanol dans la suspension de PPCN). L'atomisation a été réalisée sur une tour d'atomisation MicraSpray 150 (Anhydro, Soeborg, Danemark). Une pompe péristaltique a été utilisée pour conduire le concentré à travers la buse bi-fluide jusqu'à la chambre d'atomisation avec un débit de $46,5 \text{ mL.min}^{-1}$. La puissance de chauffe du

système était de 30 % et ce pour obtenir des particules monodisperses. La température d'entrée de l'air sec était de 180 °C. Les particules sous forme de poudre sont par la suite récupérées dans les cyclones à une température de sortie de 90 °C.

3.3. Caractérisation des poudres produites par atomisation

3.3.1. Dosage de l'eau

La teneur en eau a été déterminée par pesée et étuvage à 103 °C suivant la norme AFNOR (1978) ⁴⁸⁰. Deux grammes de poudre ont été étuvés pendant 3 h, puis refroidis pendant 1 h au dessiccateur (P₂O₅) avant d'être pesés. La teneur en eau correspond à la masse d'eau d'un échantillon ramenée à la masse sèche. Elle s'exprime en pourcent et il s'agit d'une teneur en eau pondérale.

3.3.2. La solubilité

La mesure de la solubilité permet de déterminer l'aptitude d'une poudre à se solubiliser. C'est un critère essentiel dans le contrôle de la qualité des poudres destinées à être incorporées en phase aqueuse. L'indice de solubilité a été mesuré selon la norme ADPI (2002b) ⁴⁸¹ ou la méthode de Niro Atomizer (1978) ⁴⁸². 2,5 g de poudre ont été ajoutés à 17,5 mL d'eau distillée et mis sous agitation magnétique pendant 30 s. Le mélange a été centrifugé 700 g pendant 10 min à 20 °C puis le surnageant a été éliminé puis 20 mL d'eau ont été ajoutés pour récupérer le restant de la poudre et resuspendre le culot. Le culot a été de nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Le surnageant a été de nouveau éliminé puis le tube contenant le culot, préalablement taré, a été incubé incliné pendant 24 h à 130 °C. Enfin, le tube contenant le culot sec a été pesé. La solubilité a été calculée par :

$$\text{Solubilité (\%)} = \frac{(\text{masse du tube avec le culot} - \text{masse du tube vide}) \times 100}{\text{masse de la poudre initiale}} \quad (\text{équation 7})$$

3.3.3. La mouillabilité

La mouillabilité reflète l'aptitude d'une poudre à s'immerger après avoir été déposée à la surface de l'eau. Elle est mesurée selon la norme FIL (1985) ⁴⁸³ ou la méthode de Niro Atomizer (1978) ⁴⁸². C'est le temps en secondes nécessaire pour mouiller toutes les particules d'une poudre, celle-ci étant déposée à la surface de l'eau. Ainsi, 1g de poudre a été déposé à la surface de 9,65 g d'eau distillée

Matériels et Méthodes

dans un bécher de 25 mL. A t_0 le chronomètre a été déclenché pour déterminer le temps nécessaire pour mouiller toute les particules de la poudre. Un temps supérieur à deux minutes permet de qualifier la poudre de non mouillable.

3.3.4. La dispersibilité

La dispersibilité d'une poudre dans l'eau représente son aptitude à se briser en particules pouvant passer à travers un tamis d'une porosité de 150 μm . C'est le pourcentage pondéral de la matière sèche de l'échantillon susceptible d'être dispersée dans l'eau en suivant les normes FIL (1985)⁴⁸³, ADPI (2002a)⁴⁸⁴ ou la méthode de Niro Atomizer (1978)⁴⁸². 1 g de poudre a été ajouté dans un bécher de 25 mL contenant 10 g d'eau distillée. Le mélange a été agité à la spatule (25 tours à droites et 25 tours à gauche) pendant 15 s. Ensuite, le contenu a été versé sur un tamis (maille de 150 μm). Le liquide a été récupéré par tamisage puis séché à 103 °C pendant 24 h. Après séchage, le résidu a été pesé.

3.3.5. Evaluation de la couleur des poudres

3.3.5.1. Principe

La mesure de couleur a été effectuée par mesure de la réflectance avec un spectrocolorimètre Microflash 200D (Datacolor International, Montreuil). Avant chaque série d'analyse, l'appareil a été calibré à l'aide de deux standards, l'un blanc et l'autre noir.

3.3.5.2. Protocole

Pour mesurer la couleur des échantillons, 100 mg de poudre ont été placés dans une boîte de Pétri. Les mesures de L^* , de a^* , et de b^* ont été effectuées directement en plaçant le disque de l'appareil DataColor sur la boîte. Trois mesures ont été réalisées et moyennées par échantillon (1 flash par mesure).

Les résultats ont été rapportés dans un espace colorimétrique de représentation des couleurs de surface appelé CIEL*a*b*. Dans ce modèle, adopté par la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE), il existe trois paramètres qui caractérisent les couleurs : L^* , a^* et b^* ⁴⁸⁵.

La composante L^* mesure la variation de la luminance. La valeur de L^* varie de 0 % (noir) à 100 % (blanc).

Les composantes a^* et b^* mesurent deux gammes de couleur allant respectivement du vert au rouge et du bleu au jaune, en passant par le gris.

Un autre paramètre qui joue un rôle dans la détermination de la couleur est la saturation, appelée encore chroma C^* . Selon le chroma, la valeur varie de 0 % (insaturé par exemple gris neutre, blanc, noir) à 100 % de saturation. Il représente le degré de pureté et d'intensité de la couleur.

3.3.6. Etude de la morphologie des poudres par ESEM (ou MEB)

3.3.6.1. Principe

L'image MEB est une image reconstituée: une sonde, le faisceau d'électrons, balaye la surface de l'échantillon, un détecteur récupère de manière synchrone un signal induit par cette sonde pour en former une image, cartographie de l'intensité de ce signal.

Le MEB est constitué d'une source d'électrons qu'un jeu de lentilles "condenseur" focalise sur un diaphragme. Une deuxième lentille "objectif" refocalise ce faisceau sur l'échantillon en un spot très fin (<15 à 200 Å). Un jeu de bobines de déflection permet de déplacer le faisceau et donc de balayer l'échantillon. Ceci forme la sonde.

Sous l'impact du faisceau d'électrons, il y a essentiellement :

- rétrodiffusion d'électrons du faisceau incident avec plus ou moins de perte d'énergie;
- émission d'électrons secondaires de faible énergie, provenant des couches externes des atomes de l'échantillon ;
- émission de rayons X, concurrentiellement avec les électrons Auger;
- émission de photons UV-visible,
- écoulement d'un courant vers la masse.

Tous ces signaux peuvent servir à former une image.

Le détecteur de base du MEB (E.T.: Everhart-Thornley) récupère un mélange en proportion variable d'électrons secondaires et d'électrons rétrodiffusés, proportion dépendant de l'énergie primaire, de la distance échantillon-objectif, de l'angle d'incidence du faisceau primaire, du matériau observé.

Matériels et Méthodes

D'autres détecteurs permettent de discriminer les électrons secondaires des électrons rétrodiffusés.

La microscopie à balayage environnemental (ESEM) est une technique de microscopie électronique permettant l'observation directe d'échantillons humides à leur état naturel et la possibilité d'effectuer des expériences dynamiques. En outre, cette technique ne nécessite pas de revêtement qui est nécessaire pour une analyse SEM standard. La principale limitation d'ESEM est sa faible résolution par rapport à SEM et TEM.

3.3.6.2. Protocole

La morphologie des particules de poudre a été caractérisée avec un microscope électronique à balayage environnemental (ESEM, Quanta 650 FEG, FEI, USA). L'utilisation de l'ESEM est particulièrement intéressante, car aucun revêtement n'est nécessaire. Les analyses ont été effectuées dans les conditions suivantes: énergie de faisceau de 7 KeV, détecteur LSD et pression de la chambre de 130 Pa. Les poudres ont été déposées doucement sur un ruban adhésif et l'excès de poudre a été éliminé par écoulement d'air avant l'analyse.

3.3.7. Evaluation des propriétés hygroscopiques

La Sorption Dynamique de Vapeur (en anglais DVS pour *Dynamic Vapor Sorption*) est une technique gravimétrique pour la mesure des isothermes de sorption d'eau des poudres. La compréhension des effets de la teneur en eau sur la structure des échantillons et leurs propriétés, est essentielle pour le stockage et l'utilisation des matériaux, tels que les produits agro-alimentaires et pharmaceutiques.

3.3.7.1. Principe

Les mesures sont généralement effectuées à une pression constante de 1 bar afin de minimiser les variations du poids associées à la force d'Archimède et la force de traînée. L'utilisation d'une température fixée à 25 °C permet d'obtenir la courbe isotherme de sorption par l'équilibration de l'échantillon dans des ambiances de pression partielle en vapeur d'eau variant de 0 à 100 % (soit des a_w de 0 à 1).

3.3.7.2. Protocole

L'appareil DVS (Surface Measurement Systems, Londres, Royaume-Uni), équipé d'une microbalance Cahn, mesure les variations de la masse de l'échantillon avec le temps, à 25 °C, aux différentes valeurs d'activité de l'eau (a_w) (entre 0 et 0,9). 70 à 80 mg de l'échantillon ont été chargés sur le plateau en quartz. L' a_w a été initialement fixée à 0 pendant 6 h (phase de séchage). L'échantillon a été ensuite soumis à des étapes successives d'augmentation d' a_w , de 0,1 à 0,9. Pour chaque étape, les changements de masse (m) et le taux de changements de masse (dm / dt) ont été déterminés. L'équilibre a été considéré comme atteint lorsque les changements de la masse au cours du temps (dm / dt) étaient inférieurs à 0,001. Toutes les expériences ont été effectuées à 25 °C en triple pour chaque échantillon. La précision de ce système était de $\pm 1,0$ % HR (Humidité relative) et $\pm 0,2$ °C.

3.3.8. Extraction de la curcumine encapsulée dans les poudres de caséines micellaires

Afin de déterminer le pouvoir antioxydant de la curcumine encapsulée dans les caséines micellaires, une extraction est essentielle. La poudre de caséines micellaires dopée de curcumine a été réhydratée dans du PBS (50 g.L^{-1} , pH = 7.4) pendant 24 h à 7 °C. 10 mL d'éther diéthylique ont été ajoutés à 5 mL de caséines micellaires-curcumine réhydratée. Le mélange a été vigoureusement agité pendant 10 min. Le mélange a été ensuite centrifugé à 1050 g pendant 5 min à 20 °C pour séparer les phases organique et aqueuse. Le surnageant contenant l'éther a été récupéré et placé sous azote pour une évaporation totale et une oxydation minimale. 1 mL d'éthanol à 96 % a été ajouté pour solubiliser la curcumine extraite. La concentration de celle-ci a été déterminée en mesurant son absorbance à 750 nm en utilisant un spectrophotomètre (Shimadzu UV1280, Japan) et la gamme étalon correspondante.

3.3.9. Dosages

3.3.8.1. Dosage des protéines par la méthode de Folin Lowry

Dans la méthode de Lowry, les protéines en milieu alcalin forment avec les ions Cu^{2+} un complexe hexacoordonné dont la couleur varie du rose violet au bleu violet suivant la quantité de protéines

Matériels et Méthodes

présente dans le milieu. L'absorbance du complexe, mesurée à la longueur d'onde d'absorption maximale de 750 nm, est proportionnelle à la quantité de protéines présente. Le dosage est réalisé grâce à une gamme étalon et de quantités connues de protéine standard, l'albumine de sérum bovin (BSA).

- Protocole expérimental

Les réactifs utilisés sont étaient :

- Réactif A : 2 % NaCO_3 mélangé avec 0,4 % NaOH
- Réactif B : 1 % CuSO_4 mélangé avec un volume égal de 1 % Na K tartrate.
- Réactif 1 : 1 volume du réactif B est mélangé avec 100 volumes de réactif A.
- Réactif 2 : 50 % réactif de Folin - Ciocalteu contenant l'acide phosphotungestique $\text{H}_3\text{PM}_{12}\text{O}_{40}$ et l'acide phosphomolybdique $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$

100 μl d'échantillon, d'eau distillée (blanc) ou de BSA (Bovine Sérum Albumin (g/L dans l'eau) ont été introduits dans un tube à essai avec 1 ml du réactif 1. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10 min, ensuite 100 μl du réactif 2 ont été ajoutés. Le mélange a alors été incubé à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 750 nm contre le blanc. L'albumine a été utilisée comme étalon

Dosage de la curcumine

Pour les gammes étalons permettant de déterminer la concentration en curcumine de solutions éthanoliques, les absorbances relatives de solutions de curcumine de concentrations allant de 10 à 80 $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans l'éthanol ont été déterminées par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 420 nm (Shimadzu UV1280, Japan).

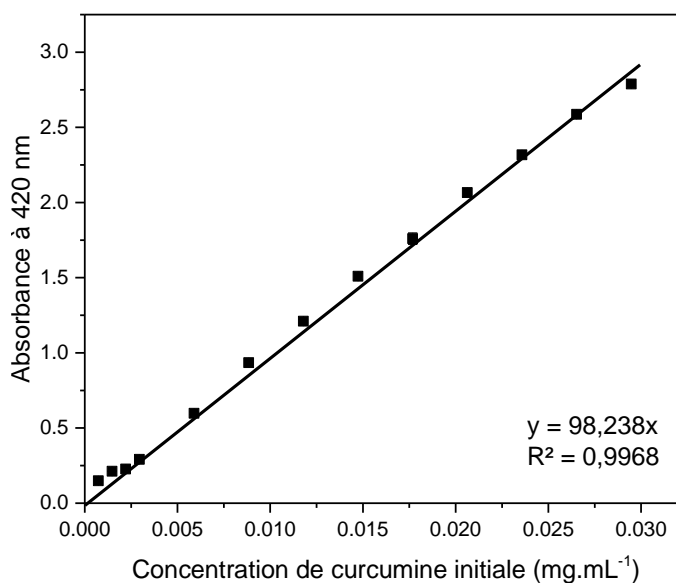


Figure 58. Gamme d'étalonnage de la curcumine obtenue à 420 nm dans l'éthanol (n=3)

3.3.8.2. Dosage des activités antioxydante et antiradicalaire

Les pouvoirs antiradicalaire et antioxydant ne peuvent être mesurés qu'indirectement à partir de leurs effets. La plupart des méthodes de mesure de l'activité antiradicalaire sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux libres très variés. Ce sont principalement des méthodes dites « d'inhibition » dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de réagir avec ces espèces.

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de déterminer le profil antioxydant et/ou antiradicalaire d'un échantillon. C'est pourquoi, en effectuant différents tests de mesure, il est possible de dresser un profil plus global des propriétés antioxydantes et antiradicalaires des échantillons étudiés ⁴⁸⁶.

i) Piégeage des radicaux ABTS^{•+}

- **Principe**

La méthode ABTS (2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) est basée sur la désactivation du radical ABTS^{•+} par un agent antioxydant. L'activité antiradicalaire d'une molécule est

Matériels et Méthodes

déduite de sa capacité à inhiber les radicaux ABTS^{•+}. Ces derniers sont générés par l'oxydation incomplète de l'ABTS par le persulfate de potassium. Cette réaction s'accompagne de l'apparition d'une coloration bleue intense. Au contact d'un composé donneur d'hydrogène, les radicaux disparaissent au profit des ions ABTS⁺, conduisant à la décoloration de la solution ⁴⁸⁷. Cette décoloration est suivie par spectrophotométrie à 734 nm selon la méthode de Re *et al.*, (1999). Cette technique a été utilisée pour déterminer la capacité des poudres dopées en curcumine à inhiber les radicaux ABTS^{•+}.

- **Protocole ABTS^{•+}**

Le radical ABTS^{•+} a été généré en faisant réagir l'ABTS (7 mM) avec la solution de persulfate de potassium (2 mM) selon un rapport de volume 1:1. Le mélange a été placé à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 12 à 16 h avant son utilisation. Le radical généré ABTS^{•+} a été dilué avec de l'éthanol à 96 % afin d'obtenir une absorbance initiale de $0,70 \pm 0,02$ à 734 nm mesurée par spectrophotomètre (Shimadzu UV1280, Japan). 10 μ L de curcumine après extraction de cette dernière ont été mélangés à 1 mL de solution d'ABTS^{•+} puis l'absorbance du mélange a été mesurée à 734 nm après 5 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité. L'expérience a été faite en triplicata. Le pourcentage d'activité antioxydante a été calculé en associant à chaque absorbance la quantité en mg correspondante selon la gamme étalon en figure 59.

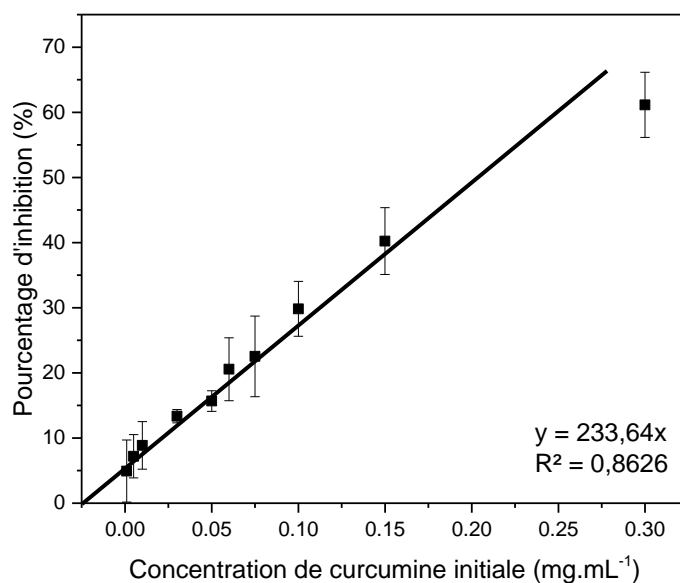


Figure 59. Gamme d'étalonnage de la curcumine dosée par ABTS à 734 nm. Cette gamme reflète le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante en fonction de la concentration de curcumine initiale.

ii) Test de réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxidant power)

• Principe

Cette technique a été utilisée pour déterminer la capacité des poudres dopées en curcumine à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet, le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle. Une augmentation de l'absorbance à 593 nm correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés ⁴⁸⁸.

• Protocole FRAP

Dans un premier temps, une solution tampon acide acétique / acétate de sodium (300 mM pH = 3,6) a été préparée. Les réactifs de 2,4,6-tri [2-pyridyl]-s-triazine (TPTZ) à 10mM, préparé dans de l'HCl à 40 mM et le réactif FeCl_3 à 20 mM dans l'eau ont été préparés extemporanément. Finalement, la solution de travail FRAP a été obtenue en mélangeant 2,5 mL de solution TPTZ à 2,5 mL de solution de

Matériels et Méthodes

FeCl₃ et 25 mL de solution tampon acide acétique / acétate de sodium. Cette solution doit être impérativement conservée dans un bain à 37 °C⁴⁸⁸.

L'absorbance du témoin (solution FRAP seule) a été mesurée à 593 nm⁴⁸⁸. Afin de mesurer les absorbances des échantillons, 30 µL de curcumine après extraction ont été ajoutés à 1 mL de réactif de FRAP. L'absorbance a été mesurée à 593 nm après 5 min d'incubation à l'obscurité. L'expérience a été faite en triplicata. Le pourcentage d'activité antioxydante a été calculé en associant à chaque absorbance la quantité correspondante en mg suivant la gamme étalon en figure 60.

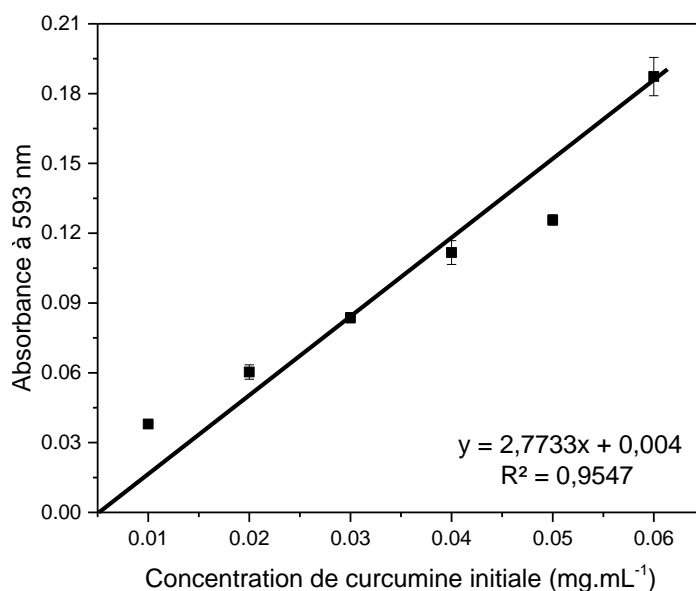


Figure 60. Gamme d'étalonnage de la curcumine dosée par FRAP à 593 nm (n=3).

3.4. La spectrofluorimétrie ou spectroscopie de fluorescence

3.4.1. Protocole de l'étude des interactions caséines micellaires-curcumine

Les spectres d'émission et d'excitation de la curcumine dans différents solvants sont présentés dans la figure 61.

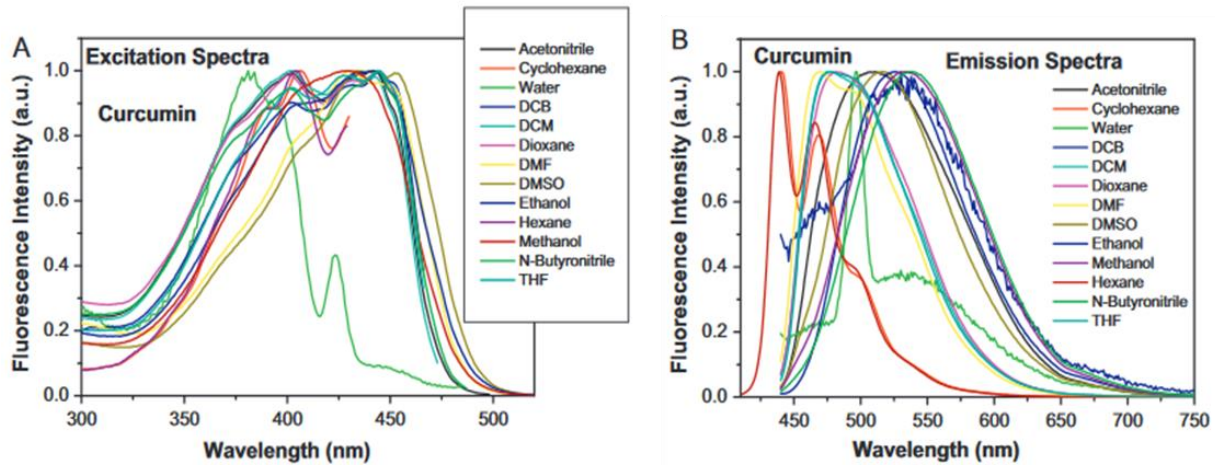


Figure 61. Spectres de fluorescence normalisés de la curcumine dans des solvants de polarité différente (A) Spectre d'excitation (B) Spectre d'émission ⁴⁸⁹

Les interactions caséines micellaires-curcumine ont été étudiées en utilisant un spectrofluorimètre FLX. Les mesures sont réalisées sur un spectrofluorimètre (Safas Monaco) thermostaté à 20 et 35 °C ($\pm 0,5$ °C). La cuve utilisée pour effectuer les mesures était une cuve de 3 mL en quartz à 5 faces polies remplie au 2/3 (2 mL). Le photomultiplicateur était réglé en automatique pour obtenir 50 % de fluorescence en unité arbitraire (UA). La fluorescence de la curcumine à une concentration de 5 μM a été mesurée en présence de différentes concentrations de caséines micellaires variant entre 0 et 55,8 μM . Les spectres d'émission ont été enregistrés de 450 à 700 nm (bande passante de 2,5 nm) pour une longueur d'excitation de 420 nm (bande passante de 5 nm). Une suspension de caséines micellaires sans curcumine constituait le témoin. Le quenching des caséines micellaires a été déterminé pour des échantillons à une concentration de 8,9 μM pour des concentrations en curcumine variant de 0 à 40 μM . Les spectres d'émission ont été enregistrés de 300 à 450 nm (bande passante de 5 nm) pour une longueur d'excitation de 280 nm (bande passante de 10 nm). Les solutions de curcumine sans caséines micellaires constituaient les témoins.

Les solutions de curcumine et les suspensions de caséines micellaires ont été vigoureusement mélangées par vortex pendant 30 s dans des tubes en verre de 5 mL puis transférées dans la cuve en

Matériels et Méthodes

quartz pour analyse. Les tubes en verre et pas en plastique sont utilisés pour éviter toute adsorption de la curcumine sur le plastique. Chaque expérience a été faite en triplicat.

3.4.2. Protocole de l'étude des interactions caséines micellaires-curcumine-bactéries

3.4.2.1. Quenching des CM

Le quenching des caséines micellaires en présence de bactéries lactiques a été étudié dans les conditions décrites précédemment. Les conditions sont optimisées suite à des expérimentations préliminaires à 8,9 μM en CM, 5 μM en curcumine et pour une densité optique en LAB suspendues dans le PBS égale à 0,2 ($\lambda = 600 \text{ nm}$). Les spectres d'émission ont été enregistrés de 300 à 450 nm (bande passante de 5 nm) pour une longueur d'onde d'excitation de 280 nm (bande passante de 5 nm). Les solutions de curcumine et les dispersions de bactéries sans caséines micellaires ont été utilisées comme témoins.

Pour déterminer l'influence de l'ajout de LAB sur le quenching des caséines micellaires par la curcumine, les solutions de curcumine et de CM réhydratées ont été vigoureusement mélangées par vortex pendant 2 min dans des tubes en verre de 5 mL puis les LAB ont été ajoutées. Le mélange a été de nouveau vigoureusement agité pendant 2 min puis transféré dans une cuve en quartz pour la mesure. La même expérience a été refaite mais en changeant l'ordre d'ajout des 3 partenaires de milieu soit : la curcumine a été ajoutée aux bactéries puis les caséines micellaires ont été ajoutées au mélange. Chaque expérience a été faite en triplicat et l'intensité de fluorescence a été normalisée à 100 % d'intensité avec la valeur obtenue avec le témoin CM à une longueur d'onde de 344 nm correspondant à l'émission du Tryptophane.

3.4.2.2. Emission de fluorescence de la curcumine

La fluorescence de la curcumine à 5 μM a été mesurée en présence de 8,9 μM de CM pour une densité optique bactérienne à 600 nm de 0,2. Les spectres d'émission ont été enregistrés de 450 à 700 nm (bande passante de 5 nm) pour une longueur d'excitation de 420 nm (bande passante de 3 nm). Les

caséines micellaires réhydratées et suspensions bactériennes sans curcumine constituaient les témoins.

3.5. La microscopie à épifluorescence

Protocole

Le système utilisé était un microscope à épifluorescence Leica DMRB (Allemagne) avec un filtre H3 Micfilter. La capture des images a été faite par une caméra monochrome CCD COHU.

Afin d'observer l'interaction de la curcumine avec les LAB, un mélange de *Streptococcus thermophilus* ou de *Lactobacillus bulgaricus* à une densité optique à 600 nm de 1 et de solution éthanolique de curcumine à 5 μM a été agité vigoureusement par vortex pendant 30 s. Un frottis a été réalisé avec une anse calibrée de 50 μL sur une lame en verre. Après séchage, l'échantillon a été observé à un grossissement de x 100 en immersion avec de l'huile.

Afin d'observer le transfert de la curcumine entre les LAB et les CM, un mélange de caséines micellaires à 8,9 μM et de curcumine à 5 μM a été agité pendant 1 min. Sur une lame en verre, un frottis de ce mélange a été réalisé. Une fois le frottis sec, un second adjacent au premier, contenant les bactéries lactiques, a été réalisé sur la même lame de façon à observer l'interface entre les deux à un grossissement x100 en immersion dans l'huile.

3.6. Les méthodes physicochimiques

3.6.1. Mesure de taille par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

3.6.1.1. Principe

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une technique non invasive et bien établie de mesure de la taille et de la distribution de la taille de molécules ou de particules généralement dans la région submicronique.

Les applications habituelles de la diffusion dynamique de la lumière sont la caractérisation des particules, émulsions ou molécules qui sont dispersées ou dissoutes dans un liquide. Le mouvement brownien des particules ou molécules en suspension engendre une fluctuation de l'intensité au cours

Matériels et Méthodes

du temps de la lumière laser diffusée par les particules ou molécules. L'analyse de ces fluctuations d'intensité permet d'obtenir leur coefficient de diffusion relié à leur vitesse due au mouvement brownien et, permet d'obtenir ainsi la taille des particules à l'aide de la relation de Stokes-Einstein (équation 7)

$$v_d = \frac{k.T}{6\pi.\eta.I_{rh}} \text{ (équation 7)}$$

où η est la viscosité dynamique du solvant, et I_{rh} (m) le rayon de la molécule supposée sphérique et qui est alors nommé rayon hydrodynamique

avec k , constante de Boltzmann ($1,3806503 \cdot 10^{-23}$ J / K) et T la température en Kelvin.

3.6.1.2. Protocole

Le diamètre hydrodynamique des caséines micellaires a été mesuré par diffusion dynamique de la lumière par un appareil Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, Angleterre). L'appareil était équipé d'un laser 532 nm DPSS à fréquence doublée à une fréquence. Les distributions de taille des particules ont été déterminées en utilisant une cuvette Haute concentration (Zen0112, Malvern Instruments, UK). Le modèle d'analyse CONTIN avec un angle de diffusion de 173° a été appliqué pour transformer la fonction d'autocorrélation en distributions de taille de particules. Les données sont analysées et récupérées en utilisant le Zetasizer software 7.10 (Malvern Instruments).

Le tampon phosphate PBS a été choisi comme dispersant (indice de réfraction de 1,332 et viscosité de 0,86 mPa à 25°C). Les concentrations de caséines micellaires et de curcumine étaient respectivement fixées à $15,8 \mu\text{M}$ et à $51 \mu\text{M}$ afin d'avoir un rapport caséines micellaires : curcumine correspondant à 80 % de quenching de caséines micellaires (article 1 page 154). Les indices d'absorption et de réfraction des protéines réels étaient fixés respectivement à 0,001 et 1,450. Un délai de 300 s a été fixé entre chaque mesure pour s'assurer que l'équilibre thermique était atteint. Les réglages du nombre et de la durée d'analyse des runs étaient en mode automatique.

3.6.2. Mesure de mobilité électrophorétique

3.6.2.1. Principe

La mobilité électrophorétique représente la charge de surface d'une particule. Cette charge de surface permet de prédire les interactions entre les particules en suspension et donc la stabilité de la dispersion face à l'agrégation. C'est l'un des paramètres fondamentaux connus pour affecter la stabilité d'une dispersion et la durée de stockage d'une formulation et par suite le temps et le coût de cette formulation ⁴⁹⁰.

Le principe de la mesure est de provoquer la migration des particules de l'échantillon contenues dans la cellule de mesure en appliquant une tension alternative entre deux électrodes.

Ensuite, le potentiel Zêta approximatif est calculé à partir de la mobilité électrophorétique en utilisant le modèle de Smoluchowski. Les seuls paramètres nécessaires à la détermination du potentiel Zêta sont : la constante diélectrique du liquide, son indice de réfraction et sa viscosité.

3.6.2.2. Protocole

La mobilité électrophorétique a été mesurée par diffusion dynamique de lumière à l'aide d'un Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, Angleterre) en utilisant une cuvette Haute concentration Zen0112. La concentration des caséines micellaires était de 15,8 μM et celle de la curcumine de 58 μM . Chaque expérience a été faite en triplicat.

3.6.3. Détermination de la taille des particules par granulométrie laser (voie sèche et humide)

3.6.3.1. Principe

La distribution de la taille des particules de poudre a été déterminée par granulométrie laser (également appelée diffraction laser ou diffusion statique de la lumière) grâce à un granulomètre Malvern Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd, Angleterre). Ce type d'appareil est équipé d'un laser de type He/Ne d'une puissance de 5 mW, à une longueur d'onde de 632,8 nm et d'une diode bleue supplémentaire de longueur d'onde de 460 nm dans le cas d'une mesure en voie humide. Une

Matériels et Méthodes

particule diffuse la lumière selon un angle inversement proportionnel à sa taille. Les grandes particules dévient une quantité plus importante de lumière avec des angles faibles et inversement pour les petites particules. Ainsi, la distribution granulométrique d'un échantillon peut être obtenue par la mesure de l'intensité lumineuse diffusée en fonction de l'angle de diffusion.

3.6.3.2. Protocole

L'analyse de la granulométrie des poudres a été réalisée selon les cas en voie humide (suivi cinétique de réhydratation) ou en voie sèche.

Pour les analyses en voie liquide, la poudre a été dispersée dans l'eau distillée. 1 mg de poudre a été ajouté, sous agitation, dans un disperseur hydro MV rempli d'eau distillée relié à la cellule de mesure, pour obtenir un taux d'obscuratation entre 15 et 20 % ; l'indice de réfraction de la particule était de 1,45 et celui du dispersant de 1,33. Par exemple pour une réhydratation de 8h et 30 min, 3000 mesures ont été effectuées par analyse avec une mesure toutes les 10 s.

Pour les analyses en voie sèche, la poudre a été dispersée grâce à un disperseur Aero S et envoyée dans la cellule de mesure par effet venturi à 3,5 bars de pression, avec une vitesse d'alimentation (feed rate) de 40 % et un diamètre de buse d'alimentation (hopper gap) de 3 mm.

Trois mesures ont été effectuées pour chaque échantillon. Les distributions de tailles ainsi que les diamètres caractéristiques D10, D50 et D90 ont été relevés. Ces valeurs représentent les distributions granulométriques en volume, correspondant à 10, 50 et 90 % des particules. L'acquisition des données a été réalisée à l'aide du logiciel de traitement Malvern (Mastersizer-v3.50)

3.6.4. Diffusion des rayons X aux petits angles ou Small Angle X-ray Scattering (SAXS)

3.6.4.1. Principe

Le principe de la diffusion/diffraction des rayons aux petits angles SAXS a été détaillé dans la partie de l'étude bibliographique.

3.6.4.2. Protocole pour l'évaluation de la structure micellaire dopée de curcumine sous forme aqueuse

Les mesures SAXS ont été réalisées au Synchrotron SOLEIL (Orsay) sur la ligne de lumière SWING à une énergie de 12 KeV. Les distances séparant l'échantillon de la caméra CCD faisant office de détecteur, ont été fixées à 1,47 et 2,97 m afin de couvrir des gammes de vecteur d'ondes (q , en \AA^{-1}) respectivement égales à 0,008-0,7 et 0,004-0,4 \AA^{-1} . La calibration en vecteur d'ondes q a été effectuée en utilisant le biphénate d'argent comme standard (distance référence = 58,38 \AA). Pour la mise à l'échelle en intensité absolue, l'intensité diffusée par les capillaires vides et les capillaires remplis d'eau déminéralisée ont été préalablement enregistrés. La valeur de la constante de contribution de l'eau est de 0,016 cm^{-1} .

Par la suite, le signal du même capillaire contenant la solution du solvant a été enregistrée pour le soustraire à chaque signal d'échantillon mesuré.

3.6.4.3. Protocole pour l'évaluation de la structure micellaire dopée de curcumine sous forme de poudre

Les profils SAXS ont été réalisés par sur un appareil SAXSess mc² (Anton Paar, Autriche). Cet appareil est relié à un générateur électrique (ID 3003 laboratory X-Ray generator) équipé d'un tube à rayons X fermé (PANalytical, $\lambda_{\text{Cu K}\alpha} = 0,1542 \text{ nm}$) opérant à 40 kV et 50 mA. Les poudres de caséines micellaires ont été introduites dans un capillaire "Specialglass" (1,5 mm, WJM-Glas) avant d'être placées dans une chambre sous vide à 20 °C. L'intensité diffusée a été détectée par une caméra CCD (Princeton Instruments, distance échantillon-caméra = 309 mm). En utilisant le logiciel SAXSQuant (Anton Paar), les images en 2D ont été intégrées pour donner des profils d'intensités diffusées en fonction du vecteur d'onde q . Les données ont été calibrées et normalisées en atténuant l'intensité de diffusion du faisceau primaire (en utilisant l'eau comme référence).

3.6.5. Diffusion multiple de la lumière

3.6.5.1. Protocole pour le suivi de la variation de l'intensité de lumière rétrodiffusée pour le mélange caséines micellaires-curcumine-glucono-delta-lactone.

L'agrégation des caséines micellaires réhydratées à 50 g.L⁻¹ (pendant 24 h dans du PBS) est obtenue par hydrolyse de 3 % (p/v) glucono-delta-lactone en acide gluconique. Elle a été suivie par diffusion multiple de la lumière grâce au Turbiscan Classic MA 2000 (Formulaction, France) en utilisant une source de lumière pulsée dans le domaine de l'Infra-rouge ($\lambda = 850$ nm). Deux détecteurs synchronisés détectaient la lumière transmise et rétrodiffusée sur toute la hauteur d'un tube en verre cylindrique de bas en haut par pas de 40 μm . Dans le cas des caséines micellaires réhydratées, l'intensité de lumière rétrodiffusée a été suivie uniquement puisque l'échantillon était turbide et donc la lumière transmise n'a pas été détectée. Le pourcentage relatif de l'intensité rétrodiffusée (ΔBS) en fonction de la hauteur de l'échantillon a été mesuré. Un scan a été enregistré toutes les 5 min après l'ajout de GDL (t_0). Le premier scan a été enregistré à t_0 puis soustrait aux scans suivants afin de mettre en évidence l'évolution du système en fonction du temps en utilisant le logiciel Turbisoft. Le pourcentage de ΔBS relatif à l'échantillon sur toute sa hauteur et en fonction du temps a été ensuite tracé. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat. L'ajout d'éthanol dans les mélanges caséines micellaires-curcumine ne dépassait pas les 2 %. La concentration finale de la curcumine ajoutée aux dispersions micellaires natives était de 51 μM . Toutes les expériences ont été faites en triplicat.

3.6.5.2. Protocole pour le suivi du pourcentage de lumière rétrodiffusée ΔBS (%) pour le mélange lait-Curcumine-Yomix

Afin de mettre en évidence l'influence de l'ajout de curcumine en solution éthanolique (2 % v/v) sur la production de yaourt à 42 °C, le protocole précédent a été appliqué en ajoutant un mélange de ferments lactiques du yaourt (Yomix) à du lait écrémé pasteurisé (10% MS) dans les proportions suivantes : 2,5 mg de Yomix pour 50 mL de lait. Du lait a été utilisé à la place des caséines micellaires puisque les bactéries lactiques ont besoin d'un milieu riche en protéines et en lactose pour se

développer et acidifier le milieu. Les témoins ont été réalisés en ajoutant le Yomix au mélange lait-éthanol dans les mêmes proportions et à 42°C.

3.6.6. Etude des propriétés rhéologiques

3.6.6.1. Protocole pour le suivi du comportement rhéologique pour le mélange caséines micellaires-curcumine-glucono-delta-lactone

Les caséines micellaires natives ou atomisées à une concentration de 50 g.L⁻¹ ont été réhydratées pendant 24 h dans du PBS. La concentration finale en curcumine ajoutée aux caséines micellaires natives réhydratées était de 51 µM. 3 % GDL (p/v) a été ajouté et les échantillons ont été immédiatement transférés dans le cylindre coaxial du rhéomètre (Kinexus, Malvern, Angleterre). Ensuite, la variation des modules visqueux (G'') et élastique (G') a été suivie à une fréquence de 1 Hz et à 0,1 % de cisaillement pour déterminer le temps de gélification des échantillons.

La fréquence a été préalablement déterminée avec un balayage de fréquence de 0,01 à 100 Hz ainsi que le taux de cisaillement en faisant un balayage de 0,0001 à 10 %. Les valeurs de fréquence et de cisaillement choisies étaient dans le domaine linéaire. Le point de gel a été déterminé quand le module élastique devenait supérieur à 1 Pa.

3.6.6.2. Protocole pour le suivi du comportement rhéologique pour le mélange lait-curcumine-glucono-delta-lactone

Le même protocole a été appliqué au lait écrémé en utilisant du Yomix à la place de la GDL comme indiqué précédemment.

Résultats et Discussion

Chapitre III : Résultats et discussions

Publication 1 : L'étude des interactions entre les micelles de caséines et curcumine et l'évaluation de l'ajout du bioactif sur la structure et les propriétés technofonctionnelles de la micelle.

1. Introduction

Des études récentes ont démontré que les caséines micellaires permettent de véhiculer des molécules bioactives^{251,451,491}. La structure interne des micelles de caséines est proche d'un nano-gel⁴⁹² ce qui entraîne une sorption élevée et une forte capacité de rétention de petites molécules en son sein^{447,493}. Afin d'améliorer l'aptitude à la dispersion et la biodisponibilité de ces dernières, les caséines micellaires natives ou modifiées ont déjà été utilisées comme systèmes d'encapsulation, ainsi que les monomères α et β -caséines, et leur assemblage. Les divers formes de caséines α et β sont des protéines avides de polyphénols^{458,459}. Des travaux récents traitent de l'influence des processus de fabrication des aliments sur la liaison entre les micelles et la curcumine. La curcumine est un polyphénol naturel extrait du rhizome de curcuma (*Curcuma longa*) qui présente un large spectre d'activités biologiques⁴⁹⁴. Plusieurs études ont porté sur les interactions curcumine/caséines micellaires par spectroscopie de fluorescence des constituants avec détermination des constantes d'association^{451,457}. Par exemple, la constante de liaison de la curcumine avec des caséines micellaires traitées par ultra-haute pression à 300 MPa a été considérablement augmentée par rapport à celle de caséines micellaires natives. Ceci a été expliqué par la dissociation des micelles en plus petites particules micellaires suite au traitement sous haute pression impliquant une augmentation de la surface spécifique disponible pour interagir avec la curcumine^{338,457}. La rétention de curcumine dans les caséines micellaires a également été accrue après traitement thermique du lait comme conséquence de l'augmentation d'hydrophobie des caséines par agrégation avec des protéines de lactosérum⁴⁹⁵.

Résultats et Discussion

Quelques travaux récents traitent de l'influence des polyphénols et de la curcumine sur la gélification par la présure des caséines micellaires ^{328,496}. En effet, il a été démontré que les catéchines du thé interagissant avec les caséines micellaires affectent les phases primaire et secondaire de la gélification par emprésurage du lait ³²⁸.

A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur l'influence des interactions caséines micellaires-curcumine (ou polyphénol) sur la gélification acide du lait. L'acidification du lait agit sur la structure des caséines micellaires en induisant la solubilisation de matériel micellaire (monomères de caséines et minéraux) et la neutralisation de la charge de surface. Elle entraîne la perte de stabilité des micelles de caséine et leur gélification en un gel colloïdal ^{449,497-499}.

Cette étude vise à comprendre le comportement des complexes caséines micellaires-curcumine pendant l'acidification. Des mesures de fluorescence et de quenching de fluorescence des résidus de tryptophane ont été utilisées pour évaluer les constantes d'interactions entre la curcumine et les caséines micellaires. Les structures externe et interne des micelles de caséines dopées avec de la curcumine ont été analysées par diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering ou DLS) et par diffusion des rayons-X aux petits angles (Small-angle X-ray scattering ou SAXS). Enfin, l'influence de la présence de la curcumine au sein de la micelle sur ses propriétés de gélification a été déterminée notamment par des mesures rhéologiques et turbidimétriques.

2. Article: Structure and gelation properties of casein micelles doped with curcumin under acidic conditions

Article accepté dans *Food and Function: Food Funct.* **6**, 3624–3633 (2015).

Aya N. Khanji,^{a,b} Florentin Michaux,^a Jordane Jasniewski^a, Jérémy Petit^a, Emna Lahimer,^a Mohamed Cherif,^a Dominique Salameh^b, Toufic Rizk^b, Sylvie Banon^{a*}.

*corresponding author.

Highlights

The positive values of enthalpy and entropy indicated that hydrophobic interactions were the major binding forces governing curcumin and MC interactions.

The internal structure of micellar casein measured by SAXS did not vary upon curcumin binding.

Curcumin did not produce change of ζ -potential and size of micellar casein.

The ability of curcumin-doped micellar casein to produce acid gel was demonstrated.

Abstract

In this study, the ability of micellar casein (MC) to interact with curcumin during acidification and to produce acid gel were investigated. Steady-state fluorescence spectroscopy of curcumin variation and fluorescence quenching of caseins upon binding with curcumin molecules were evidenced. Increasing the temperature from 20 to 35 °C enhanced MC-curcumin interactions as reflected by the raise of binding constant from $0.6 \pm 0.3 \times 10^4$ to $6.6 \pm 0.6 \times 10^4$ M⁻¹. From changes in entropy, enthalpy and Gibbs free energy, hydrophobic interaction were proposed as major binding forces. Static fluorescence MC quenching was demonstrated for MC-curcumin complex during acidification. From pH 7.4 to pH 5.0, the binding sites number varied in the range from 1.25 ± 0.05 to 1.49 ± 0.05 and the binding constant k_b varied from $3.9 \pm 0.4 \times 10^4$ to $7.5 \pm 0.7 \times 10^4$ M⁻¹. Small Angle X-Ray Scattering profiles demonstrated that MC internal structure was unchanged upon curcumin binding. The ζ -potential value of curcumin-doped MC indicated that curcumin did not modify the global charge of MC particles. Acid

Résultats et Discussion

gelation studied by oscillation rheology and static multiple light scattering at 20 and 35 °C led to similar behavior for native and curcumin-doped MC suspensions. For the first time, it was demonstrated that the colloidal and functional properties of MC were unchanged when doped with curcumin during acidification.

Introduction

Micellar caseins (MC) in milk are considered as functional proteins for bringing digestible protein to the neonate and preventing calcium phosphate precipitation in milk ^{1,2}. Recent studies also demonstrated that MC can carry bioactive molecules to tissue and cells³⁻⁵ MC consists in colloidal particles of 100 nm radius built by interactions between about 10⁴ casein molecules and 800 nanoclusters of amorphous calcium phosphate ². Self-assembly of casein monomers occurs through hydrophobic areas and calcium bridges between phosphoserine residues. The internal structure of MC can be considered as a nano-gel ⁶ and that contributes to its high sorption and loading capacity of small molecules ^{7,8}. Many bioactives are hydrophobic and thus show poor aqueous solubility. In order to improve their dispersibility and bioavailability in aqueous media, native or modified MC have already been used as delivery systems, as well as α_s - and β -casein monomers, and their self-assemblies. For example, the various α_s - and β -casein forms are avid binders of polyphenols ^{9,10}.

Moreover, the acid-soluble calcium-phosphate bonds of MC and its sensitivity to proteolysis provide an efficient release mechanism activated in the gastric and pancreatic stages of digestion ³. MC presents also many advantages as labelled "Generally Recognized As Safe" food proteins and highly stable materials during heat treatment and high-pressure processing ¹¹. Recent papers deal with the influence of food processing on curcumin binding with MC. Curcumin is a natural polyphenol extracted from turmeric rhizome (*Curcuma longa*) that presents a broad spectrum of biological activities including antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, antiamyloid and antitumor properties ¹². It presents a very low solubility in water (2.99×10^{-8} M) at neutral or acid pH and becomes soluble in alkaline conditions albeit its very high sensitive to hydrolysis. It was recently taken advantage of the pH-dependent solubility of curcumin and the self-assembly properties of sodium caseinate in the pH

range from 7 to 12 in order to produce new MC delivery systems¹³. Several studies have focused on curcumin/MC interactions using the fluorescent properties of individual components^{4,14}. The binding constant of curcumin with Ultra-High Pressure Homogenized MC (UHPH-MC) processed at 300 MPa was significantly increased compared to native MC. This was explained by the dissociation of MC into smaller micelles under high-pressure homogenization processing resulting in an increase in their specific surface area available for interaction with curcumin¹⁴. Static high-pressure treatment of skim milk also enhanced the association of curcumin with MC, but the mechanism proposed in the literature, related to structural modifications of MC (solubilization of micellar calcium phosphate and MC size reduction), remains to be ascertained¹⁵. Binding of curcumin to MC was increased after milk heat treatment as a consequence of the formation of heat-induced whey protein aggregates¹⁶.

To the best of our knowledge, only a few recent works deal with the influence of polyphenol and curcumin on rennet-gelation of MC^{17,18}. Recently, it was shown that tea catechins interacting with MC impacted both the primary and the secondary stage of milk rennet aggregation¹⁸ but to our knowledge no study has been carried out on acid aggregation or gelation. Milk acidification produces colloidal gel at around pH 4.6. Moreover, milk acidification acts on MC stability by reducing the charge and inducing the solubilization of micellar material (casein monomers at low temperature and minerals)^{19–22}.

This study aimed at understanding the behavior of MC-curcumin complexes during acidification. Direct steady-state fluorescence and tryptophan quenching were employed to evaluate the extent of curcumin-MC interactions. The internal and overall structure of curcumin-doped MC were analyzed by Small-angle X-ray scattering (SAXS) and Dynamic Light Scattering (DLS). The influence of temperature and pH on the stability of MC-curcumin complexes and their gelation properties were investigated by fluorescence spectroscopy, static multiple light scattering and rheological measurements.

Results and Discussion

Study of curcumin-MC interactions by fluorescence

Résultats et Discussion

On the basis of interactions between the phenolic rings of curcumin and the hydrophobic amino acid residues of tryptophan (trp) in caseins, curcumin binding to MC was studied through fluorescence properties of both components (figures 1A and B). Fluorescence quenching at 344 nm indicated that MC tryptophan residues (1 to 2 trp residues per casein monomer) were interacting with curcumin (figure 1C). Higher curcumin fluorescence at increased MC concentrations indicated that curcumin molecules were transferred from the bulk to MC (figure 1D).

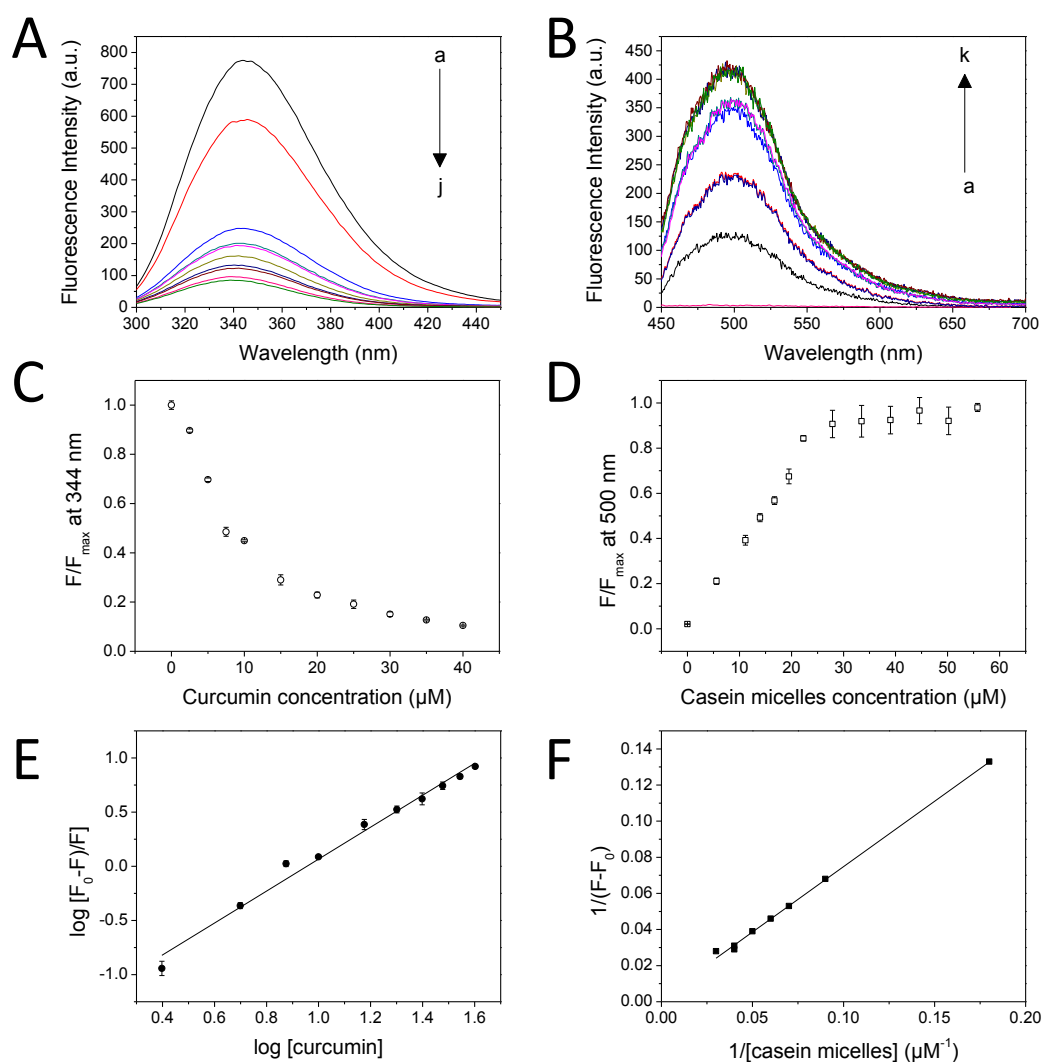


Figure 1. Fluorescence emission induced by the binding of curcumin to casein micelles. (A) Intrinsic fluorescence emission spectra of 8.9 μM casein micelles in the presence of increasing concentrations of curcumin (0 - 50 μM, a-j curves). Excitation wavelength (λ_{exc}) was set at 280 nm. (B) Intrinsic fluorescence emission spectra of 5 μM curcumin ($\lambda_{exc} = 420$ nm) at increasing concentrations of casein micelles (0 - 55.8 μM, a-k curves). (C) Fluorescence quenching of 8.9 μM casein micelles at $\lambda_{em} = 344$ nm ($\lambda_{exc} = 280$ nm) with increasing curcumin concentration (0 - 40 μM). (D) Fluorescence intensity of curcumin at $\lambda_{em} = 500$ nm ($\lambda_{exc} = 280$ nm) with increasing concentrations of casein micelles (0 - 55.8 μM). (E) Double logarithmic plot: $(F_0 - F)/F$ vs. $[\text{curcumin}]$ from fluorescence quenching experiments. (F) Double reciprocal plot: $1/(F - F_0)$ vs. $1/[\text{casein micelles}]$ from fluorescence intensity experiments.

Quenching data was used to quantify curcumin-MC interaction from the modified Stern-Volmer equation ²³:

$$\frac{F_0}{F_0-F} = \frac{1}{fK_{SV} \cdot [\text{Cur}]} + \frac{1}{f} \quad (1)$$

where F_0 was the initial fluorescence intensity, F was the fluorescence intensity in the presence of a quenching agent (such as curcumin), K_{SV} the Stern-Volmer quenching constant (M^{-1}), $[\text{Cur}]$ the curcumin (quencher) molar concentration (M), and f the fraction of accessible fluorophore to a more polar quencher that permitted to determine the fractional fluorescence contribution of the total emission for interaction with the studied quencher ²³. The Stern-Volmer quenching constant K_{SV} was calculated from the plot of $F_0/(F_0 - F)$ vs. $1/[\text{Cur}]$ as the ratio between the y-axis intercept ($1/f$) and the slope, $1/(f K_{SV})$ ²³. At pH 7.4 and 6.5, K_{SV} were found at $18.2 \pm 0.2 \times 10^4$ and $18.8 \pm 0.9 \times 10^4 M^{-1}$ respectively (table 1), which remained in the same order of magnitude as literature values⁴, *i.e.* $11.3 \times 10^4 M^{-1}$ (280 nm excitation and 342 nm emission) and $8.3 \times 10^4 M^{-1}$ (295 nm excitation and 344 nm emission wavelength), or $7.2 \times 10^4 M^{-1}$ (280 nm excitation and from 300 to 450 nm emission) ¹⁵.

Table 1: Values of the Stern-Volmer constant K_{SV} , the binding constant K_b , and the number of protein sites n , for curcumin-MC mixtures at different pH values. Experiments were made in triplicate at 25 °C.

pH	$K_{SV} (\times 10^4 M^{-1})$	$K_b (\times 10^4 M^{-1})$	N
7.4	18.8 ± 0.9	3.9 ± 0.4	1.47 ± 0.02
6.5	18.2 ± 0.2	7.8 ± 1.3	1.25 ± 0.06
6.0	21.9 ± 0.5	9.2 ± 1.6	1.25 ± 0.05
5.5	24.1 ± 1.5	7.7 ± 1.2	1.38 ± 0.06
5.0	32.5 ± 1.5	7.5 ± 0.7	1.49 ± 0.05

Concomitantly to the quenching of casein fluorescence by curcumin addition, a blue-shift of tryptophan spectrum was noticed (figure 1A). The fluorescence of tryptophan is sensitive to the

Résultats et Discussion

polarity of its environment including hydration.¹⁴ The slight blue shift from 346.0 to 340.0 nm was attributed to a more apolar tryptophan microenvironment through increasing curcumin binding^{14, 24}. This effect was taken into account with the linearized form of the Stern-Volmer equation that permitted to determine the number of binding sites (n) and the binding constant (K_b)¹⁴:

$$\log_{10} \left[\frac{(F_0 - F)}{F} \right] = \log_{10} K_b + n \log_{10}([Cur]) \quad (2)$$

The modeling of the current study led to an average n value of 1.47 ± 0.02 that was relevant with the presence of one to two tryptophan residues per casein monomer in MC². The binding constant determined from quenching data (figure 1E) equaled $3.9 \pm 0.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ at pH 7.4 and was in good agreement with literature values¹⁴ ranging from 2.4×10^4 to $5.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. This binding constant range corresponds to non-covalent interactions²⁵.

From the spectral overlap of trp emission and curcumin absorption, dynamic quenching can occur between the donor (trp) and the acceptor (curcumin). The quenching of donor (trp) fluorescence can then be due to acceptor (curcumin) located at different distances and orientations, and also to relative motions of donor and acceptor. All these contributions led to an apparent decay of donor fluorescence that could be related to an apparent distance distribution of acceptor. Considering very weak interactions between donor and acceptor, the evaluation of distance between them can be evaluated from the Förster theory briefly described above and in details elsewhere^{26, 27}. On the basis of the Förster theory, the energy transfer efficiency, E , from the donor (trp) to the acceptor (curcumin) can be calculated from donor quenching:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} \quad (3)$$

where F_0 and F , were the fluorescence intensity of tryptophan from MC in the absence and presence of curcumin, respectively²⁶. The Förster critical distance, R_0 , at which 50% of the excitation energy was transferred from the donor to the acceptor can be calculated from equation (4) :

$$R_0^6 = 8.785 \times 10^{-5} \frac{\kappa^2 \phi_D J}{n^4} \quad (4)$$

where κ^2 , the orientation factor between donor and acceptor, was chosen equaled to 2/3 for a random distribution. The quantum yield of donor in absence of acceptor, Φ_D , was fixed to 0.14 as proposed for tryptophan in water between 300 and 450 nm ²⁶. The index of refraction, n , was taken to be 1.332 in PBS. J was the overlap integral between donor and acceptor and it was calculated from 300 to 450 nm according to ²⁶:

$$J = \frac{\sum_i F_D(\lambda_i) \varepsilon_A(\lambda_i) \lambda_i^4}{\sum_j F_D(\lambda_j)} \quad (5)$$

where F_D was the normalized fluorescence spectrum of the donor, ε_A was the molar absorption coefficient of the acceptor. When ε_A and wavelength λ were expressed in $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ and in nm, respectively, then J was expressed in units of $M^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot nm^4$ and the Förster distance, R_0 , calculated from equation (4) was in units of Å ²⁶.

Once the energy transfer efficiency and the Förster distance were known, the average distance between donor and acceptor was calculated from ²⁷:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (6)$$

The Förster distance, R_0 , for MC and curcumin was found at 27 Å that falls into the usual range of R_0 values for tryptophan as donor, *i.e.* from 12 Å to 40 Å ²⁶. The average distance between MC and curcumin, r , was calculated at 33 Å. The distance r between pepsin and curcumin was recently found to be 24.5 Å within the curcumin-pepsin complex ²⁸. For curcumin and bovine- α -lactalbumin complex R_0 and r were found at 4-5 and 5-9 Å, respectively ²⁹. The overlap integral J and the energy transfer efficiency E were found at $1.6 \times 10^{-14} M^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot nm^4$ and 0.24 respectively. As a comparison, E was found equaled to 0.13 for curcumin and bovine- α -lactalbumin complex ²⁹.

Résultats et Discussion

Curcumin fluorescence was measured at a curcumin concentration of 5 μM , and increasing MC concentration. The binding constant was estimated by the equation of Wang and Edelman (1971)^{4, 14, 30}:

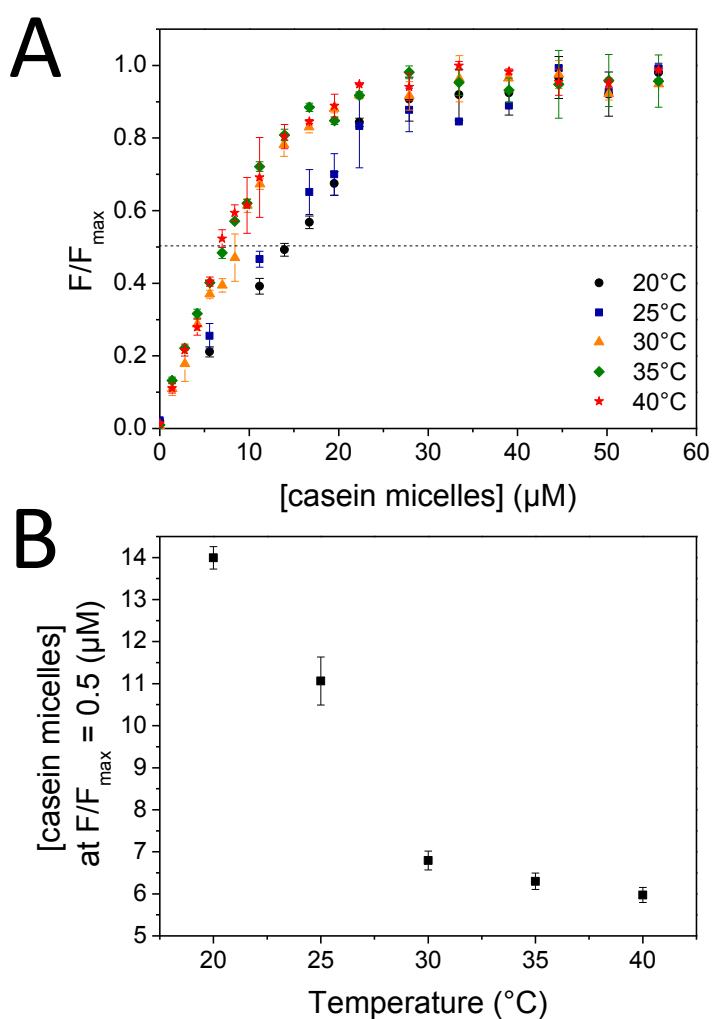
$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{\Delta F_{\max}} + \frac{1}{K_b \Delta F_{\max} [\text{MC}]} \quad (7)$$

where ΔF was the difference in fluorescence intensity at 500 nm between solutions with and without curcumin, ΔF_{\max} the maximum change in fluorescence, K_b the binding constant (M^{-1}) of curcumin with MC and $[\text{MC}]$ the casein micelle concentration expressed in molar unit. A binding constant K_b was calculated from the reverse plot of ΔF vs. $[\text{MC}]$, as the ratio between the y-axis intercept, $1/\Delta F_{\max}$, and the slope, $1/(\Delta F_{\max} K_b)$ (figure 1F). In this study, a K_b value of $0.6 \pm 0.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ was calculated by the double reciprocal method (cf. equation 7 and figure 1F, $R^2 = 0.995$), which corroborated literature values obtained in similar conditions with $0.6 \pm 0.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ and $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ^{4, 14}.

The ratios MC/curcumin ratios obtained at maximal quenching (figure 1C) and maximal curcumin fluorescence intensities (figure 1D) were chosen to determine the influence of curcumin addition on MC colloidal properties then on acid aggregation and gelation.

Influence of temperature on curcumin-MC interactions

Temperature was expected to influence curcumin-MC assemblies since hydrophobic interactions between phenolic rings of curcumin and hydrophobic amino acid residues of caseins were hypothesized. Moreover, it is well-known that the temperature range from 10 to 40 $^{\circ}\text{C}$ influence the solubilization of hydrophobic β -casein and the voluminosity of MC³¹. It was then relevant to study curcumin-MC behavior over this temperature range by fluorescence.



Figures 2. (A) Normalized fluorescence intensity of 5 μM curcumin at 500 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 420$ nm) in the presence of increasing casein micelles concentrations (0, 5.6, 11.2, 13.9, 16.7, 19.5, 22.3, 27.9, 33.5, 39, 44.6, 50.2, and 55.8 μM) at 20, 25, 30, 35, and 40 $^{\circ}\text{C}$ ($n = 3$). (B) Casein micelles concentrations at half maximal fluorescence in the 20 - 40 $^{\circ}\text{C}$ temperature range.

From normalized fluorescence data of curcumin (at 5 μM) as a function of MC concentration, saturation curves (figure 2A) were obtained. Two behaviors were observed according to temperature: the first one at 20 and 25 $^{\circ}\text{C}$ and the other one at 30, 35, and 40 $^{\circ}\text{C}$. To reach half of the maximal fluorescence intensity at 5 μM curcumin concentration, twice the casein concentration (12 μM vs 6 μM) was necessary at lower temperature (figure 2 B). Increasing temperature from 20 to 35 $^{\circ}\text{C}$ increased the binding constant K_b from 0.6 to 6.6 $\times 10^4$ M^{-1} (table 2).

Résultats et Discussion

Table 2: Variation of K_b values (eq. 3) as a function of temperature. Experiments were made in triplicate.

Temperature(°C)	$K_b (\times 10^4 \text{ M}^{-1})$
20	0.6 ± 0.3
25	2.2 ± 0.5
30	3.8 ± 1.2
35	6.6 ± 0.6

The obtained binding constants values were moderate and could be attributed to non-covalent interactions. The increase in K_b values with temperature suggested that the binding reaction between curcumin and MC was endothermic²⁵. From K_b dependency to temperature, the van't Hoff equation gave $\Delta H = +116.5 \pm 18.2 \text{ kJ.M}^{-1}$ and $\Delta S = +471.8 \pm 60.5 \text{ J.K}^{-1}.\text{M}^{-1}$. $\Delta H = +114.5 \text{ kJ.M}^{-1}$ and $\Delta S = +471.8 \text{ J K}^{-1}.\text{M}^{-1}$. This led to Gibbs free energy values, ΔG varying from -21.7 to $-28.8 \text{ kJ.mol}^{-1}$ from 20 to 35 °C. The negative change in ΔG supported that curcumin binding to MC was spontaneous. The positive values of enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS) indicated that hydrophobic interactions were the major binding forces governing interactions²⁵. The positive value of enthalpy (ΔH) may be related to two main factors: the loss of hydrophobic hydration structures when the curcumin molecules approached MC and the partial disintegration of the bound water structure surrounding the curcumin molecules when they came into contact with MC hydrophobic regions. The positive value of ΔS should be attributed to the release of combined water molecules from protein or curcumin to buffer medium when curcumin bound to MC. Another antioxidant molecule, α -tocopherol, showed the same thermodynamic profile for enthalpy, entropy and Gibbs energy when interacting with human-serum albumin²⁵. Another way to enhance hydrophobic interactions of MC with curcumin was to remove β -casein from the micellar system in order to increase the hydrophobic character of MC interior³⁰. This resulted in an increased binding of curcumin to modified-MC³⁰. MC contains 20 000 casein monomers and result from aggregation of α_s - and β - casein monomers with calcium phosphate then stabilized

with κ casein in surface^{33,34}. The open MC structures permit small molecules like curcumin to enter and interact with α - or β -casein. In order to go further on the influence of curcumin binding on MC structure, a multiscale characterization of the MC internal and overall structure was performed. The influence of curcumin complexation on MC internal structure was studied by SAXS. Moreover, MC size variation upon curcumin addition was investigated by DLS.

Influence of curcumin on internal and overall MC structure in PBS buffer

Small angle scattering methods allow the investigation of the size and shape of the entire casein micelle or of its internal structure depending on the employed experimental q -range. The lower the q -value, the broader the observation window of the system. Experiments performed by Ultra Small Angle X-ray Scattering (USAXS) at low q -value of $3 \times 10^{-4} \text{ \AA}^{-1}$ were used to study the entire casein micelle structure³⁵. In this study, the experimental q -range (from 4×10^{-3} to 0.7 \AA^{-1}) was suitable for investigating the variations of casein micellar internal structure upon curcumin encapsulation. SAXS profiles of MC dispersion (superimposed and shifted in intensity) are presented in figure.3A and 3B. Samples without curcumin have been analyzed at two sample-detector distances. The superimposition of the MC patterns acquired at both distances (cf. circles and diamonds) confirmed the validity of the mathematical treatment used to recover the absolute intensity in cm^{-1} . Mixtures of MC and curcumin have been analyzed only using the long distance configuration.

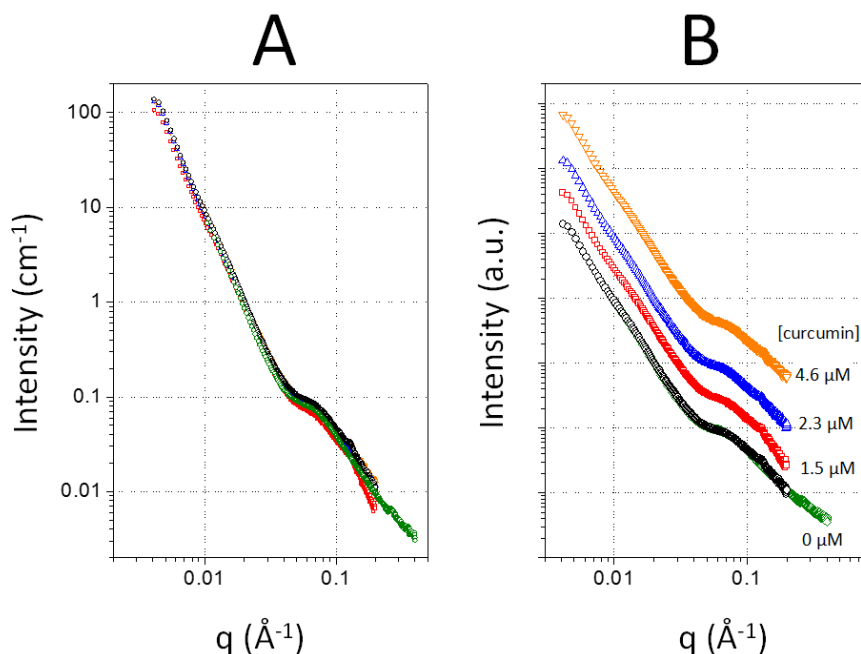


Figure 3. Small Angles X-Ray Scattering profiles of casein micelles dispersions. Circles and diamonds: 6.7 μM CM in the absence of curcumin respectively recorded at long and short sample-detector distances; squares, triangles, and orange triangles: 6.7 μM casein micelles and 1.5, 2.3, and 4.6 μM curcumin, respectively, recorded only at long sample-detector distance. (A) superimposed curves and (B) curves shifted for clarity purposes.

The shape of the MC scattering curves was consistent with literature data about small-angle scattering of casein micelles as reviewed recently³⁶. At low angles ($4 \times 10^{-3} < q \text{ (Å}^{-1}\text{)} < 3 \times 10^{-2}$), a near q^{-4} slope was detected corresponding to the form factor of the overall casein micelles structure. An inflexion point was reported around 0.07 Å^{-1} followed by a q^{-2} slope at high angles. This signal was related to the form factor of calcium phosphate nanoclusters^{5,35}. The addition of different curcumin concentrations to the MC suspension did not show any influence on the scattering profiles. All the curves were superimposed demonstrating that the internal structure of the MC was not modified upon curcumin addition. Different results were reported on the effect of tannins (epigallocatechin gallate, EGCG) addition on MC internal structure⁵. EGCG addition to MC led to a higher scattered intensity at low angles due to an increase in the global electronic density of the casein micelle. Moreover, the presence of tannins significantly altered the scattering profile at high q values⁵. Calcium chelation by EGCG resulted in the disappearance of the inflexion at 0.07 Å^{-1} ²⁷. From our results, no sensible modification of the scattering signal was observed upon curcumin addition to MC. This can be explained by the

difference in biomolecules concentration⁵; indeed, in the work of Shukla et al.²⁷, EGCG concentration was about thousand fold higher than the curcumin concentration of the current study. More recently, Haratifar and Corredig found that up to 0.08 mg EGCG were bound per mg of milk protein¹⁸. No such high concentrations were tested with curcumin due to the fact that curcumin concentration (5 - 50 μ M) was chosen with respect to the right biological activity usually found for example against bone cancer cells over healthy bone cells or U2OS osteosarcoma cells^{37, 38}.

DLS and ζ potential measurements were performed to acquire more information on size and stability of MC doped with curcumin. The influence of raising temperature from 20 to 35 °C on the size and charge of native and curcumin-doped MC was determined. The results obtained after addition of curcumin did not reveal significant change in average MC size. At 20 °C, MC size was determined at 187 ± 4 nm for control and 186 ± 3 nm after curcumin addition. Increasing temperature up to 35 °C gave lower size at 175.8 ± 8.7 nm for control and 177 ± 8 nm after curcumin addition. Less hydration and lower voluminosity with higher temperature explained such size variation³⁹. The polydispersity index (PDI) was equaled to 0.16 ± 0.01 at 20 °C and 0.14 ± 0.01 at 35 °C for native and curcumin-doped MC respectively, indicating narrow size distributions and no disturbance in overall MC structure. Either vitamin D₂ or docosahexaenoic acid (DHA) could be incorporated into the hydrophobic core of re-formed MC (from Na-caseinate supplemented with phosphate, citrate, and calcium ions) without variation of MC size and morphology, as measured by dynamic light scattering and observed by TEM¹¹. Small tannins were also carried by MC without change in its colloidal size⁵.

Curcumin addition to MC did not modify the overall charge and stability of MC. ζ potential values equaled -12.0 ± 0.7 mV for MC control and -11.5 ± 1.2 mV for MC doped with curcumin at 20 °C whereas -13.8 ± 0.7 mV and -14.1 ± 0.9 mV were respectively found at 35 °C.

X-ray and light scattering experiments revealed that the presence of curcumin did not modify the MC internal and overall structure. These results suggested that MC can carry curcumin without change in overall structure. The question then arises as to what the effect of loaded curcumin on acid gelation

Résultats et Discussion

properties of MC is. Further investigations of the current work were focused on the influence of curcumin on MC colloidal stability under acidification in the 4.2 – 7.4 pH range between 20 and 35 °C. This was first studied by fluorescence spectroscopy.

Influence of acidification on curcumin-MC interactions

The quenching of trp fluorescence by curcumin binding to MC was observed after stabilization of mixtures at pH values ranging from pH 5.0 to 7.4 (figure 4).

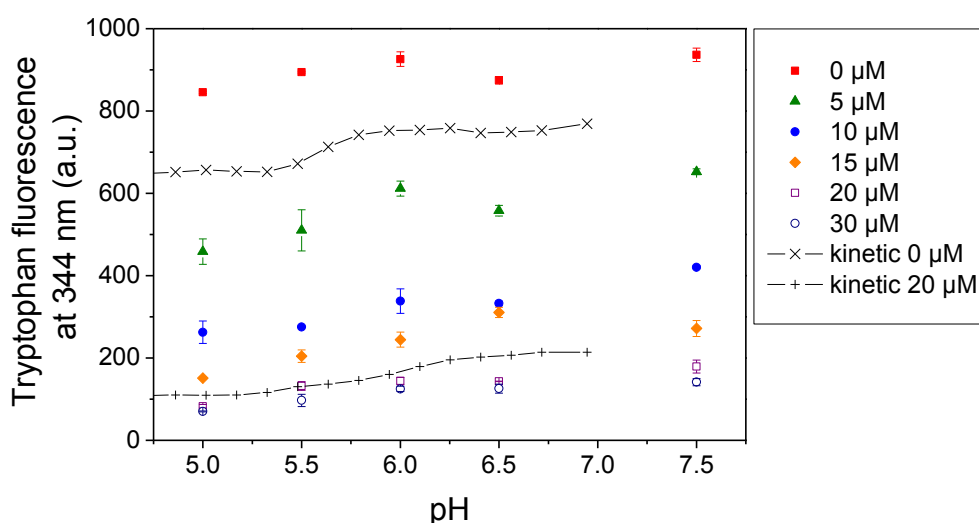


Figure 4. Fluorescence quenching of casein micelles (8.9 μM) after MC acidification overnight by hydrolysis of GDL at pH values from 7.5 to 5.0. $\lambda_{em} = 344$ nm ($\lambda_{exc} = 280$ nm) with increasing concentrations of curcumin (0 - 30 μM) at 25°C. Represented values are the mean of three replicates. Dotted lines correspond to kinetic induced by hydrolysis of GDL in MC suspension containing 0 and 20 μM curcumin. The fluorescence offset between pH stabilized and kinetic experiments performed with curcumin concentration of 0 and 20 μM is due to different apparatus configurations.

It was demonstrated that MC quenching by curcumin was stable during overall acidification and only a slight additional quenching due to pH variation was noticed as for the control (MC without curcumin). This slight MC quenching observed during acidification was probably due to more interactions between amino acid residues in the tryptophan environment in relation with protonation, demineralization and dehydration of MC. MC hydration (or voluminosity) decreased of about 30% from pH 6.6 to 4.8 while micellar calcium phosphate was fully solubilized³²⁻³⁴. The pH-dependent quenching variation influenced the binding constant K_b (equation 2) which increased from pH 7.0 to 6.0 then decreased up to pH 5.0 while K_{SV} regularly increased with acidification (table 1). Then, K_b appeared more sensitive

than K_{SV} to the quenching effect due to MC acidification. The number of protein sites (n) was the second binding parameter calculated from equation 2 and it was also found to be pH-dependent with values in the 1.25- 1.49 range (table 2). At pH 7.4 in PBS, 1.47 binding sites were obtained for MC-curcumin complex, consistently with the 1.20 binding sites found for curcumin interacting with bovine- α -lactalbumin ²⁹.

κ_q , the bimolecular quenching rate constant, was calculated from K_{SV} according to $K_{SV} = \kappa_q \times \tau_0$ where τ_0 is the average lifetime of the biomolecule. For a biomolecule without a quencher, τ_0 can be estimated at 10^{-9} s ²⁹. Then, in the pH range from 7.4 to 5.0, κ_q varied from 1.8×10^{14} to 3.2×10^{14} M⁻¹ s⁻¹ which is higher than the limiting diffusion constants of the biomolecules upon interaction with various quenchers ($\kappa_q = 2 \times 10^{10}$ L.mol⁻¹.s⁻¹) ²⁹. Then, according to κ_q fluorescence, quenching arose mainly from static mechanism by complex formation in the ground state ²⁹.

Influence of curcumin addition on the sol-gel transition measured by multiple static light scattering and rheological measurements

The sol-gel transition of MC samples acidified with GDL was followed by the evolution of the relative back scattered intensity (ΔBS) all along the sample height every 5 min after GDL addition. One result concerning MC-curcumin sample at 35 °C is presented in figure 5-A for instance.

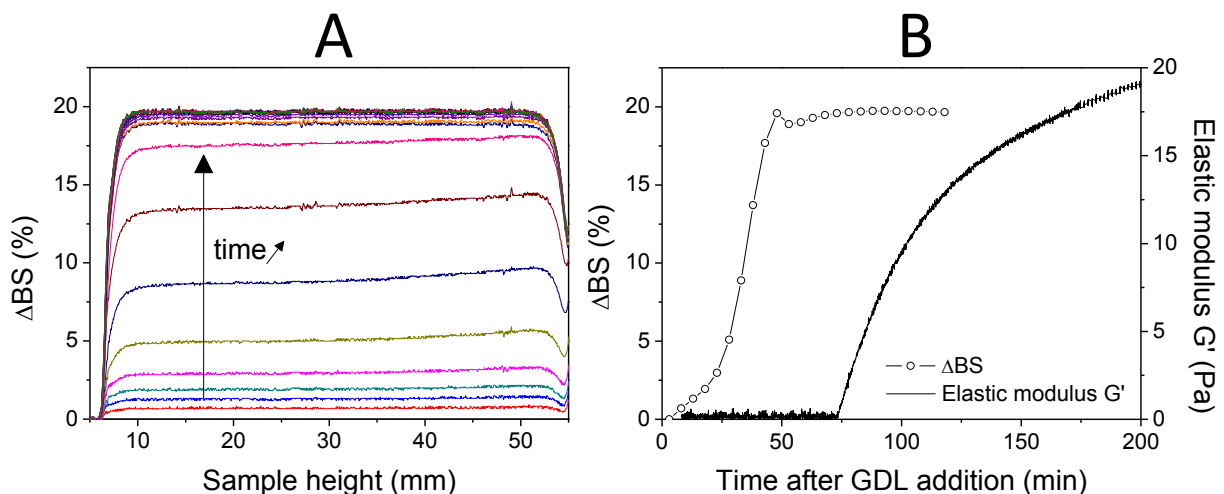


Figure 5. Backscattered intensity measurements on MC-curcumin sample at 35 °C: (A) Evolution of the relative percentage of backscattered intensity (ΔBS) ($t_0 =$ reference) upon sample height after GDL addition during 115 min (one scan every 5 minutes). (B) Evolution of the ΔBS average (calculated from sample height between 15 and 45 mm) and elastic modulus (G') upon time after GDL addition.

Résultats et Discussion

From the time of GDL addition, an increase in ΔBS was reported corresponding to MC aggregation as the intensity of scattered light increased with particle size and concentration³². This increase occurred all along the sample height, meaning that aggregation was homogeneous. No syneresis was evidenced, as the evolution was independent from sample height. The temporal evolution of the ΔBS average (calculated between 15 and 45 mm sample height) is presented in figure 5-B in relation with the elastic modulus G' profile that illustrated gel formation. ΔBS rapidly varied with acidification indicating that particle aggregation began much sooner than gelation ((classically considered to occur when G' becomes greater than 1Pa)⁴⁰. Acid gelation followed by ΔBS and G' profiles was compared for MC controls and MC doped with curcumin at 20 and 35 °C (figure 6).

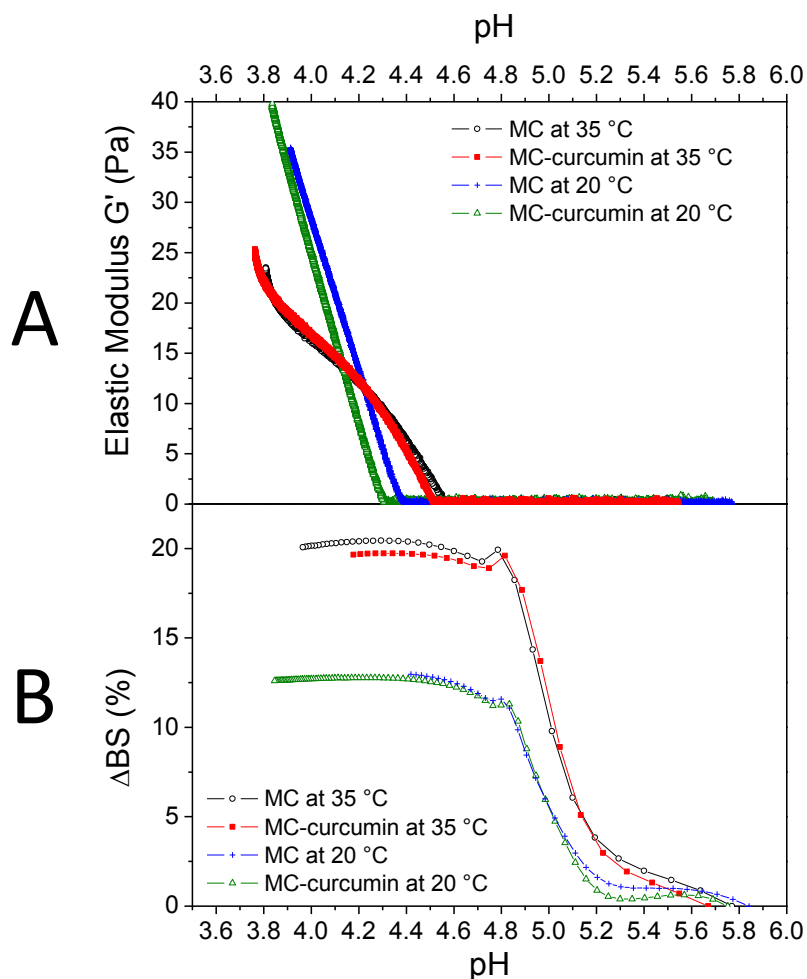


Figure 6. Evolution of (A) the elastic modulus and of (B) the relative percentage of backscattered intensity upon GDL acidification of MC and MC-curcumin samples at 20 and 35 °C.

The addition of curcumin did not affect gelation occurring around pH 4.4 and 4.6 at 20 and 35 °C respectively. Three steps were identified from Δ BS variation with pH at 20 and 35 °C: a first slight variation from the initial pH to around pH 5.2 when MC are demineralized, then a rapid increase was obtained from pH 5.2 down to pH 4.8 that might be related to an increase in particle size that is more pronounced at 35 °C than at 20 °C. Finally, a plateau value was reached whereas the sol-gel transition occurred when aggregates interacted to form a colloidal gel.

In this study, higher binding constants were obtained at 35 °C compared to 20 °C indicating more interactions between curcumin and MC with temperature. Increasing hydrophobic interactions were proposed as the major contribution to the raise in binding constants. With acidification below the isoelectric pH of caseins, enhancement of hydrophobic interactions was expected as a consequence from protein charge neutralization and lower hydration of MC³³ whereas curcumin stays in neutral form (indeed, its pK_a values were reported at pH 8.38 ± 0.04 , 9.88 ± 0.02 and 10.51 ± 0.01)⁴¹.

It was recently observed that curcumin and resveratrol increased the delay of rennet gelation^{17, 18}. Chelating calcium with polyphenols was proposed to inhibit rennet gelation by decreasing calcium binding with caseins. The partial covering of MC with curcumin was also proposed to compete with casein-casein interactions¹⁸. During acidification, it was not evidenced any effect of curcumin addition on MC gelation. The number of protein sites available for interaction with curcumin (n) was found from 1.25 to 1.49. This low value should be explained by the preservation of the main colloidal properties of MC, *i.e.* size, structure and charge. This indicated that curcumin and certainly other hydrophobic biomolecules should be conveyed efficiently by MC in the moderate acid conditions of yogurt-like products.

Material and methods

Résultats et Discussion

Material

The native-like phosphocaseins micelles (MC) used in this study were prepared by milk microfiltration and diafiltration using milk ultrafiltrate (Promilk 872 B, Ingredia Dairy Ingredients, Arras, France), prior to stabilization in powder form by spray-drying. It contained 95% (w/w) dry solids and, on a dry weight basis, 87% total proteins (about 80% phosphocaseins), 7.3% minerals, 5% lactose, and 0.8% fat. Bovine serum albumin (BSA), curcumin, glucono-delta-lactone, and sodium azide were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). All other chemicals, of analytical grade, were provided by Carlo Erba (Milan, Italy).

Preparation of solutions

Stock solutions of curcumin ($\geq 94\%$ purity) were prepared in ethanol (96%) at $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and stored protected from light at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Different curcumin concentrations were obtained from the stock solution by dilution in ethanol just before use. Phosphate Buffered Saline (PBS) solution (adjusted to pH 7.4 with HCl) was prepared with ultrapure water and contained for one liter: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na_2HPO_4 , 0.24 g KH_2PO_4 . In order to prevent bacterial growth, sodium azide (0.02% (w/v)) was added to PBS buffer. PBS buffer filtration through $0.2 \text{ }\mu\text{m}$ polyethersulfone membrane (Millipore) was performed before use. MC were dispersed in PBS buffer (pH 7.4) and stirred overnight at room temperature ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) in order to get maximal protein hydration and stabilization. MC concentration was determined by Lowry-Folin assay using BSA as reference protein.⁴ In the whole document, MC molar concentrations were always expressed in equivalent BSA concentrations. On a dry weight basis, $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MC was equivalent to $16.7\mu\text{M}$ BSA. Curcumin and MC mixtures were prepared in order to not exceed 2% (v/v) addition of ethanol and thus avoiding protein denaturation. Controls were made with MC suspensions containing ethanol without curcumin at a level not exceeding 2% (v/v) of ethanol. Unless indicated, curcumin and MC mixtures were stirred for 1 h at room temperature before use. The influence of acidification on curcumin-MC interactions was investigated by hydrolysis of various amounts of Glucono-delta-lactone (GDL) in both kinetic and steady-state conditions. Acidification was

monitored with the Lab 850 pH-meter (SCHOTT® Instruments, Germany). Each experiment was triplicated.

Fluorescence spectroscopy

The study of curcumin - MC interactions was carried out with a FLX spectrofluorimeter (Safas, Monaco), which was temperature-controlled from 20 to 35 °C (± 0.5 °C) by circulating water. Curcumin fluorescence was measured at 5 μ M in the presence of MC concentrations varying from 0 to 55.8 μ M. The emission spectra were recorded from 450 to 700 nm with an excitation wavelength of 420 nm. The slit widths used for curcumin fluorescence were 2.5 and 5 nm for excitation and emission, respectively. MC suspensions without curcumin were used as controls. MC quenching was determined at 8.9 μ M for various curcumin concentrations ranging from 0 to 40 μ M. The emission spectra were recorded from 300 to 450 nm at an excitation wavelength of 280 nm. Slit widths were 10 and 2.5 nm for excitation and emission respectively. Curcumin solutions free from MC were used as controls.

Curcumin solutions and MC suspensions were vigorously mixed during 30 s in a 5 mL-tube, then transferred into quartz cuvette (1 cm path length) for analysis. Each experiment was performed in triplicate.

Size measurements by Dynamic Light Scattering

The hydrodynamic diameter of MC was measured by Dynamic Light Scattering using the Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). The apparatus was equipped with a 532 nm frequency doubled DPSS laser He/Ne type. Particle size distributions were determined using a low volume disposable cuvette (Zen0112, Malvern Instruments, UK). CONTIN analysis model at 173° detecting angle was applied to transform the autocorrelation function into particle size distributions. Data were assessed by Zetasizer software 7.10 (Malvern Instruments). PBS buffer (1.332 refractive index and 0.86 mPa.s viscosity at 25 °C) was chosen as dispersant. MC and curcumin concentrations were fixed at 15.8 μ M and 51.0 μ M respectively in order to get a MC: curcumin ratio that corresponds to around 80 % MC quenching (Figure 1C). Absorption and real refractive indexes of protein were 0.001 and 1.450,

Résultats et Discussion

respectively. A delay of 300 s between size measurements was to ensure sample equilibration at desired temperature.

ζ-potential measurements

The zeta potential is an indirect measure of the surface charge, which is an indicator of the colloidal stability of particles. This was determined using a dynamic light scattering instrument (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK) fitted with a high concentration sample cell. The high concentration cell enabled the measurement of the MC zeta potential with no dilution of PBS buffer that was chosen as MC dispersant. MC concentration was fixed at 15.8 μM and curcumin at 51.0 μM. Each experiment was made in triplicate.

Small Angle X-Ray Scattering

SAXS measurements were carried out at SOLEIL synchrotron at the SWING beamline (12 keV energy). Two distances between sample and CCD camera, 1.47 and 2.97 m, were used to cover q -ranges from 8×10^{-3} to 0.7 \AA^{-1} and 4×10^{-3} to 0.4 \AA^{-1} respectively, where $q = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$ is the modulus of the scattering vector, 2θ is the scattering angle, and λ is the X-ray wavelength. The q -range calibration was achieved with a silver behenate standard ($d_{\text{ref}} = 58.38 \text{ \AA}$). For the absolute intensity calibration, scattering patterns of the empty capillary and the capillary filled with deionized water were first recorded. The value of the constant intensity contribution of water is equal to 0.016 cm^{-1} on the absolute scale. Then, the signal of the same capillary filled with the solvent solution was recorded for subtraction purposes before the introduction of the studied samples.

Multiple light scattering measurements for milk gelation

The aggregation of MC dispersions after GDL addition (3 % (w/v)) was followed by multiple light scattering measurements using a Turbiscan Classic MA2000 apparatus (Formulation, France) using a pulsed near-infrared light source ($\lambda = 850 \text{ nm}$). Addition of ethanol in the mixtures of MC and curcumin (1 mg.mL^{-1}) did not exceed 2 % (v/v). The low solubility of curcumin in ethanol (1 mg.mL^{-1}) implied limited addition of curcumin to high concentration of MC. The final concentrations for MC and

curcumin equaled 501 and 51 μM respectively and this corresponded to the ratio MC/ curcumin found in Figure 1D for the maximal soluble curcumin concentration. Two synchronous detectors measured transmitted and backscattered light upon sample height by several scans all along a glass cylindrical cell from the bottom to the top of the sample (5 - 7 cm analysis height) by incremental movements of 40 μm . In the case of MC dispersions, only the backscattered light intensity (at 135° from the incident beam) has been followed upon sample height since no transmitted light was detected. Backscattered intensities all along the sample have then been performed upon time. One scan has been recorded every 5 minutes after GDL addition (t_0). The first scan recorded at t_0 has been subtracted from the following scans in order to highlight the system evolution upon time using Turbisoft software. Then, the relative percentage of backscattered intensity (ΔBS) upon sample height was reported. The evolution of the average backscattered intensity upon time has also been plotted using this software. An increase of ΔBS upon time all along the sample height corresponds to a homogenous aggregation of the particles. If an increase is detected at the bottom of the glass cell and a decrease is reported at the top, a sedimentation occurs. An evolution on the opposite way corresponds to a creaming of the dispersion. Measurements have been performed in triplicates. The entire Turbiscan device has been placed in an oven to perform the measurements at 35°C . Turbiscan measurements began 3 min after GDL addition and stirring.

Viscoelastic measurements of acid milk gelation

The curcumin and MC mixtures were prepared as indicated in the previous section. GDL (3 % (w/v)) was gently stirred in MC (501 μM) and curcumin (51 μM) mixtures for 3 min and a 20 mL aliquot was immediately transferred into the gap of coaxial cylinders (DIN C25) of the Kinexus rheometer (Malvern Instruments, UK). The sol-gel transition and the development of the gel structure was followed using 0.1% shear strain and 1.0 Hz frequency at controlled temperatures 20 and 35°C . The time at which the storage modulus (G') became greater than 1 Pa was considered as the gelation point. Each test was performed in duplicate.

Conclusion

Curcumin interaction with MC was confirmed by fluorescence spectroscopy. From binding constant calculation, it was shown that higher temperature favored curcumin - MC interactions, as expected for hydrophobic molecules. X-ray and dynamic light scattering experiments revealed that curcumin did not modify MC internal and overall structures. MC ζ -potential remained unchanged after curcumin addition. Hence, MC can load curcumin without change in their overall structure and charge. The slight variation in binding constants in the pH range from 7.4 to 5.0 indicated that curcumin should be conveyed efficiently by MC in these moderate acid conditions. The acid milk gelation was not disturbed after curcumin addition at 20 and 35 °C. Further investigations should be necessary to understand the dependence of curcumin release by MC on temperature and pH variations. This would allow improving the controlled-delivery from MC during gastric and pancreatic digestion phases in order to favor curcumin and other polyphenols bioavailability in dairy foods.

Acknowledgements

Authors would like to thank Marie-José Stébé and Marianne Impéror for their help during SAXS experiments. This study was supported by grants from Erasmus Mundus (Program Element), Region Lorraine and Université de Lorraine (Program CPER 5, Nutralor). All of these are gratefully acknowledged.

References

1. Livney, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **15**, 73–83 (2010).
2. Sahu, A., Kasoju, N. & Bora, U. Fluorescence Study of the Curcumin-Casein Micelle Complexation and Its Application as a Drug Nanocarrier to Cancer Cells. *Biomacromolecules* **9**, 2905–2912 (2008).
3. Shukla, A., Narayanan, T. & Zanchi, D. Structure of casein micelles and their complexation with tannins. *Soft Matter* **5**, 2884–2888 (2009).

4. Kruif, C. G. (Kees) de, Anema, S. G., Zhu, C., Havea, P. & Coker, C. Water holding capacity and swelling of casein hydrogels. *Food Hydrocoll.* **44**, 372–379 (2015).
5. Farrell, H. M., Malin, E. L., Brown, E. M. & Qi, P. X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **11**, 135–147 (2006).
6. Horne, D. S. Casein structure, self-assembly and gelation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **7**, 456–461 (2002).
7. Jobstl, E., Howse, J. R., Fairclough, J. P. A. & Williamson, M. P. Noncovalent cross-linking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4077–4081 (2006).
8. Hasni, I. *et al.* Interaction of milk alpha- and beta-caseins with tea polyphenols. *Food Chem.* **126**, 630–639 (2011).
9. Joe, B., Vijaykumar, M. & Lokesh, B. R. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44**, 97–111 (2004).
10. Benzaria, A., Maresca, M., Taieb, N. & Dumay, E. Interaction of curcumin with phosphocasein micelles processed or not by dynamic high-pressure. *Food Chem.* **138**, 2327–2337 (2013).
11. Rahimi Yazdi, S. *et al.* Binding of curcumin to milk proteins increases after static high pressure treatment of skim milk. *J. Dairy Res.* **80**, 152–158 (2013).
12. Rahimi Yazdi, S. & Corredig, M. Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. *Food Chem.* **132**, 1143–1149 (2012).
13. Yazdi, S. R. Changing the structure of casein micelles to improve the delivery of bioactive compounds. (PhD Thesis, 2012).
14. Haratifar, S. & Corredig, M. Interactions between tea catechins and casein micelles and their impact on renneting functionality. *Food Chem.* **143**, 27–32 (2014).
15. Holt, C. & Horne, D. S. its implications for dairy technology. *Neth. Milk Dairy J.* **50**, 85–1 (1996).
16. Dalgleish, D. & Law, A. Ph-Induced Dissociation of Bovine Casein Micelles .2. Mineral Solubilization and Its Relation to Casein Release. *J. Dairy Res.* **56**, 727–735 (1989).

Résultats et Discussion

17. Banon, S. & Hardy, J. A Colloidal Approach of Milk Acidification by Glucono-Delta-Lactone. *J. Dairy Sci.* **75**, 935–941 (1992).
18. Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H. & Munro, P. A. Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. *J. Dairy Res.* **65**, 555–567 (1998).
19. Liu, D. Z., Weeks, M. G., Dunstan, D. E. & Martin, G. J. O. Temperature-dependent dynamics of bovine casein micelles in the range 10-40 degrees C. *Food Chem.* **141**, 4081–4086 (2013).
20. Chang, R., Sun, L. & Webster, T. J. Short communication: selective cytotoxicity of curcumin on osteosarcoma cells compared to healthy osteoblasts. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 461–465 (2014).
21. Jin, M., Davidson, P. M., Zivanovic, S. & Zhong, Q. Production of corn zein microparticles with loaded lysozyme directly extracted from hen egg white using spray drying: Extraction studies. *Food Chem.* **115**, 509–514 (2009).
22. Bernabe-Pineda, M., Ramirez-Silva, M. T., Romero-Romo, M., Gonzadlez-Vergara, E. & Rojas-Hernandez, A. Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution and apparent rate constant of its decomposition. *Spectrochim. Acta Part -Mol. Biomol. Spectrosc.* **60**, 1091–1097 (2004).
23. Holt, C., Wahlgren, N. M. & Drakenberg, T. Ability of a beta-casein phosphopeptide to modulate the precipitation of calcium phosphate by forming amorphous dicalcium phosphate nanoclusters. *Biochem. J.* **314 (Pt 3)**, 1035–1039 (1996).
24. Holt, C. Unfolded phosphopolypeptides enable soft and hard tissues to coexist in the same organism with relative ease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 420–425 (2013).
25. Livney, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **15**, 73–83 (2010).
26. Sahu, A., Kasoju, N. & Bora, U. Fluorescence Study of the Curcumin–Casein Micelle Complexation and Its Application as a Drug Nanocarrier to Cancer Cells. *Biomacromolecules* **9**, 2905–2912 (2008).

27. Shukla, A., Narayanan, T. & Zanchi, D. Structure of casein micelles and their complexation with tannins. *Soft Matter* **5**, 2884–2888 (2009).
28. Kruif, C. G. (Kees) de, Anema, S. G., Zhu, C., Havea, P. & Coker, C. Water holding capacity and swelling of casein hydrogels. *Food Hydrocoll.* **44**, 372–379 (2015).
29. Farrell Jr., H. M., Malin, E. L., Brown, E. M. & Qi, P. X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **11**, 135–147 (2006).
30. Horne, D. S. Casein structure, self-assembly and gelation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **7**, 456–461 (2002).
31. Jöbstl, E., Howse, J. R., Fairclough, J. P. A. & Williamson, M. P. Noncovalent cross-linking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4077–4081 (2006).
32. Hasni, I. *et al.* Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols. *Food Chem.* **126**, 630–639 (2011).
33. Efrat Semo, E. K. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocoll.* 936–942 (2007). doi:10.1016/j.foodhyd.2006.09.006
34. Joe, B., Vijaykumar, M. & Lokesh, B. R. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44**, 97–111 (2004).
35. Pan, K., Luo, Y., Gan, Y., Baek, S. J. & Zhong, Q. pH-driven encapsulation of curcumin in self-assembled casein nanoparticles for enhanced dispersibility and bioactivity. *Soft Matter* **10**, 6820–6830 (2014).
36. Benzaria, A., Maresca, M., Taieb, N. & Dumay, E. Interaction of curcumin with phosphocasein micelles processed or not by dynamic high-pressure. *Food Chem.* **138**, 2327–2337 (2013).
37. Rahimi Yazdi, S. *et al.* Binding of curcumin to milk proteins increases after static high pressure treatment of skim milk. *J. Dairy Res.* **80**, 152–158 (2013).
38. Rahimi Yazdi, S. & Corredig, M. Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. *Food Chem.* **132**, 1143–1149 (2012).

Résultats et Discussion

39. Rahimi Yazdi, S. Changing the Structure of Casein Micelles to Improve the Delivery of Bioactive Compounds. (2012).
40. Haratifar, S. & Corredig, M. Interactions between tea catechins and casein micelles and their impact on renneting functionality. *Food Chem.* **143**, 27–32 (2014).
41. Horne, D. S. Steric stabilization and casein micelle stability. *J. Colloid Interface Sci.* **111**, 250–260 (1986).
42. Dalgleish, D. G. & Law, A. J. R. pH-Induced dissociation of bovine casein micelles. II. Mineral solubilization and its relation to casein release. *J. Dairy Res.* **56**, 727–735 (1989).
43. Banon, S. & Hardy, J. A Colloidal Approach of Milk Acidification by Glucono-Delta-Lactone. *J. Dairy Sci.* **75**, 935–941 (1992).
44. Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H. & Munro, P. A. Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. *J. Dairy Res.* **65**, 555–567 (1998).
45. Bourassa, P., Bariyanga, J. & Tajmir-Riahi, H. A. Binding Sites of Resveratrol, Genistein, and Curcumin with Milk α - and β -Caseins. *J. Phys. Chem. B* **117**, 1287–1295 (2013).
46. Marchin, S., Putaux, J.-L., Pignon, F. & Léonil, J. Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultras-small-angle x-ray scattering. *J. Chem. Phys.* **126**, 045101 (2007).
47. Jin, S. *et al.* Apoptotic effects of curcumin on human osteosarcoma U2OS cells. *Orthop. Surg.* **1**, 144–152 (2009).

3. Contribution de l'article

Le quenching de fluorescence à 344 nm a indiqué que les résidus tryptophane des micelles de caséine interagissent avec la curcumine. A pH 7,4 et 6,5, la constante de quenching K_{SV} est évaluée à $18,2 \pm 0,2 \times 10^4$ et à $18,8 \pm 0,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ respectivement, valeurs en corroboration avec celles de la littérature égales à $11,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (longueur d'excitation de 280 nm et d'émission de 342 nm) et $8,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (longueur d'excitation de 295 nm et d'émission de 344 nm), ou $7,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (longueur d'excitation de 280 nm et un spectre d'excitation de 300 à 450 nm)³³⁸. L'interaction non covalente entre la curcumine et la micelle de caséine pourrait être décrite comme un équilibre entre les molécules de curcumine libres et les complexes micelle de caséine-curcumine⁴⁵¹. La température a été variée car elle influence le complexe curcumine / micelle puisque des interactions hydrophobes entre les cycles phénoliques de la curcumine et les résidus d'acides aminés hydrophobes de caséines sont attendues. En outre, il est bien connu que la température dans une gamme comprise entre 10 et 40 °C influence les paramètres physico-chimiques des micelles de caséine tels que l'équilibre des minéraux et de la caséine soluble, l'hydratation et la taille des particules⁵⁰⁰. Il est alors pertinent d'étudier le comportement du complexe curcumine / micelle entre 20 et 35 °C. L'élévation de la température de 20 à 35 °C a conduit à une augmentation de la constante de liaison K_b d'environ 10 fois de $0,6$ à $6,57 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. L'augmentation de la température a favorisé les interactions hydrophobes entre la curcumine et la micelle de caséine. Dans cette étude, des constantes de liaison supérieures ont été obtenues à 35 °C contre 20 °C impliquant des interactions plus fortes entre la curcumine et la micelle de caséine avec l'augmentation de la température. L'accroissement de l'interaction hydrophobe a été proposé comme étant le contribuant majeur à l'augmentation des constantes de liaison.

Pour aller plus loin, une caractérisation multi-échelle de la structure de la micelle de caséine en présence de curcumine a été réalisée par SAXS et par DLS. L'addition de différentes concentrations de curcumine à la suspension de micelles n'a montré aucune influence sur les profils de diffusion SAXS et les distributions de taille DLS. Tous les signaux de diffusion et les distributions de taille étaient

Résultats et Discussion

superposés mettant en évidence que les structures interne et externe de la micelle de caséine n'ont pas été modifiées par l'addition de curcumine contrairement à ce que Shukla *et al.* (2009) ont décrit suite à l'addition de d'épigallocatechine gallate (EGCG)⁴⁹¹. En effet, l'addition de ce dernier aux micelles a conduit à une plus grande intensité diffusée à des angles faibles en raison d'une augmentation de la densité électronique globale de la micelle de caséine. En outre, la présence de tanins modifie de façon significative le profil de diffusion à des valeurs élevées de vecteurs d'ondes q . Ceci a été attribué à la chélation du calcium par l'EGCG qui a entraîné la disparition de l'inflexion à $0,07 \text{ \AA}^{-1}$. Nos résultats n'ont montré aucune modification sensible du signal de diffusion lors de l'addition de curcumine aux micelles de caséines. Ceci peut être expliqué par la différence de concentration de biomolécules avec Shukla *et al.* (2009)⁴⁹¹ qui est environ 1000 fois plus élevée que la concentration de la curcumine de la présente étude et que l'EGCG est partiellement soluble dans l'eau contrairement à la curcumine. Plus récemment, Haratifar et Corredig (2014) ont constaté que jusqu'à 0,08 mg EGCG peuvent être liés par mg de protéine de lait³²⁸. De telles concentrations élevées n'ont pas été testées avec la curcumine dû au fait que la gamme de concentration testée (5-50 μM) a été choisie en relation avec les concentrations auxquelles elle présente les activités biologiques les plus importantes, issues notamment d'études de son influence sur des cellules de cancer des os⁵⁰¹ ou sur des cellules d'ostéosarcome U2OS²²⁰.

Les résultats SAXS et DLS suggèrent ainsi que la micelle est capable de véhiculer la curcumine sans changement de leur structure globale.

La transition sol-gel des micelles de caséines acidifiées et chargées de curcumine a été étudiée par diffusion multiple de la lumière et par détermination des modules viscoélastiques. L'addition de curcumine n'a pas affecté la gélification à 20 °C et à 35 °C. En effet, l'agrégation des particules dans la phase de pré-gélification a été suivie et le pourcentage de lumière rétrodiffusée (ΔBS) égale à 13 % et 20 % à respectivement 20 et 35 °C n'est pas modifié en présence de curcumine. L'ajout de curcumine n'a pas non plus influencé le pH au point de gel qui est égal à 4,4 ni le temps de gélification qui est égal

à 145 min. De plus, la force du gel reste identique avec l'ajout de curcumine et atteint 25 Pa à 20 °C et 40 Pa à 35 °C. Avec l'acidification en dessous du pH isoélectrique des caséines, le renforcement des interactions hydrophobes était attendu comme résultat de la neutralisation de la charge de la protéine et de l'hydratation faible de la micelle de caséine⁵⁰⁰ contrairement à la curcumine qui restent en forme neutre⁵⁰².

Ce travail a donc permis de confirmer l'interaction des micelles de caséines avec la curcumine par spectroscopie de fluorescence. Les expériences de diffusion des rayons X et de diffusion de la lumière n'ont révélé aucune modification des structures interne et externe de la micelle par la curcumine. La gélification acide n'a pas été affectée par l'addition de curcumine aux deux températures étudiées (20 et 35 °C). Ainsi, la micelle de caséine est une structure capable d'encapsuler une molécule hydrophobe telle que la curcumine tout en gardant ses propriétés techno-fonctionnelles notamment son aptitude à la gélification. Sachant que la curcumine interagit avec les micelles de caséines sans modifier les propriétés structurales et technofonctionnelles de cette dernière, et que les MC sont les protéines lactiques de base permettant la formation d'un gel de type yaourt, il serait intéressant d'étudier l'interaction de la curcumine avec les bactéries lactiques du yaourt pour une éventuelle application technologique et une production d'un yaourt à valeur ajoutée.

Publication 2 : L'étude des interactions de la curcumine avec les caséines micellaires et l'enveloppe cellulaire des bactéries lactiques et l'évaluation de l'effet de son ajout sur la formation de gel de type yaourt.

1. Introduction

Malgré toutes les vertus de la curcumine, sa faible solubilité dans l'eau implique une mauvaise biodisponibilité après consommation par voie orale limitant ainsi son incorporation dans les matrices alimentaires¹⁻³. Pour y faire face, plusieurs méthodes ont été développées avec diverses matrices pour encapsuler et vectoriser la curcumine. Ces approches reposent principalement sur les liposomes⁴, les nanoémulsions⁵, les billes d'alginate⁶ et les micelles de caséines⁷⁻¹⁰. Dans l'article précédent, l'interaction entre la curcumine et les résidus de tryptophane des micelles de caséines a été démontrée dans des conditions abiotiques⁹. Cette interaction n'influçait pas la structure de la micelle ni ses propriétés technofonctionnelles telle que la gélification.

La curcumine présente de nombreuses propriétés antioxydantes, antiinflammatoires, anticancéreuses, neuro-protectrices¹¹⁻¹⁶. De plus, ce composé phénolique présente une activité antibactérienne contre certaines bactéries Gram + et Gram -¹⁷. Elle inhibe notamment la croissance ou provoque la mort de nombreuses bactéries telles que *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus sp.*, *Staphylococcus epidermidis* et *Enterococcus sp.*^{18,19}. Cette activité antibactérienne serait liée à la similarité de structure que présente la curcumine avec celle des enveloppes bactériennes²⁰. De plus, la curcumine inhibe la polymérisation de la FtsZ de *Bacillus subtilis* et d'*Escherichia coli*²¹, une protéine impliquée dans la division cellulaire.

En outre, des études ont évalué l'interaction entre les composés phénoliques et les bactéries lactiques dans les aliments tels que le yaourt. En effet, les extraits de thé vert contenant notamment des catéchines et de la quercétine ont doublé la croissance des *Lactobacillus spp.* Et *Streptococcus spp.* et ont augmenté l'activité antioxydante du yaourt pendant la fermentation. De plus, l'addition d'extraits

de *pleurotus ostreatus* contenant des bioactifs tels que les composés phénoliques a légèrement affecté la croissance des deux bactéries, ce qui a entraîné une diminution significative du temps d'acidification. Le gel formé présentait une fermeté inférieure qui pouvait être attribuée à l'augmentation de l'eau dans le système de gel en raison de la diminution de la synérèse. Dans une étude antérieure, la curcumine mélangée avec de la bixine à 0,04% (p / v) utilisée comme colorant alimentaire n'a montré aucun effet antimicrobien sur *Lactobacillus bulgaricus* mais a réussi à inhiber la croissance de *Streptococcus thermophilus*. Toutes ces études ont généralement porté sur la façon dont la curcumine pourrait influencer la croissance des bactéries lactiques après la formation du yaourt sans mettre l'accent sur les interactions réelles entre la curcumine et *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. De plus, aucune étude n'a traité l'adsorption de curcumine sur l'enveloppe des bactéries lactiques du yaourt ni sa répartition entre les deux bactéries et d'autres composants présents dans le yaourt comme les caséines micellaires

Sachant que la curcumine interagit avec les micelles de caséines sans impacter ses propriétés de gélification, l'étape suivante serait la prise en compte de ces bactéries lactiques dans le milieu modèle étudié. Ainsi, il est nécessaire d'étudier l'interaction de la curcumine avec les bactéries lactiques du yaourt dans le même milieu modèle pour mieux comprendre comment la curcumine pourrait interagir plus tard dans un milieu plus complexe tel que le yaourt qui pourrait à terme avoir une valeur ajoutée grâce aux polyphénols.

Le but de cet article est d'étudier les interactions curcumine-bactéries lactiques. La microscopie à épifluorescence a été utilisée pour visualiser qualitativement les interactions entre ces deux composants puis la fluorescence et le quenching de fluorescence des résidus tryptophane ont été mis en œuvre pour aborder quantitativement ces interactions. De plus, le test MATS (microbial adhesion to solvents) a été employé pour comprendre le rôle du caractère « acide-base » de l'enveloppe bactérienne dans cette interaction. L'activité antibactérienne de la curcumine a été aussi évaluée en parallèle pour déterminer si les concentrations utilisées dans cette étude influençaient la croissance

Résultats et Discussion

des bactéries. Enfin, les propriétés de gélification du lait avec la curcumine ont été étudiées en présence de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* par diffusion multiple de la lumière et par des mesures rhéologiques afin d'évaluer les modifications qui peuvent surgir dans une matrice complexe dans laquelle protéine, bactérie et bioactif coexistent.

2. Article: The study of curcumin interaction with micellar casein and lactic acid bacteria cell envelope.

Article soumis dans LWT (2017)

Aya N. Khanji,^{a, b} Florentin Michaux,^a Dominique Salameh^b, Toufic Rizk^b, Sylvie Banon^a, Jordane Jasniewski^{a*}

*corresponding author.

Abstract

Curcumin interaction with micellar caseins (MC), *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* (Lb) and *Streptococcus thermophilus* (St) and its influence on the acid gelation were investigated. Epifluorescence microscopy evidenced the adsorption of curcumin on bacteria surfaces and its transfer from MC to bacteria. Fluorescence spectroscopy of curcumin and fluorescence quenching of caseins variations in presence of bacteria and MC were evaluated. The interaction between curcumin and St and Lb was confirmed due to the decrease of curcumin fluorescence intensity from 1.7 A.U to 1.20 A.U and to 1.40 A.U, respectively. The transfer of curcumin between MC and bacteria was confirmed. The curcumin interacted more with St than with Lb envelope with a fluorescence intensity decrease from 6.20 ± 0.02 A.U to 5.20 ± 0.08 A.U and to 4.60 ± 0.08 A.U, respectively. It also showed that St was more hydrophobic than Lb bacterial envelope leading curcumin to interact more with Streptococcus surface. Curcumin adsorption did not affect Lb and St growth nor its acidification rate of milk. The acid gelation study led to a typical gel yoghurt-like formation. For the first time, it was demonstrated that curcumin interacted with lactic bacteria without modifying its growth and milk acidic gelation property.

Keywords

Lactic acid bacteria; Curcumin; Interaction; Fluorescence; Yoghurt

1. Introduction

The search for a compound with numerous therapeutic properties and almost no side effects on the human body has made researchers focus their attention on curcumin, a yellow pigment derived from the rhizome of *Curcuma longa* and one of the primary ingredients in turmeric and curry powders.

Curcumin is chemically (1E, 6E)-1, 7-bis (4-hydroxy-3- methoxyphenyl) hepta-1, 6-dienne-3, 5- dione. Its structure consists of two ortho methoxylated phenols linked with a β -di-ketone function, and they are all conjugated. It has a rigid and electron-rich structure and has pKa1, pKa2, and pKa3 values of respectively 7.8, 8.5, and 9.0, for three acidic protons (Tønnesen, Másson, & Loftsson, 2002). It has low water-solubility and its chemical instability lead to a poor oral bioavailability (Ahmed, Li, McClements, & Xiao, 2012; Fu et al., 2014; Heger, van Golen, Broekgaarden, & Michel, 2013). These limitations could be overcome by encapsulating it within colloidal delivery systems (McClements, 2012; Patel & Velikov, 2011). Different types of delivery systems have been investigated to enhance curcumin dispersibility in water and bioavailability including zein particles (Gomez-Estaca, Balaguer, Gavara, & Hernandez-Munoz, 2012; Pan, Tikekar, Wang, Avena-Bustillos, & Nitin, 2015; Patel, Hu, Tiwari, & Velikov, 2010), nanoemulsions (Lu, Cao, Ho, & Huang, 2016), alginate beads synthesis (Song, Wang, Qian, Zhang, & Luo, 2012), liposomes (Niu et al., 2012) and casein micelles (Esmaili et al., 2011; Hassan et al., 2015; Khanji et al., 2015; Pan, Zhong, & Baek, 2013). In a previous paper, we presented the ability of micellar casein (MC) to interact with curcumin *via* its tryptophan residues in abiotic conditions (Khanji et al., 2015). The interactions did not influence the structure of the MC nor its technofunctional properties such as gelation.

Moreover, several preclinical studies showed that curcumin modulates numerous molecular targets and exerts antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, anticancer, and neuroprotective activities (Aggarwal, Kumar, Bharti, & others, 2003; Esatbeyoglu et al., 2012; Gryniewicz & Slifirski, 2012; Gupta et al., 2011; Indira Priyadarsini, 2013; Wilken, Veena, Wang, & Srivatsan, 2011). In fact, it has been observed that curcumin possesses antibacterial properties against a number of Gram-

positive and Gram-negative bacteria (Mishra, Narain, Mishra, & Misra, 2005). It suppresses the growth of several bacteria like *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, etc. and kills several pathogenic Gram-positive bacteria such as *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus* that cause infections like skin diseases, pneumonia, meningitis and urinary tract infections in human beings (Bhavani Shankar & Sreenivasamurthy, 1979; Duvoix et al., 2005; Hu, Huang, & Chen, 2013). Recently, studies showed that curcumin bioconjugates minimum inhibitory concentration (MIC) ranges from 0.09 to 0.67 μM against Gram positive cocci as well as Gram negative bacilli (Singh et al., 2010). This antibacterial activity is due to the structure of the curcumin similarity with the bacterial cell wall that possesses amino acids and lipids (Singh et al., 2010). Moreover, it has been demonstrated that curcumin inhibits polymerization of the protein FtsZ, in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, an essential cytoskeletal protein for cell division (Kaur, Modi, Panda, & Roy, 2010). The curcumin IC_{50} value against *B. subtilis* and *E. coli* FtsZ was reported as 30 μM and 58 μM respectively and its MIC to 100 μM for both bacteria (Rai, Singh, Roy, & Panda, 2008; Wang et al., 2017).

Furthermore, several studies investigated the interaction between phenolic compounds and lactic acid bacteria in food such as yoghurt. In fact, green tea extracts containing especially catechins and quercetin doubled the *Lactobacillus spp.* and *Streptococcus spp.* growth and increased the antioxidant activity of yoghurt during fermentation (Amirdivani & Baba, 2015). Moreover, the addition of pleurotus ostreatus extract containing bioactives such as phenolic compounds, affected slightly the growth of both bacteria which lead to a significant decrease of the time of acidification reaching a pH of 4.6 (Pelaes Vital et al., 2015). The formed gel presented a lower firmness that could be attributed to increased water in the gel system due to the decreased syneresis. In an earlier study, curcumin with bixin 0.04 % (w/v) used as a food colorant has shown no antimicrobial effect on *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* (*L. delbrueckii*) but has inhibited the growth of *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) (Vinderola, Costa, Regenhardt, & Reinheimer, 2002). All of these studies focused generally on how curcumin could influence the growth of lactic bacteria after yoghurt formation

Résultats et Discussion

without emphasizing on the real interactions occurring between curcumin and lactic acid bacteria. No studies have treated curcumin adsorption to *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* cell envelope nor its distribution between both bacteria and other components present in yoghurt such as MC.

Knowing that curcumin 0.018 % (w/v) could interact with MC without modifying the technofunctional properties of the micelle (Khanji et al., 2015) and that our final aim was to be able to produce value-added yoghurt in which acidification is driven by the presence of lactic acid bacteria, the following step consisted in taking into account the presence of these living cells in the medium. Thus, it was necessary to study the interaction between the curcumin 0.018 % (w/v) and the lactic bacteria in the same model medium to get one step closer in understanding how curcumin might react later on in a more complex matrix such as a yoghurt.

The aim of this study was to investigate if curcumin 0.018 % (w/v) interacted with *L. delbrueckii* and *S. thermophilus*. Epifluorescence microscopy was employed to visualize qualitatively the interaction between both lactic acid bacteria and curcumin. To determine these interactions quantitatively, direct steady state fluorescence and tryptophan quenching were employed to evaluate the extent of curcumin- *L. delbrueckii* and curcumin- *S. thermophilus* interactions. Moreover, microbial adhesion to solvents test helped in understanding how curcumin interacted with bacteria depending on its cell wall constitution. Antimicrobial activity of the curcumin against both bacteria was also evaluated. Finally, the gelation properties of milk were also investigated, in presence of both curcumin, *L. delbrueckii* and *S. thermophilus*, by multiple light scattering and rheological measurements in order to evaluate the modifications that might occurred in a complex matrix including protein, bacteria and a bioactive molecule.

2. Material and methods

2.1. Chemical and reagents

The curcumin (≥ 65 % purity) was obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The native-like phosphocasein micelles (MC) used in this study were prepared by milk microfiltration and

diafiltration using milk ultrafiltrate (Promilk 872 B, Ingredia Dairy Ingredients, Arras, France), prior to stabilization in the powder form by spray-drying. The powder contained 95 % (w/w) dry solids and, on a dry weight basis, 87 % total proteins (about 80 % phosphocaseins), 7.3 % minerals, 5 % lactose, and 0.8 % fat. All other chemicals, of analytical grade, were provided by Carlo Erba (Milan, Italy). Skim milk powder was purchased from Oxoid Microbiology Products-Thermo Scientific (United Kingdom).

2.2. Bacterial strains and culture conditions

Both *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* (DSM 20081) and *Streptococcus thermophilus* (CNRZ 368) were maintained in MRS broth supplemented with 20 % (v/v) of glycerol at -20 °C. To prepare bacterial cells for the experiments, they were activated twice in MRS broth and incubated 48 h at 37 °C and 42 °C for *Lactobacillus* and *Streptococcus species*, respectively. After activation, the cells were harvested by centrifugation at 4500 *g* at 4 °C for 15 min, washed three times with physiological sterile water and resuspended in PBS. Optical density of bacterial cell suspension in PBS was adjusted to a 0.2 value at 600 nm.

Concerning the MC and skimmed milk gelation properties, both rheological and multiple light scattering measurements were evaluated by using an industrial mix of *L. delbrueckii* and *S. thermophilus*, *i.e.* Yomix (5 % w/v in milk) purchased from Danisco (France).

2.3. Samples preparation

Stock solutions of curcumin were prepared in ethanol (96 %) at a final concentration of 1.0 mg mL⁻¹ and stored protected from light at 4 °C. Phosphate Buffered Saline (PBS) solution (pH 7.4) was prepared with ultrapure water and contained for one liter: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄. PBS buffer filtration through a 0.2 µm polyethersulfone membrane (Millipore) was performed before use. Micellar caseins 50 g.L⁻¹ were dispersed in PBS buffer (pH 7.4) and stirred overnight at 20 °C in order to get maximal protein hydration and stabilization. For the rheological and multiple scattering measurements, skimmed milk containing 10 % (w/w) of dry matter was prepared and sterilized for 5

Résultats et Discussion

min at 120 °C. The use of skimmed milk for rheological measurements instead of MC was essential for *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* growth and acidification of the medium.

2.4. Epifluorescence microscopy of *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* in presence of curcumin

Live cells were imaged by means of epifluorescence microscopy through a Leica DMRB microscope (Germany) and with an H3 Micfilter. Image capturing was carried out by a monochrome CCD COHU camera and was captured at magnification of x 40 and x 100 (with oil immersion) with an ocular magnitude of x10.

In order to observe how curcumin was dispersed in lactic bacteria suspensions, pure culture in PBS (final OD_{600nm} equaled to 1.0) of *L. delbrueckii* and *S. thermophilus*, and a mixture of both were vortexed for 30 s with curcumin at 5 µM (in ethanol). For each condition, a smear was made by a 50 µL calibrated and sterilized loop on a glass slide. After drying, the sample was observed at a magnification of x 100 (with oil immersion) with an ocular magnitude of x 10.

In order to observe how curcumin can diffuse from MC to bacteria, a mixture of 8.9 µM micellar caseins in PBS and 5 µM curcumin (in ethanol) was vortexed for 1 min and smeared on a glass slide. Another smear containing only lactic bacteria suspended in PBS was made on the same slide adjacently so as to observe the contact zone between the two at a magnification of x 40 and x 100 (with oil immersion) with an ocular magnitude of x10.

2.5. Fluorescence spectroscopy

The MC quenching was carried out with a FLX spectrofluorimeter (Safas, Monaco) at 20 °C. Quenching experiments were performed in the following conditions: MC at 8.9 µM in PBS, curcumin at 5 µM in ethanol and *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* suspensions at final OD_{600nm} equal to 0.2. The emission spectra were recorded with a quartz cuvette (1 cm path length) from 300 to 450 nm at an excitation

wavelength of 280 nm. Slit widths were 5 nm for both excitation and emission. Ethanolic curcumin solution and bacteria suspensions free from MC were used as controls.

To be able to determine the influence of *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* addition on MC quenching, curcumin solutions (5 μM in ethanol) and MC dispersions (8.9 μM in PBS) were vigorously mixed for 2 min in a 5 mL-glass tube, then the bacteria (final $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.2$) was added. The mixture was also vigorously mixed for 2 min and was transferred into quartz cuvette for analysis. The same experiment was reiterated with a different addition order: curcumin was first added to bacteria then MC suspension was added.

Each experiment was performed in triplicate and fluorescence intensity was normalized with a 100 % intensity for MC control at 344 nm.

Curcumin fluorescence was measured at 5 μM in the presence of 8.9 μM MC concentration and an optical density at 600 nm of *L. delbrueckii* or *S. thermophilus* of 0.2. The emission spectra were recorded from 450 to 700 nm with an excitation wavelength of 420 nm. The slit widths used for curcumin fluorescence were 3 and 5 nm for excitation and emission, respectively. MC suspensions and bacteria solutions without curcumin were used as controls.

2.6. Microbial Adhesion To Solvents (MATS)

This partitioning method was based on the comparison between microbial cell affinity to a monopolar solvent and an apolar solvent. The monopolar solvent can be acidic (electron accepting) or basic (electron donating) but both solvents must have similar Van der Waals surface tension components. On this basis, to determine acidic and basic properties of microbial cells using the MATS method, the following pairs of solvents have been selected (Oss, Chaudhury, & Good, 1989; Snyder, 1974; Vernhet & Bellon-Fontaine, 1995):

- chloroform, an acidic solvent which exhibits negligible basic character when pure, and hexadecane;
- diethyl ether, a strongly basic solvent, and hexane;

Résultats et Discussion

- ethyl acetate, a strongly basic solvent, and decane.

Hexadecane, hexane and decane are apolar n- alkanes. All solvents employed in this study were obtained from Sigma and were analytical grade.

Experimentally, a suspension containing approximately 10^8 cfu.mL⁻¹ (optical density of 0.5 at 600 nm for both *L. delbrueckii* and *S. thermophilus*) in 1.2 mL PBS (pH 7.4) was mixed for 90 s with 0.2 mL of each solvent. The mixtures were allowed to stand for 15 min to ensure complete separation of the two phases before a sample (1 ml) was carefully removed from the aqueous phases and the optical densities were measured at 600 nm. The percentage of bound cells was subsequently calculated by

$$\% \textit{ adherence} = (1 - A/A_0) \times 100 \text{ (Equation 1)}$$

where A_0 was the optical density measured at 600 nm of the bacterial suspension before mixing and A was the absorbance after mixing.

2.7. Antibacterial activity of curcumin and encapsulated curcumin

The MRS medium was inoculated with the target strain *L. delbrueckii* or *S. thermophilus* in order to have an optical density of 0.01 ($\lambda = 600$ nm). Then a volume of 12 mL of medium containing the bacteria was deposited in a Petri dish and placed at 4 °C for 30 min. A hole with a diameter of 5 mm was punched aseptically with a sterile borer or a tip, within the solidified MRS agar and 25 μ L of the curcumin in ethanol at 2 mM, encapsulated curcumin in MC with a concentration of 5 μ M (for 8.9 μ M of MC) and ethanol (negative control) were introduced into different wells. Then agar plates were incubated at 4 °C overnight to allow to the antimicrobial agent to diffuse in the agar medium, then incubated at 37 °C for *L. delbrueckii* or 42 °C for *S. thermophilus*, respectively, to verify the inhibitory activity on the growth of the tested strains.

2.8. Multiple light scattering for milk gelation

The aggregation of particle dispersions in skimmed milk after Yomix addition (5 % w/v) was followed by multiple light scattering measurements using a Turbiscan Classic MA2000 apparatus (Formulation,

France) using a pulsed near-infrared light source ($\lambda = 850$ nm). The final concentration of curcumin equaled to $5 \mu\text{M}$ and the final concentration of ethanol in skimmed milk did not exceed 2 % (v/v). Measurements of the backscattered intensities all along the sample have then been performed upon time. One scan was recorded every 5 min after Yomix addition (t_0). The first scan recorded at t_0 was subtracted from the following scans in order to highlight the system evolution with time using Turbisoft software. Then, the relative percentage of backscattered intensity (ΔBS) upon sample height was reported. The evolution of the average backscattered intensity with time has also been plotted using this software. The entire Turbiscan device was placed in an oven to perform the measurements at 42°C , the corresponding optimal temperature for both bacteria to grow and acidify the medium.

2.9. Viscoelastic measurements of acid milk gelation

The influence of acidification on curcumin–MC interactions was investigated under kinetic conditions at 42°C . Yomix (5 % (w/v)) was gently stirred in skimmed milk (10 % w/w dry matter). Curcumin ($5 \mu\text{M}$) was added and the mixture was gently stirred for 3 min. Controls were evaluated by adding Yomix to an Ethanol-MC mixture with the same ratio and at the same temperature. 20 mL of milk-Yomix-curcumin and milk-Yomix control aliquots were immediately transferred into the gap of coaxial cylinders (DIN C25) of the Kinexus rheometer (Malvern Instruments, UK). The sol–gel transition and the development of the gel structure were followed using 0.1 % shear strain and 1.0 Hz frequency at controlled temperature of 42°C . The time at which the storage modulus (G') became greater than 1 Pa was considered as the gelation point. Each test was performed in duplicate. All the results were analyzed using ANOVA (Excel Microsoft) with a model including one effect (presence of curcumin).

3. Results and discussion

3.1. Epifluorescence microscopy observation of *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* in presence of curcumin

The interactions between curcumin and *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* were observed via epifluorescence microscopy (Fig.1). No fluorescence was observed when *L. delbrueckii* (Fig 1C) or *S. thermophilus* (Fig.1.D) were added to a glass slide without curcumin. They were considered as negative controls. When curcumin was added to *L. delbrueckii* or *S. thermophilus*, fluorescence of curcumin on *L. delbrueckii* (Fig.1.A₂-A₃) and *S. thermophilus* (Fig.1. B₂-B₃) was detected. The curcumin fluorescence on these bacteria confirmed that both components interact, knowing that no fluorescence was observed when curcumin was in the media alone. This result corroborated with a previous study where no fluorescence was detected when curcumin was alone in the media (Khanji et al., 2015).

The interaction between curcumin and *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* was qualitatively confirmed via epifluorescence. It was important to determine quantitatively this interaction via fluorescence and quenching spectroscopy in presence of micellar caseins.

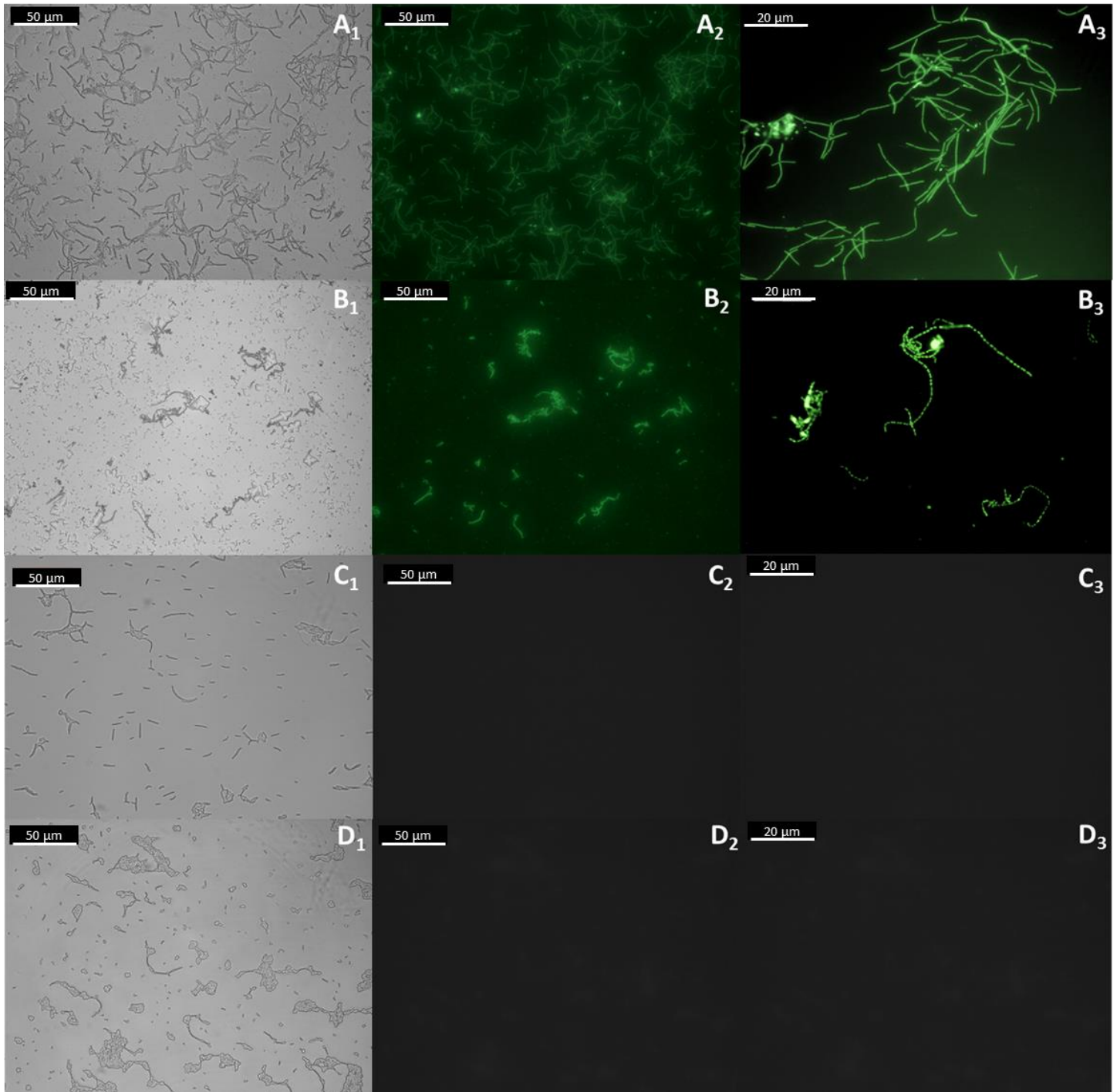


Figure 1. Epifluorescence images of *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* at a magnitude of x40 (A₁- A₂- B₁- B₂ - C₁- C₂- D₁- D₂) and x100 (A₃-B₃-C₃-D₃). *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* with curcumin (A) and without curcumin (C) under white light (A₁-C₁) and fluorescent light (A₂-A₃-C₂-C₃). *Streptococcus thermophilus* with curcumin (B) and without curcumin (D) under white light (B₁-D₁) and fluorescent light (B₂-B₃-D₂-D₃).

3.2. Study of MC-bacteria, curcumin-bacteria and MC-bacteria-Curcumin interactions *via* fluorescence

The interactions between MC and *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* were first investigated using fluorescence properties of MC (Fig.2). The interactions observed in Fig.2 are correlated with a hypothetic scheme in Fig.4.

When *L. delbrueckii* or *S. thermophilus* was added to MC suspensions, fluorescence quenching at 344 nm occurred, indeed the fluorescence intensity decreased from 6.20 ± 0.02 A.U (Arbitrary Units) (100 %) to 4.60 ± 0.08 A.U (74 %) for *L. delbrueckii* (Fig2.A) and from 6.20 ± 0.02 A.U (100 %) to 5.20 ± 0.08 A.U for *S. thermophilus* (84 %)(Fig2.C). When the mixture was centrifuged and the fluorescence of the supernatant was measured (Fig2.B-D), the fluorescence intensity of MC and MC-bacteria was not strongly different: 6.20 A.U ± 0.02 (100%) against 5.80 ± 0.10 A.U for *L. delbrueckii* (94 %) and against 6.70 ± 0.10 A.U (108 %) for *S. thermophilus*. This could be explained by a slight turbidity caused by *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* addition at a final OD of 0.2.

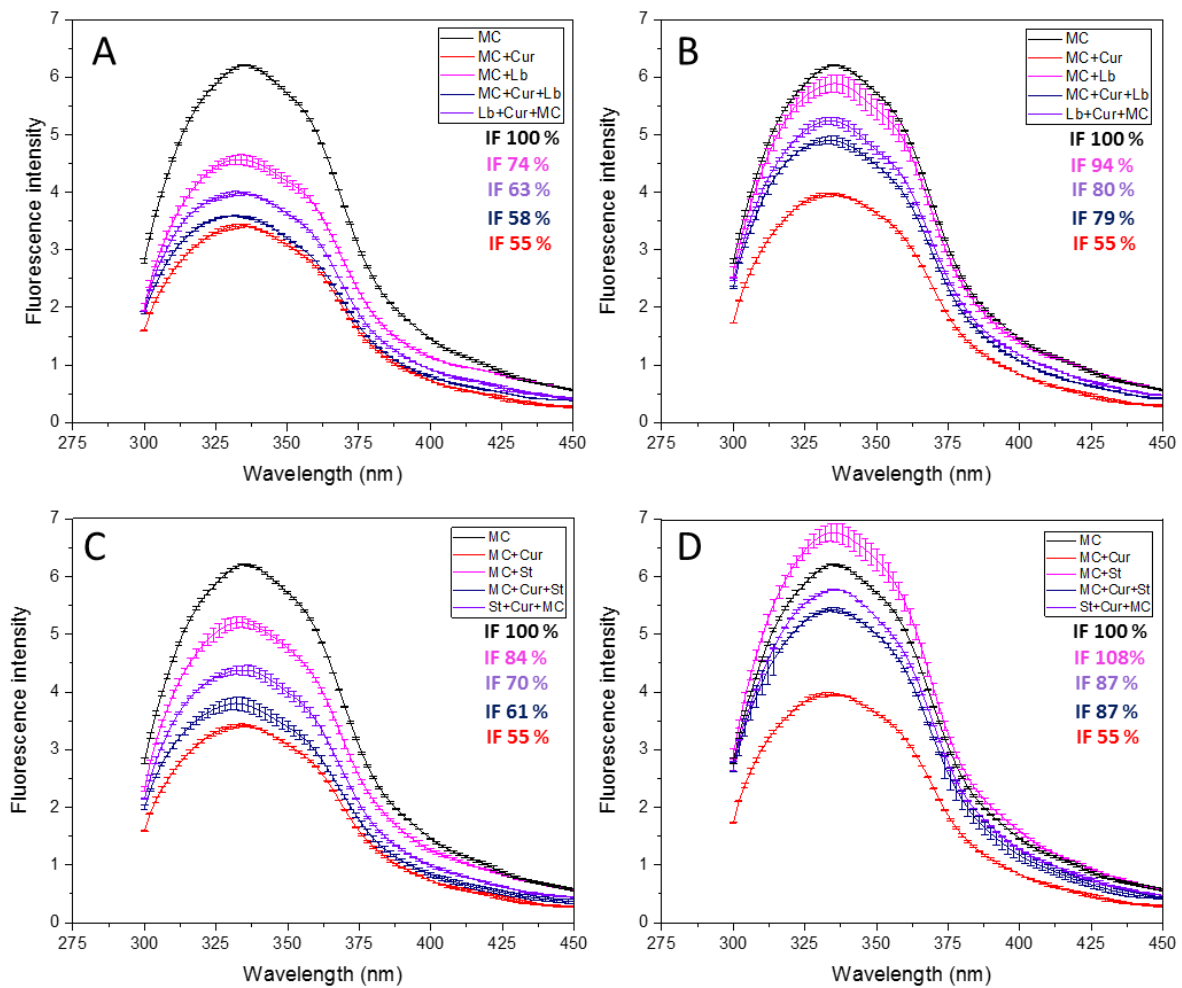


Figure 2. Fluorescence quenching of 8.9 μM casein micelles for an emission spectra going from 300 to 450 nm at ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) with a 5 μM curcumin concentration and an optical density at 600 nm of *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* (A-B) and *Streptococcus thermophilus* of 0.2 (C-D). (A,C). Before centrifugation (B,D). After centrifugation. The fluorescence intensity has been expressed in percentage of the control (IF MC = 100 %)

Fluorescence quenching was also evaluated at 344 nm when *L. delbrueckii* or *S. thermophilus* was added to the mixture of MC and curcumin. The quenching observed was a quenching reflecting the interactions of curcumin with MC, curcumin with bacteria, MC with bacteria and finally the interactions between the three components altogether. The fluorescence intensity of MC-curcumin was evaluated to $3.40 \pm 0.02 \text{ A.U}$ (55 %) before and after centrifugation and is illustrated by (Fig.4.A.1). On the other hand, the fluorescence intensity noted when *L. delbrueckii* or *S. thermophilus* were added to MC-curcumin was $3.60 \pm 0.01 \text{ A.U}$ (58 %) for *L. delbrueckii* and 3.80 ± 0.10 (61 %) for *S. thermophilus* before centrifugation. The presence of bacteria led to a lower quenching of MC illustrated by (Fig.4.A.2). When

Résultats et Discussion

the mixture was centrifuged and bacteria were eliminated, the fluorescence intensity of the supernatant regained 4.90 ± 0.07 A.U (79 %) for *L. delbrueckii* and 5.40 ± 0.03 A.U (87 %) for *S. thermophilus* which was higher than the fluorescence of MC-Curcumin alone. This could confirm that lower quenching was due to bacteria presence and that the interactions of bacteria-Curcumin were stronger than MC-Curcumin. Thus, curcumin transferred from MC to bacteria cell envelope. This transfer is illustrated in (Fig.4.A.3) and was correlated with the yellow pellets corresponding to *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* with curcumin adsorbed to its cell envelope. This hypothesis was confirmed when the order of addition was modified. When curcumin was first added to bacteria then MC was added, the fluorescence intensity decreased to 3.90 ± 0.03 A.U (63%) for *L. delbrueckii* and 4.40 ± 0.08 A.U (70 %) for *S. thermophilus* before centrifugation. This quenching before centrifugation confirmed that curcumin interacted with bacteria and is shown in (Fig.4.B.2) and (Fig.4.C.2). We noticed that the quenching was less pronounced in this order of addition. This could be explained by a steric hindrance that could limit interactions of MC with a curcumin-charged bacteria. When the mixture was centrifuged and *L. delbrueckii* or *S. thermophilus* eliminated, the fluorescence intensity was back to 4.90 ± 0.08 A.U (80 %) for *L. delbrueckii* and 5.40 ± 0.01 A.U (87 %) for *S. thermophilus* which showed that curcumin molecules were transferred from MC to bacteria (Fig.4.B.3-Fig.4.C.3). And so, when curcumin was added to the medium, a certain equilibrium was installed: curcumin interacted with MC and *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* with an adsorption preference to bacteria surfaces.

The interactions between curcumin and *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* were investigated also from curcumin fluorescence. The intrinsic fluorescence emission spectra of 5 μ M curcumin ($\lambda_{exc} = 420$ nm) at a concentration of 8.9 μ M of MC and an optical density at 600 nm of *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* of 0.2 is presented in Figure 3.

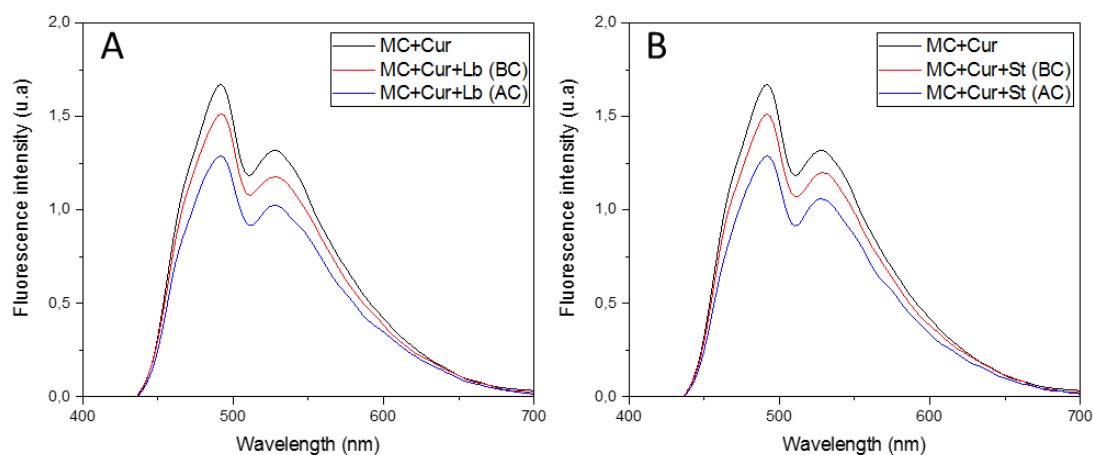


Figure 3. Intrinsic fluorescence emission spectra of 5 μM curcumin in presence of 8.9 μM of MC and an optical density of 0.2 of LAB. (A). *Lactobacillus bulgaricus* (B) *Streptococcus thermophilus*. (BC): Before centrifugation (AC): After centrifugation. All data were noted with a standard deviation of 5 %.

The maximum fluorescence intensity of curcumin in presence of MC was 1.70 A.U at $\lambda = 492$ nm and was considered as the reference. When bacteria was added to the MC-Curcumin mixture, the fluorescence intensity decreased to 1.50 A.U before centrifugation. This slight variation could be attributed to the transfer of curcumin from MC to the bacteria. In fact, when curcumin leaves MC, it passes through the medium to reach bacteria cell envelope. During this time, curcumin is alone in the medium and does not fluoresce. This is correlated with the slight decrease of fluorescence intensity when bacteria is added. The result was also corroborated with results shown in Fig.4.A.2. Moreover, after centrifugation and when bacteria were eliminated, the fluorescence intensity decreased to 1.20 A.U for *L. delbrueckii* and 1.40 A.U for *S. thermophilus*. This decrease suggested that curcumin interacted with bacteria and that curcumin-charged bacteria were eliminated *via* centrifugation. In fact, after centrifugation, the pellet containing bacteria was yellow confirming the fact that curcumin interacted with bacteria and was centrifuged with it. This was in corroboration with the results presented in Fig.4.A.3. Curcumin fluorescence was expected to be more important for *S. thermophilus* than for *L.delbrueckii*. And so, it is important to note that the signal for both bacteria was similar possibly because of a curcumin saturation.

Résultats et Discussion

All of these quenching and fluorescence intensity data led to a suggested interaction summary sketch that is represented in Figure 4.

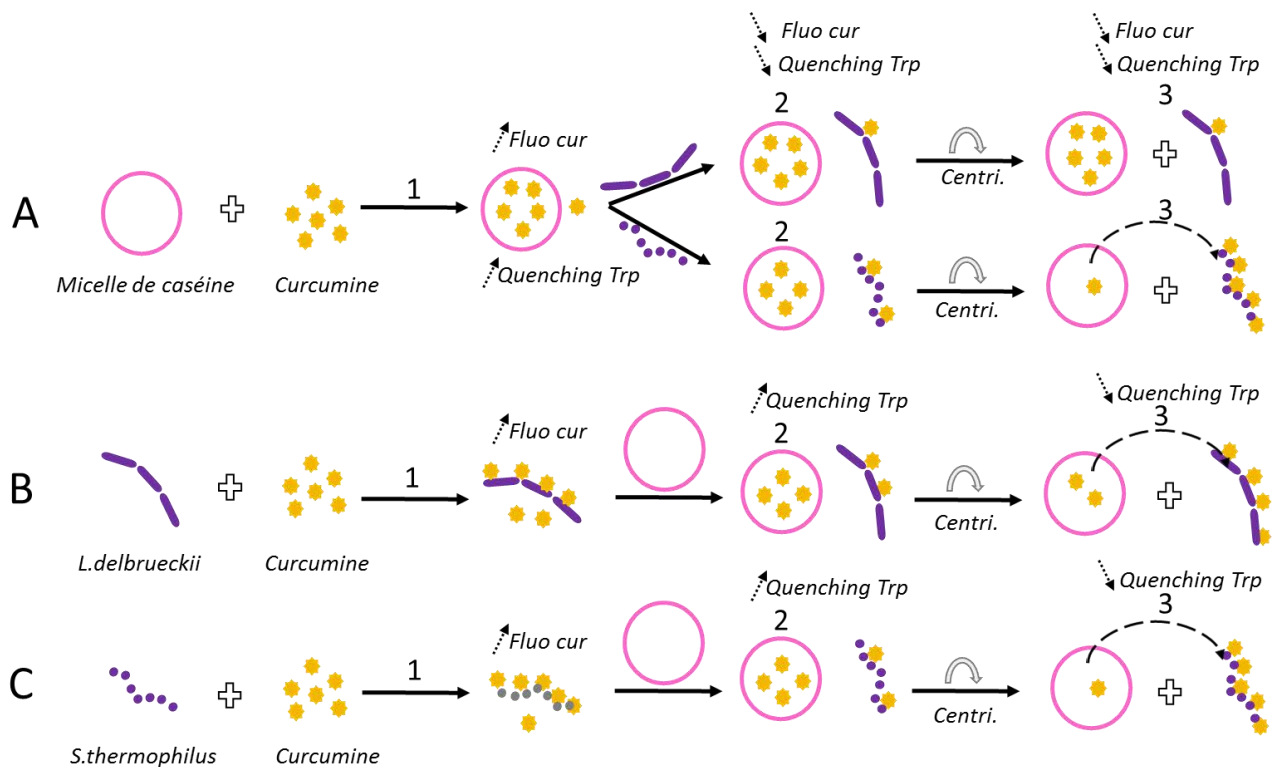


Figure 4. Hypothesis for the interaction appearing between Curcumin and LAB. The pink circles represent the micellar casein that should be normally smaller than the *Lactobacillus delbrueckii* bugaricus (purple bacilli) and *Streptococcus thermophilus* (purple cocci). Size of the both bacteria was lowered to be able to visualize the interactions with curcumin (yellow diamonds). A, B and C show different pathways depending of the order of addition of the components. Step1 represents the first contact between the first two components. Step 2 represents the addition of the third component before centrifugation. Step 3 represents the final equilibrium between the three components after centrifugation. The black dotted arrows represent an increase or decrease of fluorescence and quenching. The black dashed arrow represent the transfer of curcumin from MC to bacteria cell envelope.

3.3. Epifluorescence microscopy observation of curcumin distribution between *L. delbrueckii* and *S. thermophilus*

The fluorescence spectroscopy revealed different fluorescence intensities relative to each bacteria. To visualize how curcumin interacted with both bacteria in the same medium, a mixture of *S thermophilus* and *L. delbrueckii* with an optical density of 1 at 600 nm each and curcumin at 5 μ M was vortexed for 30 s and observed *via* epifluorescence microscopy (Figure 5).

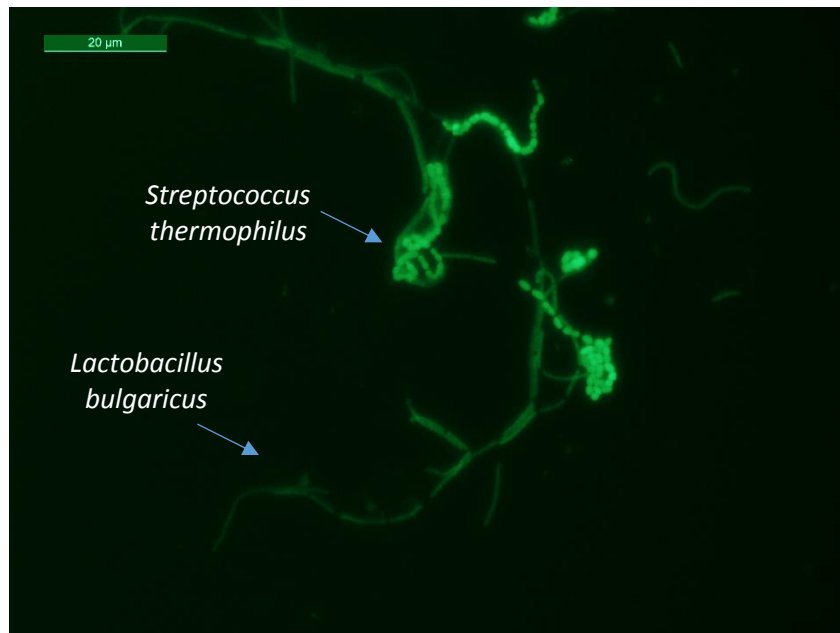


Figure 5. Epifluorescence image illustrating curcumin interaction with both *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* at a magnitude of x100.

The epifluorescence image clearly showed higher fluorescence intensity with *S. thermophilus* and *L. delbrueckii*. This qualitative result correlated with the results obtained by fluorescence spectroscopy previously.

To understand why curcumin interacted more with *S. thermophilus* than with *L. delbrueckii*, a microbial adhesion to solvents MATS test has been performed.

1.1.1 3.4. Microbial Adhesion To Solvents (MATS)

The MATS test is a simple and rapid method to study the physico-chemical properties of microorganisms including their hydrophobicity and Lewis acid–base or electron acceptor/electron donor character (Figure 6) (Bellon-Fontaine, Rault, & Van Oss, 1996).

Résultats et Discussion

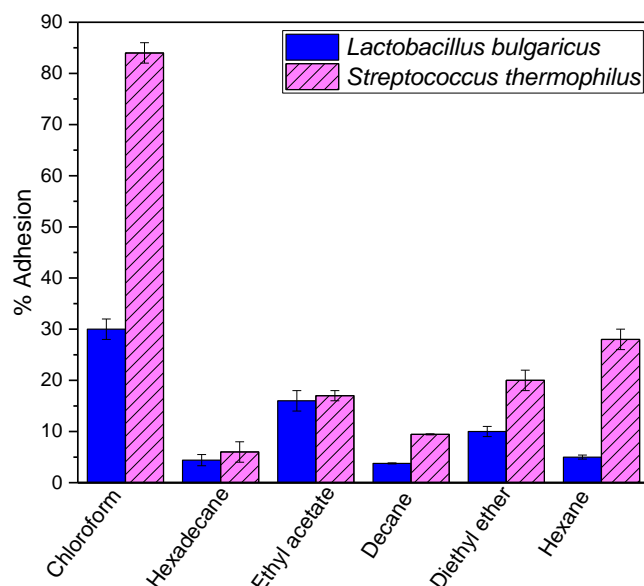


Figure 6. Adhesion of *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in phosphate buffer to various solvent-water interfaces.

Figure 6 presents the adhesion of *L. delbrueckii* and *S thermophilus* to various solvent-water interfaces.

Both strains displayed maximal affinity for acidic solvent (chloroform) 30 ± 2 % for *L. delbrueckii* and 84 ± 2 % for *S thermophilus*, and a lower affinity for the basic solvent (ethyl acetate: 16 ± 2 % for *L. delbrueckii* and 17 ± 1 % for *S thermophilus* and diethyl ether: 10 ± 1 % for *L. delbrueckii* and 20 ± 2 % for *S thermophilus*). Adhesion of both strains to chloroform was higher than the adhesion to hexadecane (30 ± 2 % against 4 ± 1 % for *L. delbrueckii*, respectively, and 84 ± 2 % against 6 ± 2 % for *S thermophilus*, respectively), two solvents with similar Van der Waals properties. These results demonstrated that both microbial surfaces were strongly electron donating (ie. Basic) and weakly electron accepting (i.e. acidic) specifically *S thermophilus* that showed a very high affinity to chloroform. The basic character, implicated in Lewis interactions, could be attributed to the presence of carboxylic groups, attributed to lipoteichoic acids, on the microbial surface (Bellon-Fontaine et al., 1996). MATS applied to characterization of both strains has also shown differences of behavior between both bacteria: *S thermophilus* appeared to be more solvent-dependent than *L. delbrueckii* and the percentage of cells adhering to various solvent interfaces was generally lower for *L. delbrueckii* than for *S thermophilus*, indicating a difference in surface properties of these bacteria. The microbial

adhesion of *S thermophilus* to n-alkanes was much higher than the microbial adhesion of *L. delbrueckii* indicating that the Van der Waals property was higher for *S thermophilus* than for *L. delbrueckii* and that *S thermophilus* possessed a more hydrophobic microbial surface than *L. delbrueckii* (Vinderola et al., 2002). Curcumin, a hydrophobic bioactive, would then interact preferentially with *S thermophilus* than with *L. delbrueckii*. These MATS results were in accordance with the higher interaction between curcumin and *S thermophilus* than curcumin with *L. delbrueckii* observed in fluorescence and quenching experiments but also with epifluorescence microscopy images.

3.5. Microscopic observation of curcumin transfer from MC to both lactic acid bacteria

The fluorescence spectroscopy results also suggested that curcumin could transfer from MC to bacteria cell envelope. Thus, curcumin added to MC suspension was put in contact adjacently with *L. delbrueckii* and with *S thermophilus* on a smear and observed *via* epifluorescence microscopy (Fig.7)

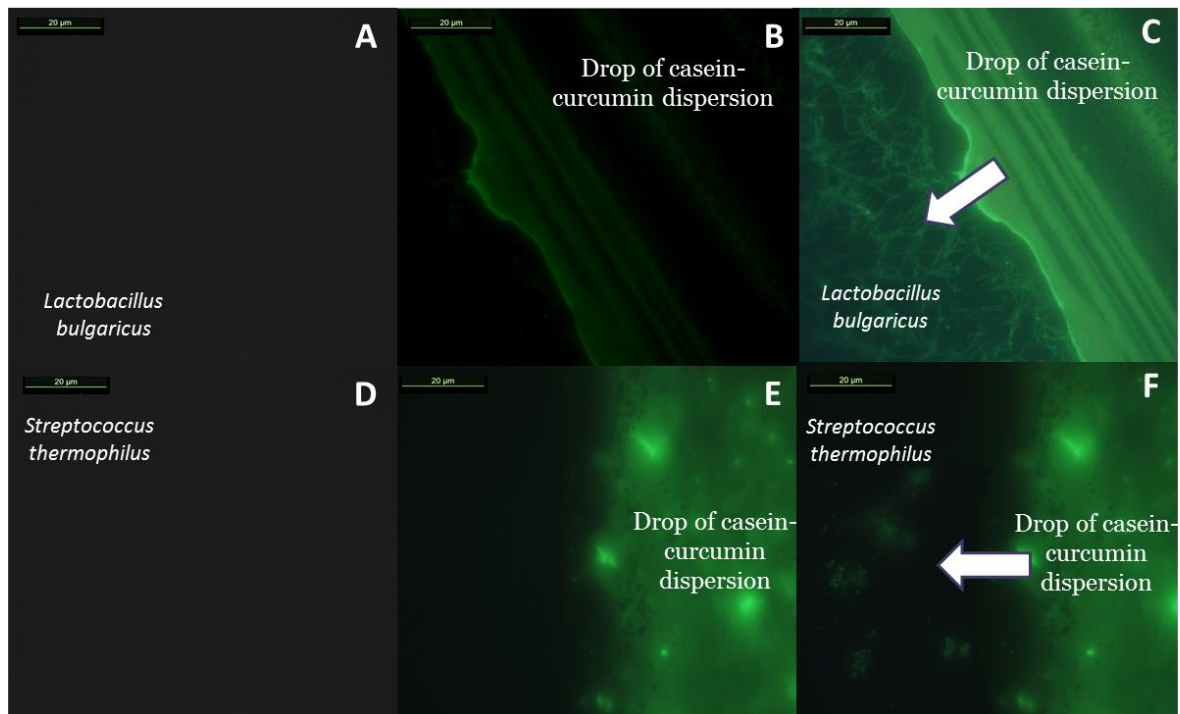


Figure 7. Epifluorescence image illustrating A. *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* B-E. Drop of casein-curcumin dispersion C. The contact zone between MC-Curcumin and *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*. *Streptococcus thermophilus*. F. The contact zone between MC-Curcumin and *Streptococcus thermophilus*. All images were observed at a magnitude of x100.

Résultats et Discussion

When *L. delbrueckii* or *S thermophilus* were added and observed, no fluorescence was detected (Fig 7.A-D). A drop of MC-Curcumin dispersion was added adjacently to the glass slide; the smear corresponding to MC-Curcumin showed fluorescence (Fig.7.B-F) and progressively *L. delbrueckii* and with *S thermophilus* began to fluoresce and to appear (Fig.7.C-F) illustrating the curcumin transferred from MC to *L. delbrueckii* and with *S thermophilus*. Overall, when bacteria was in the same medium with MC doped with curcumin, the curcumin transferred from MC to bacteria cell envelope. Knowing that curcumin has a partition coefficient between water and octanol of 3.9 ($K_{w/o}= 3.29$) (Règlement (CE) No. 1907/2006, 2013), this biomolecule has a tendency to interact with hydrophobic surfaces. And so, in presence of numerous hydrophobic entities, curcumin parted between them depending on the relative hydrophobic constituents of their membrane.

Knowing that curcumin interacts with *L. delbrueckii* and with *S thermophilus* and that both bacteria are responsible of the acidification of the medium to obtain a yoghurt, it was important to see if curcumin inhibited the growth of *L. delbrueckii* and *S thermophilus*.

3.6. Antimicrobial activity of curcumin against *L. delbrueckii* and with *S thermophilus*

The antimicrobial effect of curcumin in ethanol and encapsulated curcumin was investigated by agar well diffusion method. The antimicrobial tests of curcumin activity whether it was in ethanol or encapsulated in MC at 5 μ M show no inhibition halos neither for *L. delbrueckii* nor *S thermophilus*. And so, when curcumin was added to the media at these concentrations it did not influence the growth of *L. delbrueckii* and *S thermophilus*. This could be correlated with the CMI against bacteria pathogens that were 20 times higher (Rai et al., 2008).

Knowing that curcumin did not inhibit the growth of both bacteria, it was interesting to see if it has an influence on their acidification property when added to milk.

3.7. Influence of curcumin addition on the sol–gel transition measured by multiple static light scattering and rheological measurements

The sol–gel transition of milk (control) and curcumin-doped milk samples acidified with Yomix containing both *L. delbrueckii* and *S thermophilus* at 42 °C was followed by the evolution of the relative back scattered intensity (Δ BS) all along the sample height every 5 min after Yomix addition and by the evolution of the elastic modulus (G') obtained *via* rheological measurements. After 1333 min corresponding to 22 h and 20 min, the pH of both media reached 4.1.

The gelation point occurred when the value of the elastic modulus G' was greater than 1 Pa. The gelation point and the final values of G' and Δ BS are noted in Table 1.

Tableau 12. Average values of gelation time, elastic and viscous modulus and backscattering percentage of both milk control and milk doped with curcumin, acidified by Yomix at 42 °C

Samples	Gelation time (min)	Elastic modulus (Pa)	Δ BS (%)
Milk-Yomix control	347 ± 2	82 ± 4	2.7 ± 1
Milk-Yomix-Curcumin	357 ± 4	84 ± 3	5.7 ± 1

Curcumin addition did not affect the gelation occurring between 347 ± 2 min and 357 ± 4 min after Yomix addition. At the final gelation time, the curcumin-doped milk seemed to present a similar elastic modulus 84.20 ± 3.00 Pa against 82.37 ± 4.00 Pa. The Δ BS percentage for MC-Curcumin is 5.7 ± 1.0 % against 2.7 ± 1.0 % for milk control. The elastic modulus of supplemented yoghurt could be explained by a microstructural protein rearrangement and a reduced syneresis susceptibility making supplemented yoghurt firmer and more stable later on during storage (Amirdivani & Baba, 2015).

4. Conclusion

Curcumin interactions with *L. delbrueckii* and with *S thermophilus* were confirmed by epifluorescence microscopy and fluorescence spectroscopy. Both revealed that whether curcumin was added to *L. delbrueckii* and *S thermophilus* in phosphate buffer or added to MC suspensions, curcumin interacted

Résultats et Discussion

with both bacteria. Nevertheless, in presence of MC, curcumin removed from the tryptophan domains of MC and transferred to bacteria cell envelopes. Curcumin was found to interact more with *S thermophilus* than with *L. delbrueckii* which was explained by the hydrophobicity of the bacterial envelopes *via* MATS. In fact, *S thermophilus* had a more hydrophobic envelope than *L. delbrueckii* and thus interacted more with curcumin. The antimicrobial activity of curcumin against both bacteria was also studied; at the concentration used curcumin did not inhibit the growth of *L. delbrueckii* nor the growth of *S. thermophilus*. Furthermore, curcumin addition did not perturb the acidification properties of *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* and did not modify the gelation properties when added to milk containing Yomix. Further investigations should be necessary to understand how curcumin interacted in presence of MC, lactic acid bacteria combined to other constituents of milk such as whey proteins and fats and to study curcumin's quantitative partition in a complex medium.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Region Lorraine and Université de Lorraine (Program CPER 5, Nutralor) that are gratefully acknowledged.

Competing interests

No competing interests to declare.

5. References

- Aggarwal, B. B., Kumar, A., Bharti, A. C., & others. (2003). Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*, 23(1A), 363–398.
- Ahmed, K., Li, Y., McClements, D. J., & Xiao, H. (2012). Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food Chemistry*, 132(2), 799–807. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.039>
- Amirdivani, S., & Baba, A. S. H. (2015). Green tea yogurt: major phenolic compounds and microbial growth. *Journal of Food Science and Technology*, 52(7), 4652–4660. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1670-6>
- Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J., & Van Oss, C. J. (1996). Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 7(1–2), 47–53.
- Bhavani Shankar, T. N., & Sreenivasamurthy, V. (1979). Effect of turmeric (*Curcuma longa*) fractions on the growth of some intestinal and pathogenic bacteria in vitro. *Indian Journal of Experimental Biology*, 17, 1363–1366.
- Duvoix, A., Blasius, R., Delhalle, S., Schnekenburger, M., Morceau, F., Henry, E., ... Diederich, M. (2005). Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Letters*, 223(2), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.09.041>
- Esatbeyoglu, T., Huebbe, P., Ernst, I. M. A., Chin, D., Wagner, A. E., & Rimbach, G. (2012). Curcumin—From Molecule to Biological Function. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(22), 5308–5332. <https://doi.org/10.1002/anie.201107724>
- Esmaili, M., Ghaffari, S. M., Moosavi-Movahedi, Z., Atri, M. S., Sharifzadeh, A., Farhadi, M., ... Moosavi-Movahedi, A. A. (2011). Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin; food industry application. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2166–2172. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.023>

Résultats et Discussion

Fu, S., Shen, Z., Ajlouni, S., Ng, K., Sanguansri, L., & Augustin, M. A. (2014). Interactions of buttermilk with curcuminoids. *Food Chemistry*, *149*, 47–53.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.049>

Gomez-Estaca, Balaguer, Gavara, & Hernandez-Munoz. (2012). Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. *Food Hydrocolloids*, *28*(1), 82–

91. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.11.013>

Gryniewicz, G., & Slifirski, P. (2012). Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. *Acta Biochimica Polonica*, *59*(2), 201.

Gupta, S. C., Prasad, S., Kim, J. H., Patchva, S., Webb, L. J., Priyadarsini, I. K., & Aggarwal, B. B. (2011). Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Natural Product Reports*, *28*(12), 1937. <https://doi.org/10.1039/c1np00051a>

<https://doi.org/10.1039/c1np00051a>

Hassan, H. A., Florentin, M., Sandrine, B. N. I., Pierrick, D., Jordane, J., & Michel, L. (2015). Shea butter solid nanoparticles for curcumin encapsulation: influence of nanoparticles size on drug loading.

European Journal of Lipid Science and Technology, n/a-n/a.

<https://doi.org/10.1002/ejlt.201500348>

Heger, M., van Golen, R. F., Broekgaarden, M., & Michel, M. C. (2013). The Molecular Basis for the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Curcumin and Its Metabolites in Relation to Cancer.

Pharmacological Reviews, *66*(1), 222–307. <https://doi.org/10.1124/pr.110.004044>

Hu, P., Huang, P., & Chen, M. W. (2013). Curcumin reduces *Streptococcus mutans* biofilm formation by inhibiting sortase A activity. *Archives of Oral Biology*, *58*(10), 1343–1348.

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.05.004>

Indira Priyadarsini, K. (2013). Chemical and Structural Features Influencing the Biological Activity of Curcumin. *Current Pharmaceutical Design*, *19*(11), 2093–2100.

<https://doi.org/10.2174/138161213805289228>

- Kaur, S., Modi, N. H., Panda, D., & Roy, N. (2010). Probing the binding site of curcumin in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* FtsZ – A structural insight to unveil antibacterial activity of curcumin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *45*(9), 4209–4214.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.06.015>
- Khanji, A. N., Michaux, F., Jasniewski, J., Petit, J., Lahimer, E., Cherif, M., ... Banon, S. (2015). Structure and gelation properties of casein micelles doped with curcumin under acidic conditions. *Food & Function*, *6*(12), 3624–3633. <https://doi.org/10.1039/C5FO00829H>
- Lu, M., Cao, Y., Ho, C.-T., & Huang, Q. (2016). Development of Organogel-Derived Capsaicin Nanoemulsion with Improved Bioaccessibility and Reduced Gastric Mucosa Irritation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(23), 4735–4741. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01095>
- McClements, D. J. (2012). Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *17*(5), 235–245.
<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.06.002>
- Mishra, S., Narain, U., Mishra, R., & Misra, K. (2005). Design, development and synthesis of mixed bioconjugates of piperic acid–glycine, curcumin–glycine/alanine and curcumin–glycine–piperic acid and their antibacterial and antifungal properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *13*(5), 1477–1486. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.12.057>
- Niu, Y., Wang, X., Chai, S., Chen, Z., An, X., & Shen, W. (2012). Effects of Curcumin Concentration and Temperature on the Spectroscopic Properties of Liposomal Curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(7), 1865–1870. <https://doi.org/10.1021/jf204867v>
- Oss, C. J. V., Chaudhury, M. K., & Good, R. J. (1989). The Mechanism of Phase Separation of Polymers in Organic Media—Apolar and Polar Systems. *Separation Science and Technology*, *24*(1–2), 15–30. <https://doi.org/10.1080/01496398908049748>
- Pan, K., Zhong, Q., & Baek, S. J. (2013). Enhanced Dispersibility and Bioactivity of Curcumin by Encapsulation in Casein Nanocapsules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(25), 6036–6043. <https://doi.org/10.1021/jf400752a>

Résultats et Discussion

- Pan, Tikekar, Wang, Avena-Bustillos, & Nitin. (2015). Effect of barrier properties of zein colloidal particles and oil-in-water emulsions on oxidative stability of encapsulated bioactive compounds. *Food Hydrocolloids*, 43, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.002>
- Patel, Hu, Tiwari, & Velikov. (2010). Synthesis and characterisation of zein–curcumin colloidal particles. *Soft Matter*, 6(24), 6192. <https://doi.org/10.1039/c0sm00800a>
- Patel, & Velikov, K. P. (2011). Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1958–1964. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.04.005>
- Pelaes Vital, A. C., Goto, P. A., Hanai, L. N., Gomes-da-Costa, S. M., de Abreu Filho, B. A., Nakamura, C. V., & Matumoto-Pintro, P. T. (2015). Microbiological, functional and rheological properties of low fat yogurt supplemented with *Pleurotus ostreatus* aqueous extract. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1028–1035. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.003>
- Rai, D., Singh, J. K., Roy, N., & Panda, D. (2008). Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochemical Journal*, 410(1), 147–155. <https://doi.org/10.1042/BJ20070891>
- Règlement (CE) No. 1907/2006. (2013, July 4). Fiche de données de sécurité: Curcumine pour la synthèse. Merck.
- Singh, R. K., Rai, D., Yadav, D., Bhargava, A., Balzarini, J., & De Clercq, E. (2010). Synthesis, antibacterial and antiviral properties of curcumin bioconjugates bearing dipeptide, fatty acids and folic acid. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(3), 1078–1086. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.12.002>
- Snyder, L. R. (1974). Classification of the solvent properties of common liquids. *Journal of Chromatography A*, 92(2), 223–230. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85732-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85732-5)
- Song, S., Wang, Z., Qian, Y., Zhang, L., & Luo, E. (2012). The Release Rate of Curcumin from Calcium Alginate Beads Regulated by Food Emulsifiers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(17), 4388–4395. <https://doi.org/10.1021/jf3006883>

Tønnesen, H. H., Másson, M., & Loftsson, T. (2002). Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII.

Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 244(1), 127–135.

Vernhet, A., & Bellon-Fontaine, M. N. (1995). Role of bentonites in the prevention of *Saccharomyces cerevisiae* adhesion to solid surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 3(5), 255–262.

[https://doi.org/10.1016/0927-7765\(94\)01137-T](https://doi.org/10.1016/0927-7765(94)01137-T)

Vinderola, C. G., Costa, G. A., Regenhardt, S., & Reinheimer, J. A. (2002). Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 12(7), 579–589.

Wang, H., Hao, L., Wang, P., Chen, M., Jiang, S., & Jiang, S. (2017). Release kinetics and antibacterial activity of curcumin loaded zein fibers. *Food Hydrocolloids*, 63, 437–446.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.028>

Wilken, R., Veena, M. S., Wang, M. B., & Srivatsan, E. S. (2011). Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*, 10, 12.

<https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-12>

3. Contribution de l'article

L'observation de *Lactobacillus bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus* en contact avec la curcumine par microscopie à fluorescence a permis de visualiser l'interaction de ces bactéries avec le bioactif. En effet, quand la curcumine était seule, elle ne fluoresçait pas. Dès que l'une des deux bactéries fut ajoutée, le bioactif a fluorescé et les bactéries sur lesquelles la curcumine est adsorbée ont été visualisées.

Cette interaction a été confirmée par les mesures de fluorescence et de quenching de fluorescence des résidus tryptophane des micelles de caséines. Premièrement, il a été démontré que les bactéries lactiques interagissaient avec la curcumine en présence de micelles de caséines : l'intensité de fluorescence diminuait en présence de bactéries lactiques reflétant ainsi le quenching. De plus, une fois la curcumine ajoutée à la suspension bactérienne et le mélange centrifugé, l'intensité de fluorescence du surnageant diminuait car la curcumine adsorbée sur les bactéries lactiques du yaourt culotait avec elles, confirmant encore l'interaction entre la curcumine et les bactéries étudiées. Il s'est avéré que lorsque les bactéries étaient ajoutées dans un milieu contenant de la curcumine préalablement mise en contact avec les micelles de caséines, la curcumine se désorbait des micelles pour s'adsorber sur les enveloppes bactériennes. Ce partage du bioactif entre *Lactobacillus* et *Streptococcus* était souche-dépendant. En effet, les valeurs d'intensité de fluorescence après centrifugation du mélange des 3 composants étaient différentes suivant la souche bactérienne étudiée. L'intensité de fluorescence du surnageant après l'élimination des *Lactobacillus* augmentait de 57 % à 78 % alors qu'elle augmentait de 63 % à 93 % avec *Streptococcus*. Ces résultats suggéraient que la curcumine interagissait davantage avec *Streptococcus* qu'avec *Lactobacillus*. Cette différence d'interaction a été mise en corrélation avec les observations réalisées en microscopie à épifluorescence dans lesquelles la curcumine s'adsorbait qualitativement plus sur *Streptococcus thermophilus* que sur *Lactobacillus bulgaricus* en mélange.

Le test MATS a permis de mieux comprendre les interactions entre la curcumine et chaque souche bactérienne. En effet, *Streptococcus thermophilus* possède une enveloppe bactérienne plus hydrophobe comparée à celle de *Lactobacillus bulgaricus* favorisant ainsi l'adsorption de la curcumine, un composé hydrophobe.

Puisque la curcumine interagissait avec les bactéries lactiques du yaourt et cette interaction étant souche dépendante, l'activité inhibitrice de la curcumine a aussi été déterminée sur les deux bactéries. Avec une concentration en curcumine utilisée de 5 μM , aucune activité inhibitrice n'a été détectée. Malgré l'absence d'inhibition, il était primordial de vérifier que les propriétés technologiques des souches du yaourt, à savoir l'acidification du lait aboutissant à sa gélification, en présence de curcumine n'étaient pas altérées.

Les mesures rhéologiques et de turbidimétrie ont démontré que la curcumine n'influçait pas la production d'acide lactique permettant la gélification du lait. Le gel lactique en présence de curcumine, était, mise à part la couleur jaune, identique en tous points (point de gel et fermeté) au gel témoin.

Cet article a permis de démontrer que la curcumine interagissait avec les bactéries lactiques du yaourt sans les inhiber ni modifier leur activité d'acidification. Il a été aussi montré que la curcumine en présence de micelles de caséines et de bactéries lactiques tend à se partager entre les trois partenaires. Cependant, la curcumine s'adsorberait davantage sur l'enveloppe bactérienne de *Streptococcus thermophilus* que sur celle de *Lactobacillus bulgaricus* en raison de l'hydrophobie plus importante de l'enveloppe de *Streptococcus*. Enfin, l'ajout de curcumine dans un milieu modèle conduisant à un gel lactique de type-yaourt n'a pas influencé l'activité bactérienne d'acidification ni la formation du gel. Enfin, il serait judicieux d'étudier les différences de comportement de la curcumine vis-à-vis de l'ultrastructure des enveloppes bactériennes pour expliquer la différence d'affinité pour la curcumine des deux souches, voire de localiser le composé phénolique dans/sur ces dernières.

Publication 3: La production d'une poudre de micelles de caséines dopées en curcumine par atomisation : approches structurales et fonctionnelles

1. Introduction

En industrie agroalimentaire, l'encapsulation de molécules bioactives tels que les vitamines, les ω -3, les enzymes ou les antioxydants ^{34,503,504} dans des matrices à base de lipides (liposomes, émulsions), de polysaccharides (billes d'alginate, gomme d'acacia) ou de protéines (protéines de soja ou de zéine, protéines laitières telles que les protéines sériques et les caséines) est très utilisée. En effet, l'encapsulation permet de protéger les bioactifs des problèmes d'instabilité dus à des fluctuations de pH et de température, des dégradations causées par les enzymes ou par l'oxygène et la lumière ^{34,102}. Le choix de la matrice d'encapsulation est donc primordial pour la protection du bioactif et elle dépend des propriétés de ce dernier telles que sa solubilité dans les solutions aqueuses et son hydrophobie mais aussi en fonction de la méthode d'encapsulation et des caractéristiques du produit final.

Les protéines laitières sont des matrices d'encapsulation très utilisées en industrie agroalimentaire pour leurs propriétés nutritionnelles, structurales et fonctionnelles ²⁵¹. Les caséines, protéines majeures du lait, sont qualifiées de GRAS et possèdent d'excellentes propriétés d'émulsification leur permettant de former des micro- et nano-capsules. Elles présentent aussi une forte valeur nutritionnelle ainsi qu'une importante capacité de protection et de relargage contrôlé de bioactifs encapsulés ^{251,472,505}. Les caséines se présentent sous forme de micelles formées de domaines hydrophiles et hydrophobes qui interagissent avec des bioactifs tels que la curcumine. Ces micelles sont des particules colloïdales de 100 nm de rayon formées par des interactions établies entre 100 molécules de caséines environ avec 800 nanoclusters de phosphate de calcium amorphe ⁴⁶⁷. La stabilité de ces micelles face au traitement thermique et au séchage est remarquable et leur confère un atout important pour leur utilisation en tant que matrice d'encapsulation. De plus, les micelles de caséines peuvent interagir entre elles pour former un gel en conditions acides ^{471,506-508}. Les micelles ont déjà été utilisées en tant que matrices d'encapsulation de la vitamine D₂ et D₃, du β -carotène, des ω -3, des

catéchines, de la curcumine etc. ^{328,359,367,382,495,509,510}. Leur propriété de gélification est un grand avantage par rapport aux autres matrices d'encapsulation notamment d'un point de vue technologique.

Dans un article précédent, l'interaction entre la curcumine et les micelles de caséines *via* les résidus tryptophane a été démontrée dans des conditions abiotiques ⁴⁷⁰. Cette interaction n'a pas influencé la structure de la micelle ni ses propriétés technofonctionnelles telle que son aptitude à la gélification. Comme présenté précédemment, malgré les diverses activités biologiques qu'offre la curcumine, elle reste très hydrophobe et insoluble dans les solutions aqueuses limitant ainsi son incorporation dans les aliments ⁵². Son encapsulation est donc une véritable solution pour sa protection et sa vectorisation ⁵¹¹⁻⁵¹⁴. Dans l'article précédent, les micelles de caséines ont été utilisées pour l'encapsulation de ce bioactif. Cependant, l'ajout de la curcumine se fait à partir d'une solution mère à base d'éthanol où la curcumine n'est pas très stable et peut rapidement se dégrader et s'oxyder surtout lors des étapes de formulations alimentaires et de procédés de fabrication du produit fini ⁴⁷⁰. Cette voie de solubilisation du polyphénol dans un alcool n'est donc pas totalement viable pour une application alimentaire. Une autre voie consisterait à utiliser un ingrédient déjà enrichi en curcumine pouvant facilement être incorporé dans une formulation. Cet ingrédient devra protéger l'activité de l'actif lors du stockage et des procédés de formulation.

Les protéines laitières sont largement utilisées en formulation alimentaire sous forme de poudre. Cet état est préféré à des dispersions aqueuses notamment afin d'améliorer leur préservation durant le stockage et le transport. La plupart des poudres alimentaires sont produites par atomisation ou spray drying, procédé à faible coût et permettant une production continue et une industrialisation relativement facile ⁵¹⁵. C'est également une technique efficace pour la protection des ingrédients contre la dégradation, les pertes volatiles et les interactions précoces avec d'autres ingrédients ³⁵⁴. Récemment, Liu *et al.*, (2015) ont ainsi démontré que l'encapsulation de la curcumine dans les protéines sériques du lait WPI par atomisation permet la préservation de l'activité antioxydante de la

Résultats et Discussion

curcumine³¹⁶. Fournir des poudres de caséines micellaires enrichies en curcumine serait utile pour une meilleure protection de la curcumine et un transport plus facile. A notre connaissance, la production d'une poudre de caséines micellaires dopées en curcumine par atomisation tout en préservant l'activité antioxydante du bioactif n'a pas été encore étudiée.

Le but de ce travail concerne en premier lieu la production d'une poudre de micelles de caséines dopées en curcumine par atomisation. La poudre dopée obtenue est par la suite caractérisée et l'influence de la présence de la curcumine sur ses différentes propriétés physicochimiques telles que sa couleur, ses propriétés de sorption d'eau ainsi que la structure micellaire est évaluée. L'activité antioxydante de la curcumine encapsulée est déterminée par les tests ABTS et FRAP et comparée à la curcumine en tampon phosphate et à la curcumine encapsulée dans les micelles avant atomisation. Enfin, l'effet de la présence de la curcumine au sein des micelles de caséines et l'influence de la production de poudre dopée sur les propriétés technofonctionnelles des micelles sera étudié par le suivi de la réhydratation de la poudre et de la gélification acide.

2. Article: Structure, gelation, and antioxidant properties of curcumin-doped casein micelle powder produced by spray-drying

Article soumis dans Food Function (2017)

Aya N. KHANJI^{ab}, Florentin MICHAUX^a, Jeremy PETIT^a, Dominique SALAMEH^b, Toufic RIZK^b, Jordane JASNIEWSKI^a and Sylvie BANON^{*a}.

*corresponding author

tel : +33 (0) 372747195

fax : +33 (0) 383595804

^a Université de Lorraine, Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA40602-F-54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

^b St Joseph University, Faculty of Sciences, UR TVA, Dept Chemistry, BP 11-514, Beirut 11072050, Lebanon.

Highlights

Curcumin-doped micellar casein yellow powder was obtained by spray-drying.

Curcumin addition did not modify micellar casein structural and functional properties.

Curcumin antioxidant activity was preserved under curcumin-doped micellar casein powder.

Abstract

The encapsulation of curcumin in micellar caseins (MC) and the production of powder was done by spray-drying. Nearly 97 % curcumin was retained and the yellow powder showed typical high casein powder morphology. The hygroscopic properties were determined, slight differences reflected less available hydrophobic sites when curcumin was bound to casein, favoring interactions with water in curcumin-enriched MC powders. No difference was detected on the internal MC structure *via* SAXS. Antioxidant activity of doped-curcumin powder presented 88 % of active curcumin. During 60 days at

Résultats et Discussion

40 °C storage, the antioxidant activity of curcumin measured by ABTS and FRAP was preserved with a percentage of $82 \pm 2.0 \%$ and $84 \pm 1.1 \%$, respectively. Curcumin doped powders presented similar features to classical casein powders (rehydration and gelling abilities). It was demonstrated that curcumin encapsulation in MC under its powder form helped in protecting its antioxidant activity without influencing the techno-functional properties of MC. This study allowed the incorporation of curcumin *via* the MC matrix as an active food ingredient available in a powder state usable as classical milk powder in several food formulations.

Keywords

Micellar casein, Bioactive, Curcumin, Spray-drying, Powder, Antioxidant

1. Introduction

In the food industry, encapsulation is used to deliver a wide range of bioactives such as vitamins, enzymes, antioxidants and ω -3 fatty acids ^{1,2} within small capsules or particles made of lipids (emulsions, liposomes), polysaccharides (alginate, gum beads) or proteins (milk proteins such as whey or caseins, zein or soybean proteins). Encapsulation protects the bioactives from stability problems induced by pH and temperature fluctuations, enzymatic degradations and oxidative stress ². An important step in the encapsulation process is the selection of a suitable matrix dependently from the bioactive ingredients properties such as its solubility in water, its sensitivity to oxygen or light, desired characteristics of final products and encapsulation methods.

Milk proteins are natural vehicles for bioactives that are widely used in the food industry for their nutritional and functional properties ³. Caseins, the major milk proteins, are Generally Recognized as Safe (GRAS) and have excellent emulsifying properties allowing them to form micro- and nano-capsules. They also present mild flavor and high nutritional value, along with various shielding capabilities, essential for protecting sensitive payload and controlling bioaccessibility of the bioactive compounds ^{3,4}. In milk, caseins are under the form of micelles (micellar caseins or MC) made of hydrophilic and hydrophobic domains that are able to interact with various actives. MC consists in

colloidal particles of around 100 nm radius built by interactions between about 100 casein molecules and 800 nanoclusters of amorphous calcium phosphate⁵. The outstanding stability of caseins and casein micelles during heating, freezing and drying processes make them valuable in encapsulating food bioactives. Moreover, they possess exceptional surface-active, self-assembly and gelation properties and high water binding capacity under defined conditions^{6,7}. MCs have been already used as delivery systems for vitamin D₃, for beta-carotene, ω -3 fatty acids, tea catechins, curcumin, etc.⁸⁻¹². Sodium caseinate has been also already used as an encapsulation matrix for curcumin but without the ability of gelling¹³.

In a previous paper, we demonstrated that curcumin interacted with MC without altering the micellar structure of caseins and also without modifying their acid gelation properties¹⁴. Curcumin, also known as 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)1,6-heptadiene-3,5-dione, is a polyphenol extracted from the rhizomes of turmeric (*Curcuma longa*) that possesses several biological activities such as antioxidant, antimicrobial, anti-cancer, anti-inflammatory and wound healing properties¹⁵⁻¹⁸. However, curcumin has a low solubility in water and a short biological half-life¹⁹. Thus, the use of this promising lipophilic molecule has been hindered by its poor water solubility and low bioavailability after oral administration²⁰. Furthermore, its antioxidant activity presents a low stability: it decreases rapidly in the presence of light and oxygen. These drawbacks lead to two main limitations in its use in food formulations: (i) a high difficulty to incorporate curcumin into aqueous media (the medium of most food formulations) and (ii) a low bioavailability of curcumin, which is typical of lipophilic substances²¹. A variety of approaches were pursued to overcome these limitations, which include synthesis of curcumin analogues, the use of adjuvants that inhibit curcumin metabolism and thus enhance its bioavailability (e.g. piperine), and the development of improved delivery platforms for the turmeric compound, including liposomal, nanoparticulated and phospholipid complex formulations of curcumin²²⁻²⁴. And so, encapsulation seems to be an efficient method that challenged food formulators into developing new efficient encapsulation systems.

Résultats et Discussion

Milk proteins are often used in food industry under a powder form to improve their preservation during storage and transport and because a powder is easier to handle than aqueous dispersions. Most food powders are produced by spray-drying due to its low cost, good availability, continuous production and easiness of industrialization. This food ingredients microencapsulation technique is efficient against deterioration, volatile losses or premature interaction with other ingredients. Recently Liu *et al.* (2015) demonstrated that the solubility of curcumin could be enhanced by spray-drying microencapsulation in whey protein isolate²⁵. The improvement of curcumin solubility in water by complexation with WPI was demonstrated at 5 wt% by saturating the solution with curcumin up to $59.5 \pm 2.7 \text{ mg.mL}^{-1}$. Despite limited contents in curcumin ($1.13 \pm 0.17 \text{ mg.g}^{-1}$), the antioxidant activities of WPI-curcumin particles were high.

Providing functional dairy ingredients enriched with curcumin under a powder form should be useful to improve powder preservation during storage and processing stability of a food formulation. To the best of our knowledge, producing by spray-drying a curcumin-doped MC powder able to preserve the antioxidant activity of curcumin had not been studied yet. Consequently, this study was first focused on producing curcumin-doped MC powders and characterizing their main physicochemical properties such as their color, their hygroscopic properties and their structure. Then, the antioxidant power of curcumin in spray dried MC powders was evaluated both by ABTS and FRAP assays and compared to the antioxidant activity of fresh curcumin in phosphate buffer (medium used for curcumin encapsulation in MC) and non-spray-dried curcumin encapsulated in MC at the same concentration. The main techno-functional properties of these powders, like rehydration and gelation behaviors, were finally investigated.

2. Material and methods

2.1. Material

The native-like micellar caseins (MC) used in this study (Promilk 872 B, Ingredia Dairy Ingredients, Arras, France) were obtained by milk microfiltration and diafiltration against milk ultrafiltrate then

spray-dried. MC contained 95.0 % (w/w) dry solids and, on a dry weight basis, 87.0 % total proteins (about 80.0 % MC), 7.3 % minerals, 5 % lactose, and 0.8 % fat. Curcumin (66.0 % purity), glucono-delta-lactone, ethanol (96.0 %) and sodium azide were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

2.2. Preparation of solutions

Stock solutions of curcumin were prepared in ethanol (96 %) at $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and stored protected from light at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Phosphate Buffered Saline (PBS) solution was prepared with ultrapure water and contained for one liter: 8.00 g NaCl, 0.20 g KCl, 1.44 g Na_2HPO_4 , 0.24 g KH_2PO_4 . In order to prevent bacterial growth, sodium azide (0.02 % w/v) was added to PBS buffer. PBS buffer filtration through $0.20 \text{ }\mu\text{m}$ polyethersulfone membrane (Millipore) was performed before use. Native MC was rehydrated overnight in PBS at $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$; then ethanolic curcumin solution ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was mixed with native MC dispersions either for 1 h or overnight: these durations were chosen to evaluate later on the time effect on curcumin antioxidant activity.

2.3. Spray-drying of MC-curcumin mixtures

The concentrate was prepared by mixing 8 L of rehydrated MC (15.5 % dry matter) with 290 mL of ethanolic curcumin solution ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 1 h before spray-drying. Curcumin and MC mixtures were prepared so as not to exceed 2 % (v/v) addition of ethanol, hence protein ethanol-induced denaturation was avoided. MC suspensions in ethanol were used as control. Spray-drying was performed using a pilot-scale spray drier MicraSpray 150 (Anhydro, Soeborg, Danemark). A peristaltic pump was used to deliver the liquid through the bi-fluid nozzle into the spray-drying chamber with a feed flow-rate of $46.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and a nozzle pressure of 1 bar. Native MC were dispersed in PBS buffer (pH 7.4) and stirred overnight at $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ in order to get maximal protein hydration and stabilization. The mixture was atomized into heated air to facilitate the rapid removal of water as the droplets were mixed with the hot air in the drying chamber at an inlet temperature of $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The powder particles were then separated from the drying air at an outlet temperature of $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4. Comparison of casein and curcumin-casein powders from dry state to aqueous suspension

2.4.1. Powder colorimetry

Color measurements were carried out with a Minolta CM, CR-210 colorimeter (Minolta, Colombes, France) employing the parameters L*(lightness), a*(redness), b*(yellowness), C*(chroma) and H* (hue angle) defined in the CIEL*a*b* system ²⁶. All measurements were taken as the average of at least three points on the center and the periphery of each powder layer of 1 cm high. The total color difference (ΔE) between Control-MC and MC-curcumin powders was calculated using the following equation 1 ²⁶:

$$\Delta E = \sqrt{(L_i - L_0)^2 + (a_i - a_0)^2 + (b_i - b_0)^2} \quad (\text{Equation 1})$$

with 0 and i indices respectively designating Control-MC and MC-curcumin powders.

2.4.2. Particle powder morphology by environmental scanning electron microscopy (ESEM)

The morphology of powder particles was characterized with an environmental scanning electron microscope (ESEM, Quanta 650 FEG, FEI, USA). Using environmental condition is particularly interesting, as no coating is needed. Analyses were performed in the following conditions: 7 KeV beam energy, LSD detector, and 130 Pa chamber pressure. Powders were gently deposited on an adhesive tape and excess powder was removed by air flow, prior to analysis.

2.4.3. Hygroscopic properties

Dynamic vapor sorption was used to monitor the moisture sorption capacity of spray-dried Control-MC and MC-curcumin powders in the water activity (a_w) range from 0 to 0.95. Measuring the water sorption behavior provides information about the physical and chemical stability of the sample in humid atmospheres. Water sorption isotherms were determined gravimetrically using a DVS apparatus

(Surface Measurement Systems, London, UK) equipped with a Cahn microbalance. The changes in sample weight over time at 20 °C and at any desired a_w were recorded. About 70 - 80 mg sample was loaded onto the quartz sample pan. The sample mass was allowed to reach gravimetric equilibrium ($dm/dt < 0,001$) before proceeding to the next humidity step. The mass change at each step was recorded which allowed the moisture sorption isotherm to be generated.

The isotherm profiles were fitted using the Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) model (equation 2) using Origin software for a_w between 0 and 0.7.

$$m = m_{0GAB} \frac{C_{GAB} K_{GAB} a_w}{(1 - K_{GAB} a_w)(1 - K_{GAB} a_w + C_{GAB} K_{GAB} a_w)} \quad (\text{Equation 2})$$

The GAB model is commonly used to fit type II water vapor adsorption isotherms (typical of food solids²⁷). The GAB model permits to determine the first monolayer moisture content (m_0) and considers also the multilayered water molecules adsorption (up to a_w equaled to 0.7). The energy of interaction between the first and the further adsorbed water layers is determined by the sorption constant C_{GAB} . The interaction between multilayered water molecules and condensed water is represented by the specific GAB constant K_{GAB} .

2.4.4. Small Angle X-Ray Scattering of spray dried MC-curcumin microparticles

Small Angle X-ray Scattering (SAXS) spectra were recorded on a SAXSess mc² apparatus (Anton Paar, Austria), using a line-collimation system. This instrument was associated with a ID 3003 laboratory X-Ray generator (General Electric) equipped with a sealed X-Ray tube (PANalytical, $\lambda_{Cu\ Ka} = 0.1542$ nm) operating at 40 kV and 50 mA. A translucent beam stop allowed the measurement of an attenuated primary beam at $q = 0$. Sample powders were introduced into a Special glass capillary (1.5 mm, WJM-Glas), before being placed inside an evacuation chamber at 20 °C. The scattering of the X-ray beam was detected by a CCD camera (Princeton Instruments, 309 mm sample-detector distance). Using SAXSQuant software (Anton Paar), 2D images were integrated into 1D scattering intensities I as a function of the magnitude of the scattering vector q ($q = (4\pi/\lambda) \sin \theta$; where 2θ is the total scattering

Résultats et Discussion

angle). All data were calibrated by normalizing the attenuated primary intensity, before being corrected for the background scattering from the empty capillary. The scattering data, obtained with a slit collimation, exhibited instrumental smearing. Obtained intensities were then scaled into absolute units using water as the reference material.

2.5. Curcumin retention and determination of its antioxidant activity

2.5.1. Curcumin extraction procedure

In order to determine the curcumin retention level in MC, an extraction from the powder was performed. Spray-dried MC-curcumin powder was rehydrated in PBS (50 g.L⁻¹, pH = 7.4) overnight at 7 °C. 10 mL diethyl ether was added to 5 mL rehydrated powder and the mixture was agitated vigorously for 10 min. It was then centrifuged for 5 min at 1050 x *g* in order to separate organic and aqueous phases. Diethyl ether from supernatant was recovered and evaporated to recover curcumin under nitrogen atmosphere to avoid oxidation. 1 mL ethanol 96 % was then added to solubilize extracted curcumin. The concentration of extracted curcumin was determined by measuring its absorbance at 420 nm using a spectrophotometer (Shimadzu UV1280, Japan). The curcumin retention level after spray-drying was calculated by dividing the curcumin content extracted from spray-dried powder by the curcumin content in the spray-dried concentrate, both being expressed on dry basis (equation 3). Curcumin in initial feed solution was 0.189 mg.g⁻¹.

$$\text{Extracted Curcumin retention level (\%)} = \frac{\text{Curcumin in spray dried powder mg/g}}{\text{Curcumin in feed solution mg/g}} \times 100 \text{ (Equation 3)}$$

2.5.2. ABTS assay

In order to compare the antioxidant activity of curcumin encapsulated in spray-dried MC-curcumin powder after extraction to the one of curcumin in native (not spray-dried) MC dispersions, a fresh free curcumin solution was prepared in ethanol at the same concentration as encapsulated curcumin after extraction (incubation in dark). The concentration of curcumin after extraction was determined by

reporting the absorbance measured at $\lambda = 734$ nm to the corresponding concentration on the calibration curve $A_{\text{cur ETOH}} = f([\text{curcumin}])$.

The antioxidant activity of curcumin in ethanol, curcumin in phosphate buffer, curcumin extracted from rehydrated native MC after 1 h and overnight contact times and finally curcumin extracted from spray-dried MC-curcumin powder was determined according to a method adapted from Re *et al.* (1999)²⁸. The ABTS^{•+} radical cation was generated by making react 7 mM ABTS with 2 mM aqueous potassium persulfate solution in a 1:1 ratio (v/v) and the mixture was allowed to stand in the dark at 20 °C for 12 – 16 h before use. The resulting ABTS^{•+} solution was diluted with 96 % ethanol to obtain an initial absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm as measured by a UV-Spectrophotometer (Shimadzu UV1280, Japan). 10 μL of free curcumin were mixed with 1 mL ABTS^{•+} solution and the resulting absorbance at $\lambda = 734$ nm was read at 20 °C after 5 min incubation in the dark; the same was realized for extracted curcumin. Analyses were carried out in triplicate. Based on the absorbance measured, the concentration of active curcumin was determined and the amount in mg was calculated. The curcumin antioxidant activity (AA) percentage was then calculated by comparing the amount of active curcumin in mg to the total amount of initial MC encapsulated curcumin in mg.

2.5.3. FRAP assay

2.5.3.1. Reagent preparation

Reagents included 300 mM acetate buffer pH 3.6, 16 mL of glacial acetic acid 17.43 mol.L^{-1} of acetate buffer solution, 10 mM 2,4,6-tripyridyl-*s*-triazine (TPTZ) in 40 mM HCl and 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in water. Working FRAP reagent was prepared as required by mixing 50 mL acetate buffer, 5 mL TPTZ solution and 5 mL FeCl_3 solution²⁹.

2.5.3.2. FRAP assay samples

50 mL freshly prepared FRAP reagent was heated to 37 °C and a reagent blank was read at 593 nm²⁹. In order to measure the absorbance of the samples, 30 μL curcumin solution (extracted from native or

Résultats et Discussion

spray-dried MC-curcumin powders) were added to 1 mL FRAP reagent and the absorbance was measured at 593 nm after 5 min incubation in the dark.

2.6. Characterization of techno-functional properties of Control-MC and MC-curcumin powders

2.6.1. Particle size distribution and rehydration kinetics of native MC and spray-dried Control-MC and MC--Curcumin powders.

Particle size distributions were determined using a Mastersizer 3000 laser granulometer (Malvern Instruments, UK) equipped with Aero S dry dispersion unit. To obtain a correct obscuration (1 %), samples were dispersed at 1 bar air pressure, 40 % feed rate and 3 mm hopper gap and Fontainebleau sand was added to improve powder flowing by reducing cohesiveness. Distinct sand particles distribution was easily suppressed from granulometric MC profiles because the peak corresponding to the sand particle size distribution did not cover the sample peak. The particle and air refractive index 1.45 and 1 respectively. Five measurements were conducted for each sample. The median value of the particle size distribution, $d(50)$, was used, which means that 50 % of particles have a lower diameter.

The rehydration experiments of spray-dried Control-MC and MC-curcumin powders were performed with the same laser granulometer but with the Hydro MV wet dispersion unit at 20 °C. An appropriate amount of sample was dispersed in water to reach between 15 % and 20 % obscuration with a particle refractive index of 1.45 (refractive index of casein) and a dispersant refractive index of 1.33 (refractive index of water). The rehydration profiles were constructed by 3 000 measures with a measure frequency of 10 s and a rehydration duration of 8.5 h.

2.6.2. Acid gelation properties of spray-dried Control-MC and MC-curcumin powders

2.6.2.1. Rheological properties of acid gels

Glucono-delta-lactone (GDL) (3 % (w/v)) was gently stirred in Control-MC and MC-curcumin suspension obtained after rehydration (5 % (w/v)) for 3 min and a 20 mL aliquot was immediately transferred into

the gap of coaxial cylinders (DIN C25) of a Kinexus rheometer (Malvern Instruments, UK). The sol-gel transition and the development of the gel structure was followed using 0.1 % shear strain and 1.0 Hz frequency at controlled temperature of 20 °C. The time at which the elastic modulus (G') became greater than 1 Pa was considered as the gelation point. Each experiment was triplicated.

2.6.2.2. Multiple light scattering for the monitoring of milk gelation

The aggregation of the MC-curcumin dispersions after GDL addition was followed by multiple light scattering measurements using a Turbiscan Classic MA2000 apparatus (Formulation, France) operating with a pulsed near infrared light source at 850 nm. Backscattered intensities all along the sample, more precisely between 15 and 45 mm above the bottom of the test tube, were then recorded every 5 min after GDL addition (corresponding to time zero). With Turbisoft software (Formulation), the first scan recorded at time zero was subtracted from following scans in order to highlight temporal evolution of backscattered intensity (ΔBS). The entire Turbiscan device was thermostated at 20 °C. Turbiscan measurements were acquired 3 min after GDL addition and sample stirring. Assays were performed in triplicate.



3. Results and discussion

3.1. Spray -dried Control-MC and MC-curcumin powders colorimetry

The color of spray-dried Control-MC and MC-curcumin were determined by the CIEL*a*b* system. As expected since curcumin is mainly used as a food colorant, its presence modified the powder color. Control-MC powder was indeed white and showed a lightness L^* of 94.04 ± 0.80 , a redness a^* of -0.64 ± 0.01 and a yellowness b^* of 5.75 ± 0.20 , whereas MC-curcumin powder appeared yellow and showed a lightness L^* of 95.16 ± 1.00 , a redness a^* of -4.65 ± 0.07 and a yellowness b^* of 62.64 ± 0.90 (Table 1).

Résultats et Discussion

Table 1. Color parameters (L^* , a^* , b^* , C^* , H^* , ΔE (total color difference)) and pictures of spray-dried control micellar casein and curcumin-doped micellar casein powders.

	L^* (lightness)	a^* (redness)	b^* (yellowness)	C^* (chroma)	H^* (hue angle)	Aspect
Control-MC	94.04 ± 0.80	-0.64 ± 0.01	5.75 ± 0.20	5.79 ± 0.12	96.42 ± 0.19	
MC-Curcumin	95.16 ± 1.00	-4.65 ± 0.07	62.64 ± 0.90	22.62 ± 0.90	96.36 ± 0.16	
ΔE (Color difference) = 57.04						

1

The high ΔE value of 57.04 indicated that the colors of Control-MC and MC-curcumin-doped powders were markedly different. Control-MC powder color should be yellow to slightly green based on its corresponding hue angle H^* of 96.42 ± 0.19 ; nevertheless its low chroma value C^* of 5.79 ± 0.12 explains the very low color saturation and so the powder appears white. MC-curcumin powder presents a hue angle H^* of 96.36 ± 0.16 corresponding to yellow slightly green; its chroma value C^* of 22.62 ± 0.90 reflects a high color saturation and so the powder appears yellow.

3.2. Comparison of powder particle morphology by ESEM

ESEM images of powders did not evidence any significant size or shape modification resulting from curcumin addition (Figure 1).

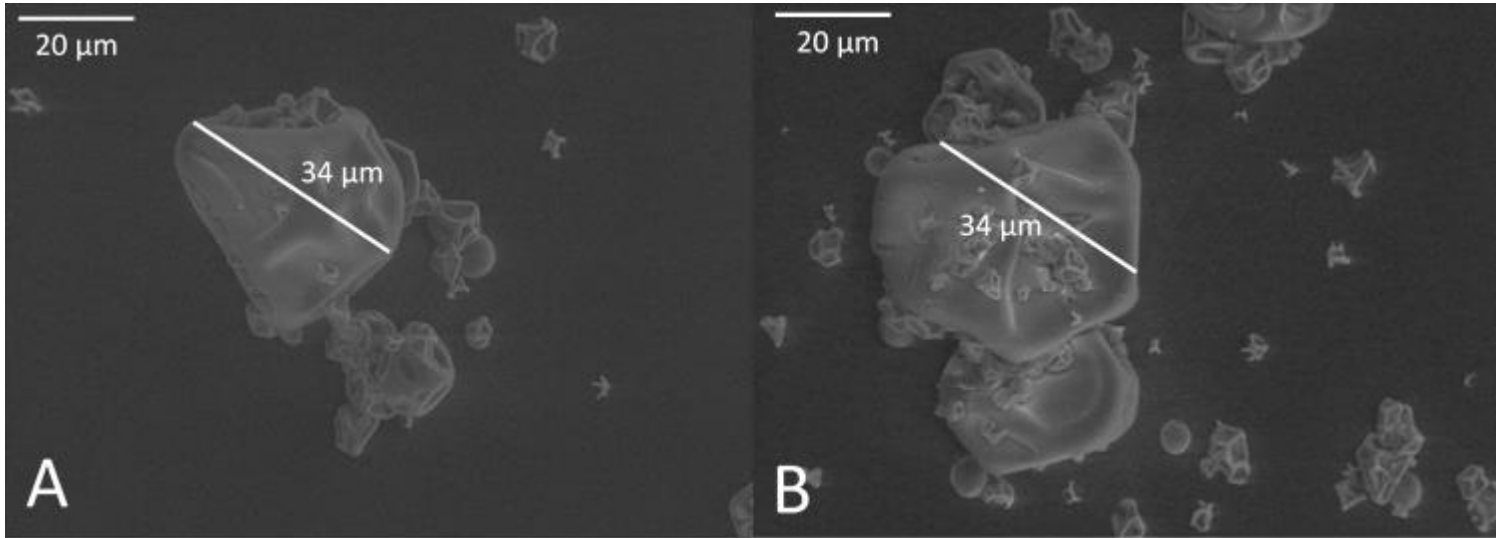


Figure 1. Environmental scanning electron microscopy micrographs of spray-dried (A) Control micellar casein (B) Curcumin-doped micellar casein powders. Magnification $\times 1000$.

All particles were wrinkled and non-spherical and the size of the largest population was about 30 μm . Sadek *et al.* (2014) demonstrated that particle structure was first governed by the composition of milk matrix³⁰. For example, the presence of caseins in the matrix is responsible for wrinkled, non-spherical and dense powder structures^{30,31}. Since the matrix here was constituted of caseins, Control-MC and MC-curcumin particles morphology presented in Figure 1 was in great agreement with expected shape features.

3.3. Hygroscopic properties of Control-MC and MC-curcumin powders

Furthermore, the sorption isotherms of spray-dried Control-MC and MC-curcumin were established and fitted using the GAB model (Figure 2).

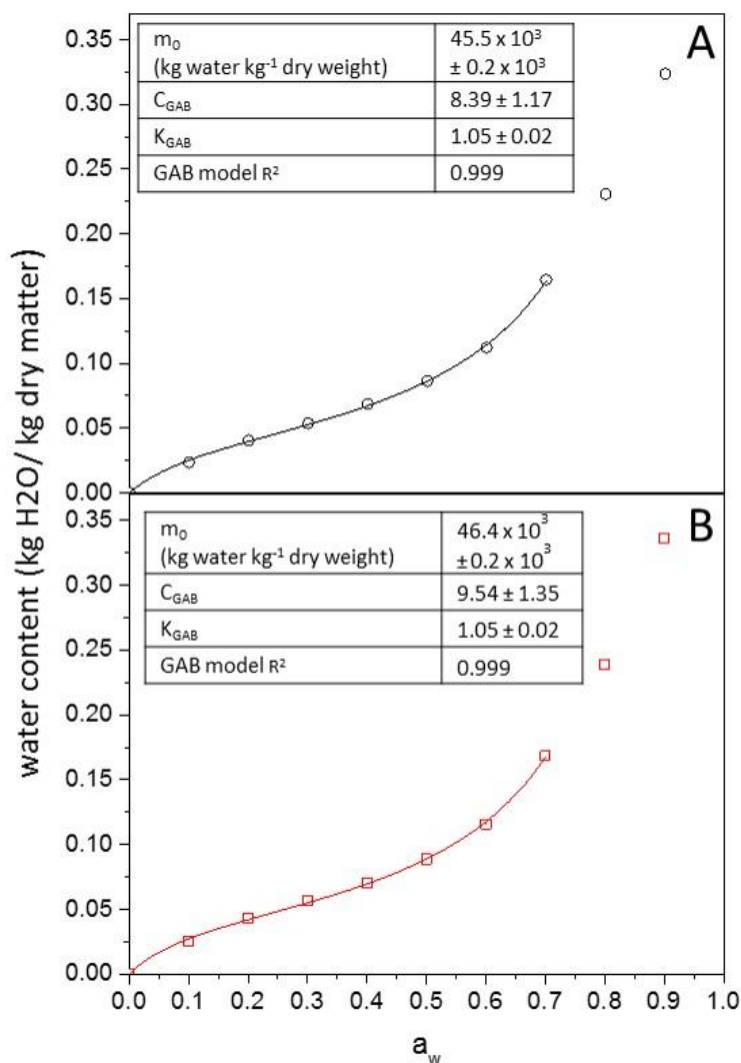


Figure 2. Sorption isotherm profiles recorded at 20 °C and fitted using the GAB model obtained for (A) spray-dried control micellar casein powder (black circles), and (B) curcumin-doped micellar casein powder (red squares). Experiments were done in triplicate at 20 °C and representative profiles are shown here.

Type II isotherms were obtained for all samples. Type II is conventionally divided into three zones. The first one corresponds to the strongly bound water monolayer and usually gives an idea of the hygroscopic character of the sample. The second zone ranging from 0.3 to 0.6 a_w , gathering the linear region, is related to capillary adsorbed water which is more loosely bound. The third zone, is linked to free water present in macrocapillaries ²⁷.

For both spray-dried Control-MC and MC-curcumin powders (Figure 2.A-B), the experimental data were well fitted with the GAB model ($R^2 = 0.999$ for both conditions) on a_w range from 0 to 0.7. The

water monolayer values (m_0) for Control-MC and MC-curcumin powders were close and respectively equal to $45.5 \cdot 10^{-3} \pm 0.16 \cdot 10^{-3}$ and $46.4 \cdot 10^{-3} \pm 0.16 \cdot 10^{-3}$ kg H₂O.kg⁻¹ dry matter. The C_{GAB} values related to monolayer water-binding energy were of the same order of magnitude and equaled to 8.39 ± 1.17 and 9.54 ± 1.35 for Control-MC and MC-curcumin respectively. A very close K_{GAB} value (1.05 ± 0.02) was obtained for both powders. High protein content dairy powders gave similar GAB constants^{32,33}. The slight differences in m_0 and C_{GAB} may reflect that less hydrophobic sites are available when curcumin is bound to casein, favoring interactions with water in curcumin-enriched MC powders. This is expected to lead to higher m_0 and C_{GAB} values for MC-curcumin than for Control-MC powders.

3.4. Study of micellar casein internal structure by SAXS for both spray-dried powders.

The influence of the presence of curcumin on the internal structure of spray-dried casein micelles has been studied by SAXS. Small angle scattering techniques (X-rays or neutrons) have been extensively used to study the structure of casein micelles dispersed in water³⁴. Nevertheless, to the best of our knowledge, only one study reported SAXS data on dry casein powders. The SAXS profiles obtained for spray-dried casein powders with and without encapsulated curcumin were similar and are presented in Figure 3.

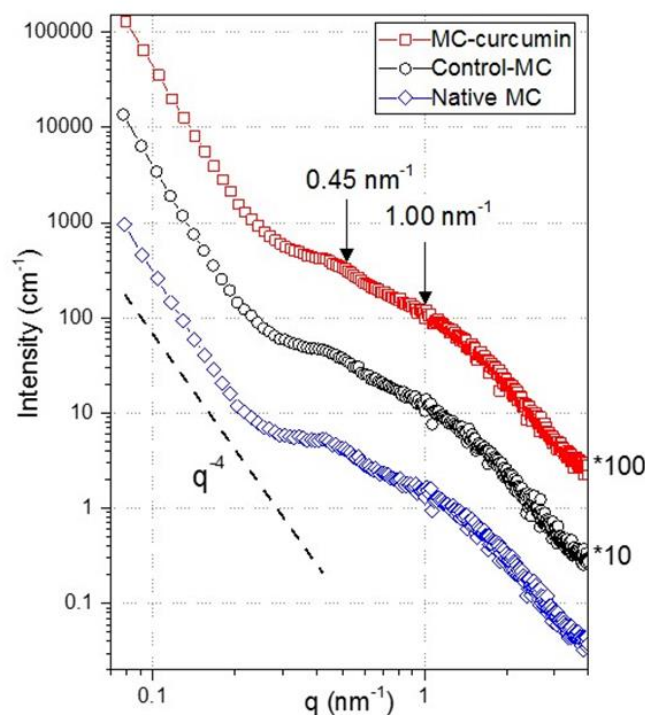


Figure 3. SAXS patterns of native micellar casein (blue diamonds), spray-dried control micellar casein (black circles) and curcumin-doped micellar casein (red squares) powders.

These scattering curves could be divided into three parts separated by two inflexion points. At low angles ($q < 0.2 - 0.3 \text{ nm}^{-1}$), a q^{-4} slope was detected corresponding to the signal of a smooth interface relevant to the casein micelles surface. An inflexion point was reported at $q = 0.45 \text{ nm}^{-1}$ related to the structure factor of calcium phosphate nanoclusters (i.e., mean distance between nanoclusters of calcium phosphate). The second inflexion point at 1.00 nm^{-1} was attributed to the form factor of these nanoclusters. In a previous paper, it was demonstrated that curcumin is encapsulated within the casein micelle without modifying its internal structure ¹⁴. In the present study, the presence of curcumin inside the casein micelles during the spray-drying process did not either modify their internal structure ¹⁴. Moreover, the SAXS profiles of both spray-dried powders and native MC powder did not present significant changes, shifts nor inflexion points. This indicates that the internal micellar structure was unaltered by spray-drying.

Knowing that the addition of curcumin did not modify neither the sorption behavior of both spray-dried Control-MC and MC-curcumin powders nor the internal structure of casein micelles, evaluating the retention level of encapsulated curcumin after spray-drying and its antioxidant activity (in comparison with free curcumin in solution) would be interesting.

3.5. Curcumin retention and antioxidant activity

After spray-drying, the MC-curcumin powder was rehydrated in phosphate buffer and curcumin concentration was determined at $0.041 \pm 0.01 \text{ mg.mL}^{-1}$, corresponding to $0.184 \pm 0.01 \text{ mg.g}^{-1}$ dry matter. Based on equation 3, curcumin retention rate was calculated at $97.35 \pm 1.02 \%$, meaning that the encapsulation of curcumin was highly efficient and that curcumin was not released from casein micelles during the spray-drying process.

Furthermore, the antioxidant activity of encapsulated curcumin in spray-dried MC was quantified *via* both ABTS and FRAP assays and compared to the antioxidant activity of a freshly prepared curcumin solution in ethanol, curcumin in phosphate buffer and curcumin encapsulated in fresh native MC (with contact times of one hour and overnight) prepared at the same concentration ($0.042 \pm 0.01 \text{ mg.mL}^{-1}$) and under the same conditions (incubation in dark). Data are displayed in Figure 4.

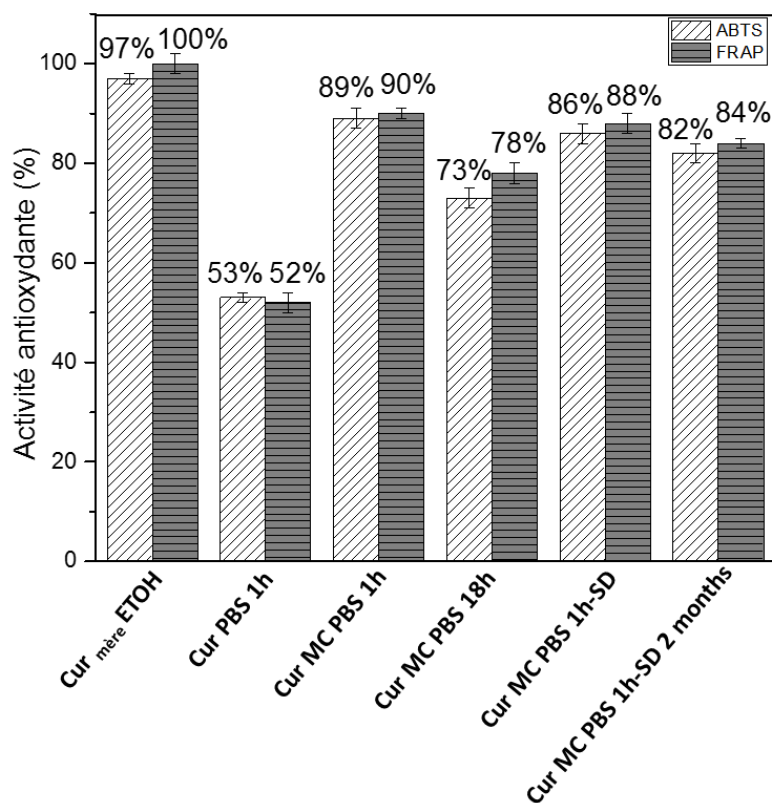


Figure 4. Antioxidant activity of encapsulated curcumin for native and spray-dried curcumin-doped micellar casein powders compared to fresh curcumin in ethanol and curcumin in phosphate buffer solution, quantified by ABTS and FRAP assays ($n = 3$). Fresh EtOH: fresh curcumin in ethanol, PBS 1h: curcumin added to PBS (1 h contact time), MC PBS 1h: curcumin added to native micellar caseins suspensions in phosphate buffer (1 h contact time), MC PBS 18h: curcumin added to native micellar caseins suspensions in phosphate buffer (18 h contact time), MC PBS 1h-SD: spray dried MC-curcumin powder suspensions in phosphate buffer (1 h contact time). MC PBS 1h-SD: spray dried MC-curcumin powder suspensions in phosphate buffer (1 h contact time) stored 2 months at 40 °C.

When curcumin is freshly prepared in ethanol, its antioxidant activity reached 97.6 ± 1.2 % in ABTS and 100.2 ± 0.6 % in FRAP assays as expected. When curcumin is added to phosphate buffer for 1 h, its antioxidant activity decreases to 52.0 ± 1.0 % for ABTS assay and 51.5 ± 2.0 % for FRAP assay. This decrease in antioxidant activity is the result of the alteration of curcumin in phosphate buffer as already reported in the literature ³⁵. In fact, when the pH is neutral, proton are removed from the phenolic group lead to the destruction of curcumin structure, lowering its antioxidant activity. The encapsulation of curcumin in MC was expected to help protecting its antioxidant activity. In fact, when curcumin was added to MC dispersions and agitated for 1 h, its antioxidant activity reached 89.0 ± 2.1

% and 89.8 ± 2.1 % for ABTS and FRAP assays respectively. When the contact time was increased to 18 h (overnight), curcumin antioxidant activity decreased to 73.1 ± 2.1 % and 78.7 ± 2.0 % for ABTS and FRAP assays respectively. The encapsulation of curcumin under its aqueous form in MC dispersions helped protecting the bioactive from degradation in phosphate buffer but its degradation nevertheless increased with time. Moreover, when curcumin was added to MC dispersion in PBS buffer during 1 h and then spray-dried, it presented a lower decrease in antioxidant activity than after overnight rehydration without spray-drying. In fact, despite a limited curcumin content in the powder ($0.181 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry matter), ABTS and FRAP assays respectively showed 86.8 ± 2.0 % and 88.7 ± 2.0 % antioxidant activity after spray-drying. The reported differences between curcumin in phosphate buffer and curcumin encapsulated in MC (whether it was spray-dried or not) indicated that the encapsulation process actually protected curcumin from losing its antioxidant activity and lowered its vulnerability in aqueous media. Such a lower decrease in antioxidant activity by encapsulation of bioactives was noticed in other studies as well but with emulsions or liposomes^{36–38}. Moreover, the powder of curcumin-enriched MC was stored at 40 °C during two months to evaluate the antioxidant activity of curcumin after storage. During this time of storage, the antioxidant activity of curcumin measured by ABTS and FRAP was preserved with a percentage of 82 ± 2.0 % and 84 ± 1.1 % respectively. The preservation of antioxidant activities of MC-curcumin particles also implied the effectiveness of curcumin to donate its hydrogen atom to oxygen radicals. The high retention rate of curcumin and the preservation of its antioxidant activity confirmed that micellar casein encapsulation in hydrated casein micelles followed by spray-drying is a relevant approach for drying heat-sensitive polyphenols. Indeed, the combination of short residence times with relatively low temperature surrounding droplets/particles in the course of the drying process (as long as the surface of the droplet/particle remains humid, the temperature of the surrounding air equals the humid air temperature, which, for an inlet air temperature of 180 °C, does not exceed 45 °C) limits the extent of heat denaturation of bioactives.

Résultats et Discussion

Knowing that the obtained spray-dried MC-curcumin powder preserved its antioxidant activity and that two of the main techno-functional properties of micellar casein are its rehydration behavior and its ability to form gels, it would be interesting to evaluate the influence of curcumin addition on its rehydration behavior and sol-gel transition.

3.6. Techno-functional properties of Control-MC and MC-curcumin powders

3.6.1. Rehydration kinetics of spray-dried Control-MC and MC-curcumin powders

Rehydration properties of MC powders is an essential techno-functional property for application purposes. Before studying the evolution of powder granulometry upon reconstitution in water, the particle size distribution of investigated powders has been evaluated at dry state (Figure 5.A). The mean diameters (D50, calculated after subtracting the contribution of Fontainebleau sand) equaled 32.7 ± 1.1 and 31.1 ± 0.7 μm for spray-dried Control-MC and MC-curcumin powders, respectively. These particles size were well consistent with the results obtained by ESEM (Figure 1).

Volume-based particles size distributions of Control-MC and MC-curcumin upon reconstitution at 20 °C are displayed in Figure 5.B-C and the corresponding D50 evolution was reported in Figure 5.D.

Similar particle size distributions were obtained for Control-MC and MC-curcumin powders. The granulometric measurements revealed particle size increases from 65.3 to 73.7 μm and from 47.6 to 58.5 μm for Control-MC and MC-curcumin, respectively, which could be attributed to a swelling of casein powders upon water uptake. The swelling of Control-MC (instantly) was quicker than the swelling of MC-curcumin that took around 30 min (Figure 5.D). This joins the hygroscopic properties of MC-curcumin powder, where less hydrophobic sites are available owing to curcumin binding to casein, favoring interactions with water in curcumin-enriched MC powders. From the time of particle swelling (30 min) until around 350 min for Control-MC and 250 min for MC-curcumin, respectively, a slow particle size decreases to 36.8 and 37.8 μm (Figure 5.D). This may correspond to a slow fragmentation of the protein particle. Then, in the last stage of casein rehydration (from 350 to 470 min for Control-MC and from 250 to 430 min for MC-curcumin), D50 decreased to about 0.7 μm , which corresponds

to the casein micelles profile. This signal corresponds to casein micelles liberated from powder particles. After the disappearance of large particles and the appearance of casein micelles (Figure 5.B), the particle size distributions remained unchanged up to 800 min reconstitution time and the D50 remained around 0.76 and 0.72 μm for Control-MC and MC-curcumin powders, respectively (Figure 5.D). The dispersion stage was already evidenced for MC powders rehydrated in water monitoring rheological changes during native phosphocaseinate powder dissolution (turbidity profiles) ³⁹. Moreover, this phenomenon was also observed for milk protein concentrate powders ⁴⁰. These authors also depicted the very slow dispersion of this powder. In the end, our results agreed well with the rehydration behavior of native micellar caseins as reported in the literature where authors depicted four phases in powder reconstitution: wetting, swelling, dispersion and finally dissolution ^{31,33}. And so, spray-dried Control-MC and MC-curcumin powders did not show any significant difference in their rehydration behavior.

3.6.2. Gelation abilities of spray-dried Control-MC and MC-curcumin powders measured by multiple static light scattering and rheological measurements

The sol–gel transition of rehydrated spray-dried MC powders acidified with GDL was followed by the temporal evolution of the relative backscattered intensity (ΔBS) all along the sample height. 150 min after GDL addition, an increase of ΔBS was reported for the whole sample height, corresponding to MC aggregation. Indeed, this evolution of intensity of scattered light is known to be attributed to change in particle size, which affect all particles whatever their position (height) in the sample (Figure 6).

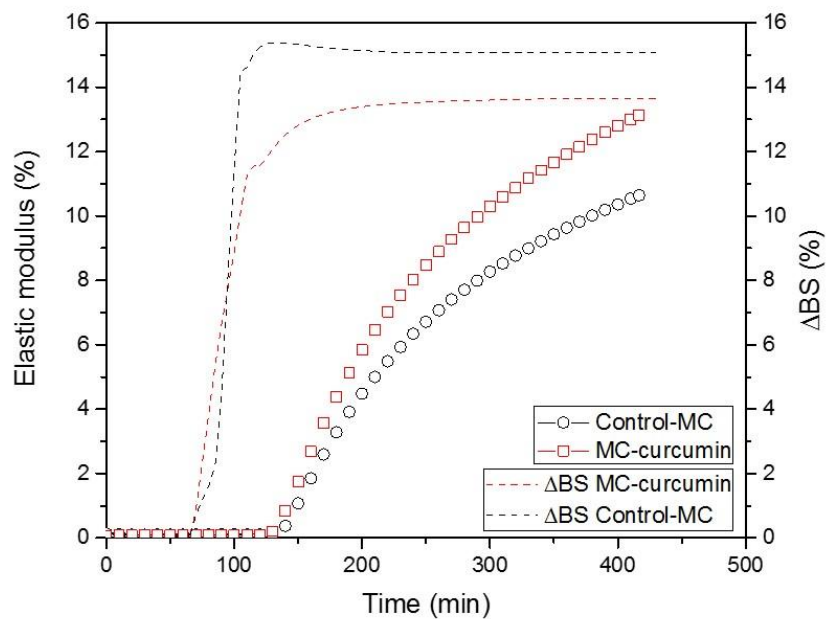


Figure 6. Evolution upon GDL acidification of elastic modulus and Δ BS averaged between 15 and 45 mm sample height of Control-micellar casein and curcumin-doped micellar casein powders reconstituted at 20 °C.

Indeed, Δ BS increased rapidly 150 min after GDL addition and reached, around 250 min, 15.1 % and 13.5 % for Control-MC and MC-curcumin respectively. For both powders, suspended micellar caseins started aggregating at the same time 70 min. The addition of curcumin did not significantly modify the Δ BS percentage, and so, MC aggregation behavior was similar whether curcumin was present or not. Additionally, the temporal evolution of the elastic modulus (Figure 6) shows that gelation (sol-gel transition) occurred 145 - 150 min after GDL addition for both powders with or without curcumin. The final elastic modulus (reached 400 min after GDL addition) for MC-curcumin was slightly higher than the one obtained for Control-MC (12.8 Pa vs. 10.4 Pa, respectively). In fact, MC-curcumin presents smaller aggregated particles (Figure 5) leading to a lower Δ BS percentage and a stronger gel formation. Thus, curcumin addition did not significantly affect neither the gelation time nor the strength of the acid gel. This evidenced that curcumin encapsulation in casein micelles did not alter the gelation properties of MC. This is consistent with a previous work showing that its physicochemical properties such as size, structure and charge were not modified upon curcumin addition ¹⁴.

4. Conclusion

Micellar casein powder containing curcumin was obtained by spray-drying. MC-curcumin powder was slightly yellow and presented a wrinkled non spherical particle morphology, characteristic of high protein content powders. Curcumin addition did not modify physical properties of micellar casein such as their sorption behavior. Also, SAXS profiles demonstrated that the curcumin addition did not alter the internal structure of casein micelle even after spray-drying. Moreover, the spray-drying process did not alter the antioxidant properties of encapsulated curcumin: the obtained powders displayed high curcumin retention rates (> 95 %) and high antioxidant activity preservation (86 % for ABTS and 88 % for FRAP assays after spray-drying vs. 89 % and 90 % before spray-drying). Moreover, the antioxidant activity of curcumin measured by ABTS and FRAP was preserved during storage at 40 °C for 60 days with a percentage of 82 ± 2.0 % and 84 ± 1.1 % respectively. Curcumin-doped powders presented also similar features to classical casein powders in terms of reconstitution and gelation abilities. No modification on the sol-gel transition compared to undoped Control-MC was observed. This study demonstrates the interest of curcumin encapsulated in MC matrix to serve as an active food ingredient available in a powder state in several food formulations. Further studies on how curcumin would act in a more complex dairy medium (such as yoghurt or cheese), where lactic acid bacteria and proteins coexist, should be performed to enlighten on the potential of casein micelles to act as delivery systems for natural bioactives.

Conflicts of interest

No conflict of interest to be stated.

Acknowledgments

Authors would like to thank Marie-José Stébé and Marianne Impéror for their help during SAXS experiments, Sandrine Mathieu for her help during ESEM and Carole Perroud for her technical support. This study was supported by grants from Region Lorraine and Université de Lorraine (Program CPER 5, Nutralor). All of these are gratefully acknowledged.

5. References

- 1 Okuro PK, Furtado GF, Sato ACK, Cunha RL. Structures design for protection and vehiculation of bioactives. *Curr Opin Food Sci* 2015; **5**: 67–75.
- 2 Aguiar J, Estevinho BN, Santos L. Microencapsulation of natural antioxidants for food application – The specific case of coffee antioxidants – A review. *Trends Food Sci Technol* 2016; **58**: 21–39.
- 3 Livney YD. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2010; **15**: 73–83.
- 4 Elzoghby AO, Abo El-Fotoh WS, Elgindy NA. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. *J Controlled Release* 2011; **153**: 206–216.
- 5 Holt C. Unfolded phosphopolypeptides enable soft and hard tissues to coexist in the same organism with relative ease. *Curr Opin Struct Biol* 2013; **23**: 420–425.
- 6 Considine T, Patel HA, Anema SG, Singh H, Creamer LK. Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments — A Review. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2007; **8**: 1–23.
- 7 Ye R, Harte F. High pressure homogenization to improve the stability of casein–hydroxypropyl cellulose aqueous systems. *Food Hydrocoll* 2014; **35**: 670–677.
- 8 Levinson Y, Ish-Shalom S, Segal E, Livney YD. Bioavailability, rheology and sensory evaluation of fat-free yogurt enriched with VD3 encapsulated in re-assembled casein micelles. *Food Funct* 2016; **7**: 1477–1482.
- 9 Jarunlumlert T, Nakagawa K, Adachi S. Influence of aggregate structure of casein on the encapsulation efficiency of β -carotene entrapped via hydrophobic interaction. *Food Struct* 2015; **5**: 42–50.
- 10 Rahimi Yazdi S, Corredig M. Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. *Food Chem* 2012; **132**: 1143–1149.
- 11 Haratifar S, Corredig M. Interactions between tea catechins and casein micelles and their impact on renneting functionality. *Food Chem* 2014; **143**: 27–32.

- 12 Ghasemi S, Abbasi S. Formation of natural casein micelle nanocapsule by means of pH changes and ultrasound. *Food Hydrocoll* 2014; **42**: 42–47.
- 13 Pan K, Zhong Q, Baek SJ. Enhanced Dispersibility and Bioactivity of Curcumin by Encapsulation in Casein Nanocapsules. *J Agric Food Chem* 2013; **61**: 6036–6043.
- 14 Khanji AN, Michaux F, Jasniewski J, Petit J, Lahimer E, Cherif M *et al.* Structure and gelation properties of casein micelles doped with curcumin under acidic conditions. *Food Funct* 2015; **6**: 3624–3633.
- 15 Gryniewicz G, Slifirski P. Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. *Acta Biochim Pol* 2012; **59**: 201.
- 16 Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IMA, Chin D, Wagner AE, Rimbach G. Curcumin—From Molecule to Biological Function. *Angew Chem Int Ed* 2012; **51**: 5308–5332.
- 17 Gupta SC, Kismali G, Aggarwal BB. Curcumin, a component of turmeric: From farm to pharmacy. *BioFactors* 2013; **39**: 2–13.
- 18 Indira Priyadarsini K. Chemical and Structural Features Influencing the Biological Activity of Curcumin. *Curr Pharm Des* 2013; **19**: 2093–2100.
- 19 Pinheiro AC, Coimbra MA, Vicente AA. In vitro behaviour of curcumin nanoemulsions stabilized by biopolymer emulsifiers – Effect of interfacial composition. *Food Hydrocoll* 2016; **52**: 460–467.
- 20 Zou L, Zheng B, Zhang R, Zhang Z, Liu W, Liu C *et al.* Enhancing the bioaccessibility of hydrophobic bioactive agents using mixed colloidal dispersions: Curcumin-loaded zein nanoparticles plus digestible lipid nanoparticles. *Food Res Int* 2016; **81**: 74–82.
- 21 Borrin TR, Georges EL, Moraes ICF, Pinho SC. Curcumin-loaded nanoemulsions produced by the emulsion inversion point (EIP) method: An evaluation of process parameters and physico-chemical stability. *J Food Eng* 2016; **169**: 1–9.
- 22 Barui S, Saha S, Mondal G, Haseena S, Chaudhuri A. Simultaneous delivery of doxorubicin and curcumin encapsulated in liposomes of pegylated RGDK-lipopeptide to tumor vasculature. *Biomaterials* 2014; **35**: 1643–1656.

Résultats et Discussion

- 23 Sari TP, Mann B, Kumar R, Singh RRB, Sharma R, Bhardwaj M *et al.* Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocoll* 2015; **43**: 540–546.
- 24 Tikekar RV, Pan Y, Nitin N. Fate of curcumin encapsulated in silica nanoparticle stabilized Pickering emulsion during storage and simulated digestion. *Food Res Int* 2013; **51**: 370–377.
- 25 Liu W, Chen XD, Cheng Z, Selomulya C. On enhancing the solubility of curcumin by microencapsulation in whey protein isolate via spray drying. *J Food Eng* 2016; **169**: 189–195.
- 26 MacDougall DB (ed.). *Colour in food: improving quality*. Woodhead Publishing: Boca Raton, Fla. CRC Press Cambridge, 2002.
- 27 Mathlouthi M. Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. *Food Control* 2001; **12**: 409–417.
- 28 Re R. ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; : 1231–1237.
- 29 Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; **239**: 70–76.
- 30 Sadek C, Li H, Schuck P, Fallourd Y, Pradeau N, Le Floch-Fouéré C *et al.* To What Extent Do Whey and Casein Micelle Proteins Influence the Morphology and Properties of the Resulting Powder? *Dry Technol* 2014; **32**: 1540–1551.
- 31 Gaiani C, Scher J, Ehrhardt JJ, Linder M, Schuck P, Desobry S *et al.* Relationships between Dairy Powder Surface Composition and Wetting Properties during Storage: Importance of Residual Lipids. *J Agric Food Chem* 2007; **55**: 6561–6567.
- 32 Kelly GM, O’Mahony JA, Kelly AL, Huppertz T, Kennedy D, O’Callaghan DJ. Influence of protein concentration on surface composition and physico-chemical properties of spray-dried milk protein concentrate powders. *Int Dairy J* 2015; **51**: 34–40.
- 33 Gaiani C, Banon S, Scher J, Schuck P, Hardy J. Use of a Turbidity Sensor to Characterize Micellar Casein Powder Rehydration: Influence of Some Technological Effects. *J Dairy Sci* 2005; **88**: 2700–2706.

- 34 Ingham B, Smialowska A, Erlangga GD, Matia-Merino L, Kirby NM, Wang C *et al.* Revisiting the interpretation of casein micelle SAXS data. *Soft Matter* 2016; **12**: 6937–6953.
- 35 Wang Y. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997; : 1867–1876.
- 36 Altunkaya A, Becker EM, Gökmen V, Skibsted LH. Antioxidant activity of lettuce extract (*Lactuca sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. *Food Chem* 2009; **115**: 163–168.
- 37 Capitani CD, Carvalho ACL, Botelho PB, Carrapeiro MM, Castro IA. Synergism on antioxidant activity between natural compounds optimized by response surface methodology. *Eur J Lipid Sci Technol* 2009; **111**: 1100–1110.
- 38 Sørensen A-DM, Haahr A-M, Becker EM, Skibsted LH, Bergenståhl B, Nilsson L *et al.* Interactions between Iron, Phenolic Compounds, Emulsifiers, and pH in Omega-3-Enriched Oil-in-Water Emulsions. *J Agric Food Chem* 2008; **56**: 1740–1750.
- 39 Gaiani C, Scher J, Schuck P, Hardy J, Desobry S, Banon S. The dissolution behaviour of native phosphocaseinate as a function of concentration and temperature using a rheological approach. *Int Dairy J* 2006; **16**: 1427–1434.
- 40 Mimouni A, Deeth HC, Whittaker AK, Gidley MJ, Bhandari BR. Rehydration process of milk protein concentrate powder monitored by static light scattering. *Food Hydrocoll* 2009; **23**: 1958–1965.

6. Contribution de l'article

L'atomisation ou spray drying a permis la production d'une poudre de caséines micellaires dopées en curcumine de couleur jaune comparée à la poudre témoin obtenue en absence de curcumine. Les isothermes de sorption des deux poudres issues de l'atomisation sont de type II caractéristique d'un milieu non poreux ou macroporeux dans lequel l'adsorption est traduite par une multicouche d'eau adsorbée. Le profil en sigmoïde obtenu pour les deux poudres est typique d'une poudre riche en protéines et plus spécifiquement en caséines micellaires. La modélisation des isothermes réalisée selon le modèle de Guggenheim-Anderson-de Boer ou GAB a permis de calculer les constantes K_{GAB} , C_{GAB} et m_0 caractéristiques de poudres à forte teneur protéique. Cependant, les valeurs de C_{GAB} et de m_0 étaient légèrement supérieures pour la poudre dopée en curcumine (MC-curcumine) que pour la poudre témoin. En effet, moins de sites hydrophobes seraient disponibles lorsque la curcumine est liée à la caséine, ce qui favorise les interactions avec l'eau dans les poudres enrichies en polyphénol.

Les profils de diffusion des rayons-X aux petits angles ont permis d'évaluer l'effet de l'atomisation et de l'ajout de la curcumine aux micelles de caséines sur la structure de ces dernières. Les profils des poudres atomisées et celui de la poudre de caséine native se superposent. Aucun déplacement de la position des points d'inflexion et aucune modification des pentes n'a été observée. Ainsi, ni l'ajout de la curcumine aux caséines micellaires ni l'atomisation n'influencent la structure interne de la micelle.

L'activité antioxydante de la curcumine après atomisation a été déterminée par les tests ABTS et FRAP. Une comparaison des activités antioxydantes de la curcumine libre dans un tampon phosphate (milieu de dispersion des caséines micellaires dans lequel le polyphénol n'est pas soluble), de la curcumine ajoutée à une dispersion caséique avant et après atomisation, fut nécessaire pour l'évaluation de l'effet protecteur des micelles de caséines lors du procédé d'atomisation. D'une part, il s'est avéré que l'encapsulation de la curcumine dans les micelles de caséines sous forme d'une poudre dopée protège l'activité antioxydante de ce bioactif contre la dégradation. En effet, une diminution de l'activité antioxydante est observée lorsque la curcumine est libre dans le tampon. D'autre part, quand la curcumine

est ajoutée aux dispersions caséiques en phase aqueuse, son activité décroît avec le temps. Cela souligne l'avantage que porte la production d'une poudre dopée au sein de laquelle l'activité antioxydante du polyphénol est préservée et stable dans le temps et plus précisément pendant $8,82 \times 10^3$ jours.

Les propriétés technofonctionnelles de la poudre dopée de curcumine produite par atomisation ont ensuite été étudiées et comparées à celles des poudres témoin atomisée et native non atomisée.

Les profils de réhydratations de la poudre témoin et de la poudre dopée sont similaires et peuvent être décrits en quatre étapes typiques de la réhydratation d'une poudre caséique : gonflement instantané des particules suivi d'un mouillage, d'une dispersion et enfin d'une dissolution progressive des grandes particules au cours du temps et l'apparition des micelles de caséines. Aucune différence n'a été signalée entre les poudres atomisées témoin et dopée en curcumine.

La transition sol-gel des poudres témoin et dopée en curcumine réhydratées et acidifiées par GDL a été suivie. Aucun changement de point de gel n'a été noté. L'ajout de curcumine n'a ni influencé le profil d'agrégation des caséines micellaires suivi par turbidimétrie ni le temps de gélification protéique.

Cette étude a ainsi permis la production d'une poudre de micelles de caséines dopées en curcumine, de couleur jaune et qui présente les mêmes comportements de sorption, de réhydratation et de gélification qu'une poudre caséique témoin. L'ajout de la curcumine ainsi que le procédé d'atomisation n'ont pas altéré la structure de la micelle de caséine. L'encapsulation de la curcumine dans les micelles de caséines sous forme de poudre a permis la protection de l'activité antioxydante du bioactif. L'étude du comportement de la curcumine dans un milieu encore plus complexe tel que le yaourt, où les bactéries lactiques régissent l'acidification du milieu et où les protéines sériques sont présentes, s'avèrerait intéressante pour une éventuelle application technologique.

Conclusion et perspectives

Conclusion générale et perspectives

La micelle de caséine est un composant-clé du lait de par son rôle biologique et fonctionnel (apport nutritionnel, digestibilité, aptitudes technologiques). Cette suprastructure colloïdale présente une grande stabilité face aux traitements technologiques (traitements thermiques, hautes pressions, cisaillement...). La micelle possède de nombreuses propriétés technofonctionnelles et est fortement utilisée en industrie alimentaire sous forme d'épaississant ou d'émulsifiant. Cependant, la structure de la micelle de caséine reste un sujet de discussion et fait encore débat en dépit des nombreux travaux qui lui ont été consacrés. En plus de son fort apport nutritionnel, de sa stabilité et de ses nombreuses propriétés fonctionnelles, la micelle de caséine constitue une matrice d'encapsulation de bioactifs très efficace et fortement étudiée. Elle présente un fort potentiel de protection contre la dégradation suite au stress environnemental (fluctuations de température, pH, force ionique du milieu, lumière...) et augmente la stabilité et la concentration des bioactifs hydrophobes dans les solutions aqueuses impliquant une meilleure biodisponibilité de ces molécules. Son aptitude à former des gels lui confère une propriété unique renforçant son profil de matrice.

Le premier objectif de de cette thèse était d'étudier l'interaction entre la micelle de caséine avec un bioactif hydrophobe modèle, la curcumine. Plusieurs questions scientifiques ont été soulevées sur le type d'interaction entre la curcumine et les caséines micellaires ainsi que l'influence de la présence d'un composé phénolique sur la structure micellaire et sur ses propriétés de gélification.

L'étude des interactions entre la micelle de caséine et la curcumine par fluorescence a permis de répondre aux deux premières questions soulevées. En effet, la curcumine interagit avec les résidus tryptophane de la micelle *via* des interactions hydrophobes et les constantes de Stern-Volmer K_{SV} et d'association K_b ont été déterminées. A des valeurs de pH de 7,4 et de 6,5, la constante de *quenching* K_{SV} a été respectivement évaluée à $18,2 \pm 0,2 \times 10^4$ et à $18,8 \pm 0,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, valeurs en accord avec celles reportées dans la littérature. L'augmentation de température de 20 à 35 °C a conduit à une augmentation de la constante de liaison K_b d'environ 10 fois augmentant ainsi de 0,6 à $6,57 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Conclusion et perspectives

L'augmentation de K_b est associée aux interactions hydrophobes qui sont de plus en plus importantes avec l'augmentation de la température (thermo-entropie). Sachant que les deux composants interagissaient, l'influence de l'ajout de curcumine sur la structure interne et externe de la micelle de caséine a été étudiée par des mesures de mobilité électrophorétique, de taille et de diffusion des rayons-X aux petits angles. Les résultats obtenus par diffusion dynamique de la lumière n'ont montré aucun changement de la taille de la micelle. Tous les signaux mesurés par diffusion des rayons-X aux petits angles étant superposés, la structure interne de la micelle de caséine n'a pas non plus été modifiée. Ainsi, dans les concentrations étudiées, la curcumine interagirait avec la micelle de caséine sans changement de sa structure. Par la suite, l'étude de l'influence de l'ajout de curcumine sur les propriétés technofonctionnelles de la micelle s'est imposée. Une fois de plus, une relation étroite entre la structure et les propriétés fonctionnelles a été établie. En effet, les mesures rhéologiques et de diffusion multiple de la lumière n'ont montré aucun changement de point, de temps et de force de gel ni d'agrégation pré-gel. Par conséquent, l'ajout de la curcumine aux concentrations étudiées ne modifie pas les propriétés de gélification de la micelle de caséine.

Sachant que la curcumine interagit avec les micelles de caséines sans modifier les propriétés structurales et technofonctionnelles de cette dernière, et que les MC sont les protéines laitières de base permettant la formation d'un gel de type yaourt, un deuxième objectif portait sur l'étude de l'interaction de la curcumine avec les bactéries lactiques du yaourt pour une éventuelle application technologique et la production d'un yaourt à valeur ajoutée. En effet, de nombreuses études dans la littérature reportent une activité antibactérienne de la curcumine sur de nombreuses souches. Plusieurs questions scientifiques ont été soulevées sur l'existence d'une interaction entre curcumine et LAB et sur l'existence d'une certaine répartition de la curcumine entre MC et LAB.

Des observations en microscopie à épifluorescence ont démontré une interaction entre la curcumine et les deux bactéries lactiques *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. Les deux bactéries seules, ne fluoresçant pas aux longueurs d'ondes utilisées pour faire fluorescer la

curcumine, étaient invisibles par microscopie d'épifluorescence. Elles deviennent visibles *via* la fluorescence du composé phénolique traduisant ainsi une interaction entre la curcumine et l'enveloppe bactérienne des deux souches. De plus, lorsque les deux bactéries sont mises en mélange et dans un milieu contenant de la curcumine, le bioactif se partage entre les enveloppes des deux bactéries avec une adsorption préférentielle pour *Streptococcus thermophilus*. Le test d'adhésion aux solvants (MATS) a montré que *Streptococcus thermophilus* possède une enveloppe bactérienne plus hydrophobe que celle de *Lactobacillus bulgaricus* ce qui pourrait expliquer cette plus grande affinité pour *Streptococcus thermophilus*. En effet, la curcumine étant une molécule hydrophobe, il semble logique qu'elle s'adsorbe préférentiellement sur la surface la plus hydrophobe. Puisque la curcumine interagit avec les bactéries lactiques du yaourt, son activité antimicrobienne a été déterminée : aucun effet inhibiteur sur la croissance de ces bactéries lactiques n'a été observé aux concentrations mises en œuvre dans cette étude. En effet, la concentration minimale d'inhibition est 10 à vingt fois plus élevée que la concentration de curcumine utilisée dans notre étude (5 μ M). Les interactions curcumine-bactéries lactiques du yaourt ont aussi été confirmées par des mesures de fluorescence en présence de MC. Les différents spectres de fluorescence et de *quenching* de fluorescence ont permis de confirmer l'interaction curcumine-*S.thermophilus* et curcumine-*L.delbrueckii* mais aussi de déterminer la répartition de la curcumine lorsqu'elle se trouve en contact avec les trois composants dans un même milieu : *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* et les caséines micellaires. Les résultats ont confirmé une interaction préférentielle entre la curcumine et *Streptococcus thermophilus*. Lorsque la curcumine est encapsulée avec les MC et que les bactéries sont ajoutées, une répartition de la curcumine se fait de manière à établir un équilibre entre les trois composants. La curcumine est transférée en partie, de la micelle vers les enveloppes bactériennes. A partir de toutes ces observations, il est apparu nécessaire d'étudier l'influence de la curcumine sur les propriétés d'acidification de ces deux bactéries lactiques pour la production de yaourt. Les mesures de rhéologie et de turbidimétrie ont démontré que la curcumine n'influençait ni la gélification du lait, ni le point de gel, ni la fermeté de ce dernier et n'altérait pas les propriétés d'acidification de *L.delbrueckii*

Conclusion et perspectives

et de *S.thermophilus*. L'ajout de la curcumine dans un milieu modèle conduisant à un gel type-yaourt n'influencerait ni l'activité bactérienne d'acidification ni la formation du gel ce qui constitue un véritable atout à l'application technologique et à la production de yaourt à valeur ajoutée. Il est important de noter que la concentration en curcumine choisie (10 %) est de l'ordre de grandeur de celles habituellement utilisées dans les aliments. Par exemple, les teneurs en pigment sont variables en fonction des fournisseurs de préparation mais globalement la curcumine est utilisée avec des teneurs de 8% environ pour le yaourt.

Une fois la curcumine ajoutée à du lait, elle risque de subir des altérations suite aux nombreux traitements de préparation de l'aliment, aux procédés de transformation ou aux diverses contraintes que peut imposer le stockage. Par ailleurs, les protéines laitières sont souvent utilisées en industrie sous forme de poudre dans diverses formulations. Le troisième objectif de cette thèse était la production d'une poudre de caséine dopée en curcumine. Plusieurs questions scientifiques ont été soulevées concernant la préservation de l'activité antioxydante de la curcumine et sur la conservation des propriétés technofonctionnelles de la poudre micellaire dopée.

Le procédé d'atomisation a permis la production d'une poudre micellaire enrichie curcumine à partir de dispersion de caséines micellaires dopées en curcumine. L'ajout de la curcumine a permis la production d'une poudre de couleur jaune à la différence de la poudre témoin blanche. La curcumine étant un composé hydrophobe, son influence sur les propriétés hygroscopiques de la poudre, sur la structure micellaire ainsi que sur les propriétés technofonctionnelles telles que la réhydratation et la gélification a été évaluée. L'ajout de curcumine conduit à une conservation aussi bien de la structure micellaire que des propriétés fonctionnelles de la MC. Un des objectifs était la production d'une poudre de caséines micellaires qui pourrait protéger l'activité antioxydante du bioactif en question. Une comparaison des activités antioxydantes de la curcumine libre dans un tampon phosphate, de la curcumine ajoutée à une dispersion caséique en phase aqueuse et de la curcumine encapsulée après atomisation, fut nécessaire pour l'évaluation de l'effet protecteur de la poudre dopée. Les tests

antioxydants par ABTS et FRAP ont montré que l'encapsulation de la curcumine dans les micelles de caséines en produisant une poudre enrichie, protège l'activité antioxydante de ce bioactif contre la dégradation : la curcumine encapsulée présente alors un pourcentage d'activité de 88 % contre 57 % dans un tampon phosphate de référence à pH 7,4. D'autre part, la curcumine est instable quand elle est ajoutée sous forme liquide aux dispersions caséiques. En effet, l'activité du bioactif décroît avec le temps en passant de 90 % à 73 % pendant 18h. Cela souligne l'avantage apporté par la production d'une poudre enrichie en curcumine dans laquelle l'activité antioxydante de cette dernière reste stable dans le temps. En effet, des études de vieillissement ont permis de montrer que la poudre enrichie en curcumine conserve son activité antioxydante à 88 % durant 2 mois de vieillissement accéléré à 40 °C ce qui équivaut à un stockage de 10 mois à 4 °C.

Ces différents travaux ont contribué à une meilleure connaissance de l'interaction entre un bioactif et des micelles de caséines et également à la mise en évidence de l'interaction entre la curcumine et des bactéries lactiques et ainsi que l'établissement d'un équilibre dans un milieu modèle lait. Il a été possible d'ajouter de la curcumine à 5 μ M qui n'inhibe pas les bactéries lactiques du yaourt ni altère les propriétés de la MC tout en apportant de nouvelles fonctionnalités telles qu'une couleur jaune (on ajoute souvent de la curcumine quand les produits sont trop blancs) et une activité antioxydante importante. Ces travaux ont donc permis de proposer une piste innovante dans la production de yaourt à valeur ajoutée et à base protéique uniquement.

En ce qui concerne les perspectives de ce travail, elles sont multiples :

Des investigations devraient être nécessaires pour comprendre la libération de la curcumine par les micelles de caséines par des variations de température et de pH. Cela devrait également améliorer la vectorisation contrôlée de la curcumine par les micelles au cours des phases de digestion gastriques et pancréatiques afin de favoriser la biodisponibilité de la curcumine et d'autres polyphénols dans les aliments laitiers (Figure 63). Il serait aussi intéressant d'estimer la concentration maximale de curcumine pouvant être ajoutée à la micelle de caséine sans altérer ses mêmes propriétés structurales

Conclusion et perspectives

et fonctionnelles étudiées pendant cette thèse. Il serait aussi pertinent de manipuler la micelle de caséine de façon à augmenter le taux d'encapsulation du bioactif tout en améliorant les propriétés fonctionnelles de la micelle.

Puisque la curcumine encapsulée dans les micelles de caséines interagit avec les bactéries lactiques du yaourt, l'étude de la partition de ce bioactif en présence d'autres composants présents dans les produits laitiers tels que les protéines sériques ou même la matière grasse laitière serait intéressante.

De plus, le transfert de la curcumine des MC vers les bactéries lactiques du yaourt pourrait constituer une voie de vectorisation du bioactif *in vivo* : une fois le yaourt dopé de curcumine ingéré, les MC constitueraient le premier vecteur qui serait relayé par les bactéries lactiques. Ces seconds vecteurs sont plus résistants aux conditions gastro intestinales et augmenteraient la biodisponibilité du bioactif. Cette voie de vectorisation "double" serait donc intéressante à exploiter (Figure 63).

En effet, l'adsorption de la curcumine sur les enveloppes cellulaires des bactéries lactiques du yaourt a été démontrée. Cependant, il est intéressant de comprendre où se localise la curcumine sur les bactéries et si cette interaction s'établit spécifiquement avec des récepteurs de l'enveloppe bactérienne. Il serait aussi pertinent d'étudier si la curcumine est dégradée par les bactéries lactiques une fois adsorbée et ce pour mieux évaluer la biodisponibilité de la curcumine *in vivo*.

La production, à l'échelle du laboratoire, d'une poudre dopée en curcumine qui protège et préserve l'activité antioxydante de cette dernière incite à l'augmentation d'échelle à la production industrielle d'une poudre caséique dopée de curcumine qui pourrait être utilisée dans la formulation alimentaire de produits laitiers ou autres à valeur ajoutée.

Enfin, une étude similaire traitant les interactions régissant les MC et les bactéries lactiques du yaourt mais avec d'autres bioactifs hydrophiles ayant des propriétés biologiques intéressantes tel que le resvératrol ou la vitamine C pourrait être aussi une piste intéressante afin de développer une gamme de produits laitiers à valeur ajoutée.

Cette dernière partie constituée par une conclusion générale et des perspectives est achevée par un schéma récapitulant les différentes parties traitées dans la thèse, les objectifs atteints et les trois systèmes d'interaction matrice-bioactif-composante biotique mis en évidence (Figure 63).

Conclusion et perspectives

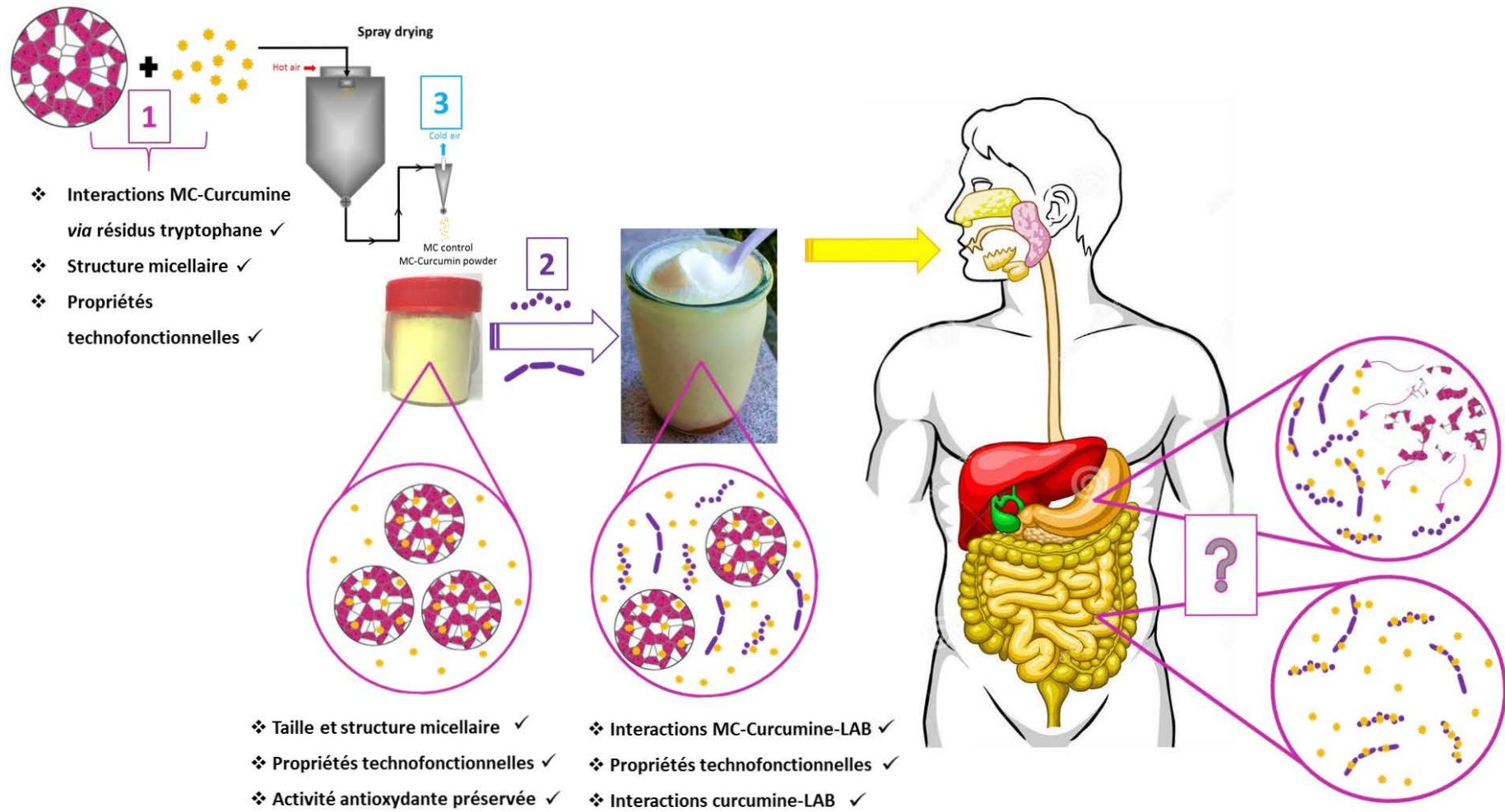


Figure 62. Schéma récapitulant les objectifs de la thèse

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Melcion, J. P. Les nouveaux aliments. (2005).
2. Niva, M. 'All foods affect health': Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. *Appetite* **48**, 384–393 (2007).
3. Roberfroid, M. B. Concepts in functional foods: a European perspective. *Nutrition Today* 162–165 (1999).
4. B, R. M., Véronique, C. & Nathalie, D. *Aliments fonctionnels (2e ed)*. (Lavoisier, 2008).
5. FAO & OMS. Codex alimentarius, Normes alimentaires internationales. (1995).
6. Gadkari, P. V. & Balaraman, M. Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. *Food Bioprod. Process.* **93**, 122–138 (2015).
7. Aggarwal, B. B., Kumar, A., Bharti, A. C. & others. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* **23**, 363–398 (2003).
8. Wilken, R., Veena, M. S., Wang, M. B. & Srivatsan, E. S. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol. Cancer* **10**, 12 (2011).
9. Gryniewicz, G. & Slifirski, P. Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. *Acta Biochim. Pol.* **59**, 201 (2012).
10. Esatbeyoglu, T. *et al.* Curcumin—From Molecule to Biological Function. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 5308–5332 (2012).
11. Gupta, S. C. *et al.* Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 1937 (2011).
12. Gupta, S. C., Kismali, G. & Aggarwal, B. B. Curcumin, a component of turmeric: From farm to pharmacy. *BioFactors* **39**, 2–13 (2013).
13. Indira Priyadarsini, K. Chemical and Structural Features Influencing the Biological Activity of Curcumin. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 2093–2100 (2013).

Références bibliographiques

14. Knekt, P. *et al.* Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 560–568 (2002).
15. Hubbard, G. P. *et al.* Ingestion of onion soup high in quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in man: a pilot study. *Br. J. Nutr.* **96**, 482–488 (2006).
16. Pace-Asciak, C. R., Hahn, S., Diamandis, E. P., Soleas, G. & Goldberg, D. M. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta* **235**, 207–219 (1995).
17. Nothlings, U., Murphy, S. P., Wilkens, L. R., Henderson, B. E. & Kolonel, L. N. Flavonols and Pancreatic Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.* **166**, 924–931 (2007).
18. Gresele, P. *et al.* Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *J. Nutr. Biochem.* **22**, 201–211 (2011).
19. Brown, L. *et al.* The Biological Responses to Resveratrol and Other Polyphenols From Alcoholic Beverages. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **33**, 1513–1523 (2009).
20. Dal-Pan, A., Blanc, S. & Aujard, F. Resveratrol suppresses body mass gain in a seasonal non-human primate model of obesity. *BMC Physiol.* **10**, 11 (2010).
21. van Breemen, R. B. & Pajkovic, N. Multitargeted therapy of cancer by lycopene. *Cancer Lett.* **269**, 339–351 (2008).
22. Takeoka, G. R. *et al.* Processing Effects on Lycopene Content and Antioxidant Activity of Tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3713–3717 (2001).
23. Fatani, A. J. *et al.* Lutein attenuates diabetic-induced renal damage via inhibiting oxidative and nitrosative stresses. *Prog. Nutr.* **19**, 57–66 (2017).
24. Thompson, L.U. Flaxseed in human nutrition. (2003).

25. Menendez, J.A. Extra-virgin olive oil polyphenols inhibit HER2 (erbB-2)-induced malignant transformation in human breast epithelial cells: Relationship between the chemical structures of extra-virgin olive oil secoiridoids and lignans and their inhibitory activities on the tyrosine kinase activity of HER2. *Int. J. Oncol.* (2009). doi:10.3892/ijo_00000127
26. Rao, J., Decker, E. A., Xiao, H. & McClements, D. J. Nutraceutical nanoemulsions: influence of carrier oil composition (digestible versus indigestible oil) on β -carotene bioavailability. *J. Sci. Food Agric.* **93**, 3175–3183 (2013).
27. Marsanasco, M., Márquez, A. L., Wagner, J. R., Chiaramoni, N. S. & Alonso, S. del V. Bioactive compounds as functional food ingredients: characterization in model system and sensory evaluation in chocolate milk. *J. Food Eng.* **166**, 55–63 (2015).
28. Millet, P., Landel, V., Virard, I., Morello, M. & Féron, F. Rôles bénéfiques de la vitamine D sur la neurodégénérescence et les troubles mentaux. *Cah. Nutr. Diététique* **49**, 279–293 (2014).
29. Walrand, S. Les effets musculaires de la vitamine D : application à la perte musculaire liée à l'âge. *OCL* **21**, D310 (2014).
30. Kong, F. Physical and storage properties of spray-dried blueberry pomace extract with whey protein isolate as wall material. *Journal of Food Engineering* 1–6 (2014).
31. Flores, F. P., Singh, R. K. & Kong, F. Anthocyanin extraction, microencapsulation, and release properties during in vitro digestion. *Food Rev. Int.* **32**, 46–67 (2016).
32. Abbas, S., Da Wei, C., Hayat, K. & Xiaoming, Z. Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends—A Review. *Food Rev. Int.* **28**, 343–374 (2012).
33. Ball, G.F.M. Vitamin C. in *Vitamins* 393–420 (Blackwell Publishing Ltd, 2004). doi:10.1002/9780470774571.ch19

Références bibliographiques

34. Aguiar, J., Estevinho, B. N. & Santos, L. Microencapsulation of natural antioxidants for food application – The specific case of coffee antioxidants – A review. *Trends Food Sci. Technol.* **58**, 21–39 (2016).
35. Zoumpopoulou, G., Pot, B., Tsakalidou, E. & Papadimitriou, K. Dairy probiotics: Beyond the role of promoting gut and immune health. *Int. Dairy J.* **67**, 46–60 (2017).
36. Dasari, S., Kathera, C., Janardhan, A., Praveen Kumar, A. & Viswanath, B. Surfacing role of probiotics in cancer prophylaxis and therapy: A systematic review. *Clin. Nutr.* (2016). doi:10.1016/j.clnu.2016.11.017
37. Olveira, G. & González-Molero, I. An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. *Endocrinol. Nutr. Engl. Ed.* (2016).
38. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. & Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 230S–242S (2005).
39. Andersen, O. M. & Markham, K. R. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. (CRC Press, 2005).
40. Brown, J. P. A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* **75**, 243–277 (1980).
41. Pharmacognosie (5^e Éd.) BRUNETON Jean. *Librairie Lavoisier* Available at: <https://www.lavoisier.fr/livre/genie-pharmaceutique/pharmacognie-phytochimie-plantes-medicinales-5e-ed/bruneton/descriptif-9782743021658>. (Accessed: 1st May 2017)
42. Bouakaz, I. Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. (2006).
43. Wang, H., Provan, G. J. & Helliwell, K. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends Food Sci. Technol.* **11**, 152–160 (2000).
44. Lun Su, Y., Leung, L. K., Huang, Y. & Chen, Z.-Y. Stability of tea theaflavins and catechins. *Food Chem.* **83**, 189–195 (2003).

45. Peters, C. M., Green, R. J., Janle, E. M. & Ferruzzi, M. G. Formulation with ascorbic acid and sucrose modulates catechin bioavailability from green tea. *Food Res. Int.* **43**, 95–102 (2010).
46. Ha, H.-K., Kim, J. W., Lee, M.-R. & Lee, W.-J. Formation and characterization of quercetin-loaded chitosan oligosaccharide/ β -lactoglobulin nanoparticle. *Food Res. Int.* **52**, 82–90 (2013).
47. Sai Saraswathi, V., Saravanan, D. & Santhakumar, K. Isolation of quercetin from the methanolic extract of *Lagerstroemia speciosa* by HPLC technique, its cytotoxicity against MCF-7 cells and photocatalytic activity. *J. Photochem. Photobiol. B* **171**, 20–26 (2017).
48. Aceituno-Medina, M., Mendoza, S., Rodríguez, B. A., Lagaron, J. M. & López-Rubio, A. Improved antioxidant capacity of quercetin and ferulic acid during in-vitro digestion through encapsulation within food-grade electrospun fibers. *J. Funct. Foods* **12**, 332–341 (2015).
49. Gomez-Estaca, J., Balaguer, M. P., Gavara, R. & Hernandez-Munoz, P. Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. *Food Hydrocoll.* **28**, 82–91 (2012).
50. Parvathy, K. S., Negi, P. S. & Srinivas, P. Antioxidant, antimutagenic and antibacterial activities of curcumin- β -diglucoside. *Food Chem.* **115**, 265–271 (2009).
51. RÈGLEMENT (UE) No 1129/2011 DE LA COMMISSIO du 11 novembre 2011. *Journal officiel de l'Union européenne* (2012).
52. Pinheiro, A. C., Coimbra, M. A. & Vicente, A. A. In vitro behaviour of curcumin nanoemulsions stabilized by biopolymer emulsifiers – Effect of interfacial composition. *Food Hydrocoll.* **52**, 460–467 (2016).

Références bibliographiques

53. Yan, Y.-D. *et al.* Enhanced oral bioavailability of curcumin via a solid lipid-based self-emulsifying drug delivery system using a spray-drying technique. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 1179–1186 (2011).
54. Zou, L. *et al.* Enhancing the bioaccessibility of hydrophobic bioactive agents using mixed colloidal dispersions: Curcumin-loaded zein nanoparticles plus digestible lipid nanoparticles. *Food Res. Int.* **81**, 74–82 (2016).
55. Kumar, D. D. *et al.* Formulation and characterization of nanoencapsulated curcumin using sodium caseinate and its incorporation in ice cream. *Food Funct* **7**, 417–424 (2016).
56. Wang, Y., Lu, Z., Lv, F. & Bie, X. Study on microencapsulation of curcumin pigments by spray drying. *Eur. Food Res. Technol.* **229**, 391–396 (2009).
57. Schneider, C., Gordon, O. N., Edwards, R. L. & Luis, P. B. Degradation of Curcumin: From Mechanism to Biological Implications. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 7606–7614 (2015).
58. Mirzaee, F., Kooshk, M. R. A., Rezaei-Tavirani, M. & Khodarahmi, R. Protective effects of accompanying proteins on light-and water-mediated degradation of Curcumin. *J. Paramed. Sci.* **5**, (2013).
59. Siemann, E. H. & Creasy, L. L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Society for Enology and Viticulture* (1992).
60. Flieger, J., Tatarczak-Michalewska, M. & Blicharska, E. Characterization of the cis/trans Isomerization of Resveratrol by High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Lett.* **50**, 294–303 (2017).
61. Schmidt, B. M., Erdman, J. W. & Lila, M. A. Effects of Food Processing on Blueberry Antiproliferation and Antioxidant Activity. *J. Food Sci.* **70**, s389–s394 (2006).
62. Allan, K. E., Lenehan, C. E. & Ellis, A. V. UV Light Stability of α -Cyclodextrin/Resveratrol Host–Guest Complexes and Isomer Stability at Varying pH. *Aust. J. Chem.* **62**, 921 (2009).

63. Oxidation of Resveratrol Catalyzed by Soybean Lipoxygenase - Journal of Agricultural and Food Chemistry (ACS Publications). Available at: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf025818d>. (Accessed: 18th March 2017)
64. Rius, C. *et al.* Trans- but Not Cis-Resveratrol Impairs Angiotensin-II-Mediated Vascular Inflammation through Inhibition of NF- B Activation and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Upregulation. *J. Immunol.* **185**, 3718–3727 (2010).
65. European Food Safety Authority (EFSA). EFSA assesses safety of lycopene in foods (2008). (2012).
66. Viskelis, P. *et al.* Biochemical Parameters in Tomato Fruits from Different Cultivars as Functional Foods for Agricultural, Industrial, and Pharmaceutical Uses. in *Plants for the Future* (ed. El-Shemy, H.) (InTech, 2015). doi:10.5772/60873
67. Lee, M. . & Chen, B. . Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chem.* **78**, 425–432 (2002).
68. Cernelic, K. *et al.* Influence of Synthetic Antioxidants on Extraction of All-trans-Lutein from Spinach under Air and Nitrogen Atmosphere. *Food Nutr. Sci.* **04**, 195–200 (2013).
69. Moghadasian, M. H. Advances in Dietary Enrichment with N-3 Fatty Acids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **48**, 402–410 (2008).
70. Kaleem, M. Effets des produits d'oxydation de l'acide linoléique sur sa biohydrogénation ruminale. (2013).
71. Frankel, E. N. Lipid oxidation. *Prog. Lipid Res.* **19**, 1–22 (1980).
72. O'Brien, R. D. *Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications, Third Edition.* (CRC Press, 2008).
73. Boon, C. S., McClements, D. J., Weiss, J. & Decker, E. A. Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **50**, 515–532 (2010).

Références bibliographiques

74. Luo, X. *et al.* Fabrication of β -carotene nanoemulsion-based delivery systems using dual-channel microfluidization: Physical and chemical stability. *J. Colloid Interface Sci.* **490**, 328–335 (2017).
75. Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H. & McClements, D. J. Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. *Food Chem.* **132**, 1221–1229 (2012).
76. Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H. & McClements, D. J. Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. *Food Chem.* **135**, 1440–1447 (2012).
77. Noronha, C. M. *et al.* Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. *Ind. Crops Prod.* **50**, 896–903 (2013).
78. Aytac, Z., Keskin, N. O. S., Tekinay, T. & Uyar, T. Antioxidant α -tocopherol/ γ -cyclodextrin–inclusion complex encapsulated poly(lactic acid) electrospun nanofibrous web for food packaging. *J. Appl. Polym. Sci.* **134** (2017).
79. Trombino, S. *et al.* Stearyl ferulate-based solid lipid nanoparticles for the encapsulation and stabilization of β -carotene and α -tocopherol. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **72**, 181–187 (2009).
80. Nachliely, M., Sharony, E., Bolla, N., Kutner, A. & Danilenko, M. Prodifferentiation Activity of Novel Vitamin D2 Analogs PRI-1916 and PRI-1917 and Their Combinations with a Plant Polyphenol in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1068 (2016).
81. Tissandié, E., Guéguen, Y., A.Lobaccaro, J.-M., Aigueperse, J. & Souidi, M. Vitamine D : Métabolisme, régulation et maladies associées. *médecine/sciences* **22**, 1095–1100 (2006).
82. Berendsen, A. A. M. *et al.* Conventional foods, followed by dietary supplements and fortified foods, are the key sources of vitamin D, vitamin B6, and selenium intake in Dutch participants of the NU-AGE study. *Nutr. Res.* **36**, 1171–1181 (2016).

83. Verkaik-Kloosterman, J., Seves, S. M. & Ocké, M. C. Vitamin D concentrations in fortified foods and dietary supplements intended for infants: Implications for vitamin D intake. *Food Chem.* **221**, 629–635 (2017).
84. Bueno, J. M. *et al.* Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake of Anthocyanins. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **42**, 126–151 (2012).
85. Betz, M. *et al.* Antioxidant capacity of bilberry extract microencapsulated in whey protein hydrogels. *Food Res. Int.* **47**, 51–57 (2012).
86. Betz, M. & Kulozik, U. Whey protein gels for the entrapment of bioactive anthocyanins from bilberry extract. *Int. Dairy J.* **21**, 703–710 (2011).
87. Sadilova, E., Carle, R. & Stintzing, F. C. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 1461–1471 (2007).
88. Potters, G., De Gara, L., Asard, H. & Horemans, N. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol. Biochem.* **40**, 537–548 (2002).
89. EFSSA. Apports nutritionnels conseillés en vitamine C pour la population française.
90. Anses, A. Actualisation des repères du PNNS: révision des repères de consommations alimentaires. (2016).
91. Davey, M. W. *et al.* Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 825–860 (2000).
92. Moreira, M. del R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E. & Roura, S. I. Ascorbic Acid retention, microbial growth, and sensory acceptability of lettuce leaves subjected to mild heat shocks. *J. Food Sci.* **71**, S188–S192 (2006).

Références bibliographiques

93. Chehue, A., Olvera Hernandez, E. G., Cern, T. F. & Ivarez, A. The Exogenous Antioxidants. in *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants* (ed. Morales-Gonzalez, J. A.) (InTech, 2013). doi:10.5772/52490
94. Olthof, M. R., Hollman, P. C. & Katan, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* **131**, 66–71 (2001).
95. Esquivel, P. & Jiménez, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Res. Int.* **46**, 488–495 (2012).
96. Orecchio, S., Ciotti, V. P. & Culotta, L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: Analytical method by GC–MS, profile, levels and sources. *Food Chem. Toxicol.* **47**, 819–826 (2009).
97. FAO & WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. (2002).
98. Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M. & Scher, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J. Food Eng.* **104**, 467–483 (2011).
99. Talwalkar, A. & Kailasapathy, K. A Review of Oxygen Toxicity in Probiotic Yogurts: Influence on the Survival of Probiotic Bacteria and Protective Techniques. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **3**, 117–124 (2004).
100. Prakash, S. The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. *BioMed Research International*, 1-12 (2011).
101. Corona-Hernandez, R. I. *et al.* Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **12**, 614–628 (2013).
102. Augustin, M. A. & Hemar, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chem Soc Rev* **38**, 902–912 (2009).
103. McClements, D. J., Decker, E. A. & Weiss, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J. Food Sci.* **72**, R109–R124 (2007).

104. Tamer, C. E. & Çopur, Ö. U. 14 - Bioavailability and delivery of nutraceuticals by nanoparticles. in *Nutraceuticals* (ed. Grumezescu, A. M.) 535–591 (Academic Press, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-804305-9.00014-2
105. Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M. & Ferrari, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Sci. Technol.* **44**, 1908–1914 (2011).
106. Donsì, F., Senatore, B., Huang, Q. & Ferrari, G. Development of Novel Pea Protein-Based Nanoemulsions for Delivery of Nutraceuticals. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 10653–10660 (2010).
107. Pimpao, R. C. Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry fruit purée. *British Journal of Nutrition* 454–463 (2015).
108. Hani, N., Azarian, M. H., Torkamani, A. E. & Kamil Mahmood, W. A. Characterisation of gelatin nanoparticles encapsulated with *Moringa oleifera* bioactive extract. *Int. J. Food Sci. Technol.* **51**, 2327–2337 (2016).
109. Wang, S. *et al.* Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. *J. Nutr. Biochem.* **25**, 363–376 (2014).
110. Davidov-Pardo, G. & McClements, D. J. Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues. *Trends Food Sci. Technol.* **38**, 88–103 (2014).
111. Kumar, V. Emerging technologies for improving bioavailability of polyphenols. *Current Nutrition & Food Science* 12–22 (2016).
112. Cnokaert, J. & Guillet, F. Les émulsions. in *Opérations unitaires en génie biologique*

Références bibliographiques

113. Wani, T. A. *et al.* Suitability of Different Food Grade Materials for the Encapsulation of Some Functional Foods Well Reported for Their Advantages and Susceptibility. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 2431–2454 (2016).
114. Bergonzi, M. C., Hamdouch, R., Mazzacuva, F., Isacchi, B. & Bilia, A. R. Optimization, characterization and in vitro evaluation of curcumin microemulsions. *LWT - Food Sci. Technol.* **59**, 148–155 (2014).
115. Chirio, D. *et al.* Influence of α - and γ - cyclodextrin lipophilic derivatives on curcumin-loaded SLN. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **65**, 391–402 (2009).
116. Sessa, M. *et al.* Exploitation of Polyphenolic Extracts from Grape Marc as Natural Antioxidants by Encapsulation in Lipid-Based Nanodelivery Systems. *Food Bioprocess Technol.* **6**, 2609–2620 (2013).
117. Berendsen, R., Güell, C. & Ferrando, M. A procyanidin-rich extract encapsulated in water-in-oil-in-water emulsions produced by premix membrane emulsification. *Food Hydrocoll.* **43**, 636–648 (2015).
118. Lorin, A., Flore, C., Thomas, A. & Brasseur, R. Les liposomes: description, fabrication et applications. *Biotechnol. Agron. Société Environ.* **8**, 163–176 (2004).
119. III) Nanomedecine. *Medecine et Nanotechnologies* (2014).
120. Mougin-Degraef, M. Les liposomes: aspects technologiques et pharmaceutiques. Radiomarquage des liposomes pour le ciblage en radioimmunothérapie. (Université de Nantes, 2004).
121. Evaluation of an Oral Carrier System in Rats: Bioavailability and Antioxidant Properties of Liposome-Encapsulated Curcumin - Journal of Agricultural and Food Chemistry (ACS Publications). Available at: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf9013923>. (Accessed: 25th March 2017)

122. Fang, J.-Y., Hung, C.-F., Liao, M.-H. & Chien, C.-C. A study of the formulation design of acoustically active lipospheres as carriers for drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **67**, 67–75 (2007).
123. Coimbra, M. *et al.* Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *Int. J. Pharm.* **416**, 433–442 (2011).
124. Piard, J.-C. *et al.* Acceleration of cheese ripening with liposome-entrapped proteinase. *Biotechnol. Lett.* **8**, 241–246 (1986).
125. Walde, P. & Ichikawa, S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomol. Eng.* **18**, 143–177 (2001).
126. Wilkinson, M. G. & Kilcawley, K. N. Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *Int. Dairy J.* **15**, 817–830 (2005).
127. Sharma, R. Fortification of milk with microencapsulated vitamin C and its thermal stability. *Journal of food science and technology-mysore* 191–194 (2005).
128. *Amidons natifs et amidons modifiés alimentaires.* (Ed. Techniques Ingénieur).
129. Lalush, I., Bar, H., Zakaria, I., Eichler, S. & Shimoni, E. Utilization of Amylose–Lipid Complexes as Molecular Nanocapsules for Conjugated Linoleic Acid. *Biomacromolecules* **6**, 121–130 (2005).
130. Lesmes, U., Cohen, S. H., Shener, Y. & Shimoni, E. Effects of long chain fatty acid unsaturation on the structure and controlled release properties of amylose complexes. *Food Hydrocoll.* **23**, 667–675 (2009).
131. Sanguansri, L. *et al.* Bioequivalence of n-3 fatty acids from microencapsulated fish oil formulations in human subjects. *Br. J. Nutr.* **113**, 822–831 (2015).
132. Chan, E.-S. *et al.* Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium–alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydr. Polym.* **83**, 225–232 (2011).

Références bibliographiques

133. López Córdoba, A., Deladino, L. & Martino, M. Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. *Carbohydr. Polym.* **95**, 315–323 (2013).
134. Krishnan, S., Bhosale, R. & Singhal, R. S. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydr. Polym.* **61**, 95–102 (2005).
135. Kanakdande, D., Bhosale, R. & Singhal, R. S. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. *Carbohydr. Polym.* **67**, 536–541 (2007).
136. Jeon, Y.-J., Vasanthan, T., Temelli, F. & Song, B.-K. The suitability of barley and corn starches in their native and chemically modified forms for volatile meat flavor encapsulation. *Food Res. Int.* **36**, 349–355 (2003).
137. Manuel, S. *et al.* Synthesis and inclusion ability of a bis- β -cyclodextrin pseudo-cryptand towards Busulfan anticancer agent. *Tetrahedron* **63**, 1706–1714 (2007).
138. Cravotto, G., Binello, A., Baranelli, E., Carraro, P. & Trotta, F. Cyclodextrins as Food Additives and in Food Processing. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2**, 343–350 (2006).
139. Boltman, T. Liposomal drug delivery to brain cancer cells. (2015).
140. Encapsulation of Lemon Oil by Paste Method Using β -Cyclodextrin: Encapsulation Efficiency and Profile of Oil Volatiles - Journal of Agricultural and Food Chemistry (ACS Publications). Available at: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf9902503>. (Accessed: 26th March 2017)
141. Decottignies, A. Catalyse dans l'eau en présence de cyclodextrine native ou modifiée: Application au couplage croisé de type Suzuki. (Compiègne, 2013).

142. Ciobanu, A. *et al.* Inclusion interactions of cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers with linalool and camphor in *Lavandula angustifolia* essential oil. *Carbohydr. Polym.* **87**, 1963–1970 (2012).
143. Ciobanu, A. *et al.* Retention of aroma compounds from *Mentha piperita* essential oil by cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers. *Food Chem.* **138**, 291–297 (2013).
144. Djedaini-Pilard, F. Enhancement of vitamin A skin absorption by cyclodextrins. *J.DRUG DEL. SCI.TECH* 77–86 (2004).
145. Wang, J., Cao, Y., Sun, B. & Wang, C. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Food Chem.* **127**, 1680–1685 (2011).
146. Ceborska, M. *et al.* Study of β -cyclodextrin inclusion complexes with volatile molecules geraniol and α -terpineol enantiomers in solid state and in solution. *Chem. Phys. Lett.* **641**, 44–50 (2015).
147. Lucas-Abellán, C., Fortea, I., López-Nicolás, J. M. & Núñez-Delicado, E. Cyclodextrins as resveratrol carrier system. *Food Chem.* **104**, 39–44 (2007).
148. Lucas-Abellán, C., Fortea, M. I., Gabaldón, J. A. & Núñez-Delicado, E. Complexation of resveratrol by native and modified cyclodextrins: Determination of complexation constant by enzymatic, solubility and fluorimetric assays. *Food Chem.* **111**, 262–267 (2008).
149. Kumar, R., Kaur, K., Uppal, S. & Mehta, S. K. Ultrasound processed nanoemulsion: A comparative approach between resveratrol and resveratrol cyclodextrin inclusion complex to study its binding interactions, antioxidant activity and UV light stability. *Ultrason. Sonochem.* **37**, 478–489 (2017).
150. Mercader-Ros, M. T., Lucas-Abellán, C., Fortea, M. I., Gabaldón, J. A. & Núñez-Delicado, E. Effect of HP- β -cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols. *Food Chem.* **118**, 769–773 (2010).

Références bibliographiques

151. Tommasini, S. *et al.* The inclusion complexes of hesperetin and its 7-rhamnoglucoside with (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39**, 572–580 (2005).
152. Tønnesen, H. H., Másson, M. & Loftsson, T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int. J. Pharm.* **244**, 127–135 (2002).
153. Kfoury, M. *et al.* Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins. *Food Chem.* **196**, 518–525 (2016).
154. Khan, A. R., Forgo, P., Stine, K. J. & D'Souza, V. T. Methods for Selective Modifications of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **98**, 1977–1996 (1998).
155. Cunha, A. G. & Gandini, A. Turning polysaccharides into hydrophobic materials: a critical review. Part 2. Hemicelluloses, chitin/chitosan, starch, pectin and alginates. *Cellulose* **17**, 1045–1065 (2010).
156. Smelcerovic, A., Knezevic-Jugovic, Z. & Petronijevic, Z. Microbial Polysaccharides and their Derivatives as Current and Prospective Pharmaceuticals. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 3168–3195 (2008).
157. Goh, C. H., Heng, P. W. S. & Chan, L. W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydr. Polym.* **88**, 1–12 (2012).
158. Draget, K. I. & Taylor, C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocoll.* **25**, 251–256 (2011).
159. Cheow, W. S. & Hadinoto, K. Biofilm-Like *Lactobacillus rhamnosus* Probiotics Encapsulated in Alginate and Carrageenan Microcapsules Exhibiting Enhanced Thermotolerance and Freeze-Drying Resistance. *Biomacromolecules* **14**, 3214–3222 (2013).
160. Annan, N. T., Borza, A. D. & Hansen, L. T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T

- during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Res. Int.* **41**, 184–193 (2008).
161. Zou, Q. *et al.* Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *Int. J. Food Sci. Technol.* **46**, 1672–1678 (2011).
162. Krasaekoopt, W., Bhandari, B. & Deeth, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* **14**, 737–743 (2004).
163. Song, S., Wang, Z., Qian, Y., Zhang, L. & Luo, E. The Release Rate of Curcumin from Calcium Alginate Beads Regulated by Food Emulsifiers. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 4388–4395 (2012).
164. Krasaekoopt, W., Bhandari, B. & Deeth, H. C. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *LWT - Food Sci. Technol.* **39**, 177–183 (2006).
165. Stequert, A. Transfert de matière dans les gels d'alginate. (2002).
166. Kühbeck, D. *et al.* Evaluation of the nitroaldol reaction in the presence of metal ion-crosslinked alginates. *New J Chem* **39**, 2306–2315 (2015).
167. Vincent, E. Les alginates et leurs applications en pharmacie et en ingénierie: application à la construction d'un biomatériau. (Faculté de pharmacie, 2010).
168. Okuyama, K. *et al.* Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydr. Polym.* **41**, 237–247 (2000).
169. Muzzarelli, R. A. A. *Chitin*. (Elsevier, 2013).
170. Rinaudo, M., Pavlov, G. & Desbrières, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer* 7029–7032 (1999).

Références bibliographiques

171. Berger, J. *et al.* Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57**, 19–34 (2004).
172. Vachoud, L., Zydowicz, N. & Domard, A. Physicochemical behaviour of chitin gels. *Carbohydrate research* 295–304 (2000).
173. Vachoud, L., Zydowicz, N. & Domard, A. Sorption and desorption studies on chitin gels. *Int. J. Biol. Macromol.* **28**, 93–101 (2001).
174. Orienti, I. *et al.* Influence of different chitosan salts on the release of sodium diclofenac in colon-specific delivery. *Int. J. Pharm.* **238**, 51–59 (2002).
175. Khalid, M. N., Ho, L., Agnely, F., Grossiord, J. L. & Couarraze, G. Swelling properties and mechanical characterization of a semi-interpenetrating chitosan/polyethylene oxide network : Comparison with a chitosan reference gel. *STP Pharma Sci.* **9**, 359–364 (1999).
176. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* **31**, 603–632 (2006).
177. Pillai, C. K. S., Paul, W. & Sharma, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog. Polym. Sci.* **34**, 641–678 (2009).
178. Hong, D. Y., Lee, J.-S. & Lee, H. G. Chitosan/poly- γ -glutamic acid nanoparticles improve the solubility of lutein. *Int. J. Biol. Macromol.* **85**, 9–15 (2016).
179. Sabaghi, M., Maghsoudlou, Y., Khomeiri, M. & Ziaifar, A. M. Active edible coating from chitosan incorporating green tea extract as an antioxidant and antifungal on fresh walnut kernel. *Postharvest Biol. Technol.* **110**, 224–228 (2015).
180. Kailaku, S. I., Mulyawanti, I. & Alamsyah, A. N. Formulation of Nanoencapsulated Catechin with Chitosan as Encapsulation Material. *Procedia Chem.* **9**, 235–241 (2014).
181. Khosravi Zanjani, M. A., Ghiassi Tarzi, B., Sharifan, A. & Mohammadi, N. Microencapsulation of Probiotics by Calcium Alginate-gelatinized Starch with Chitosan

- Coating and Evaluation of Survival in Simulated Human Gastro-intestinal Condition. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **13**, 843–852 (2014).
182. Anal, A. K., Tobiassen, A., Flanagan, J. & Singh, H. Preparation and characterization of nanoparticles formed by chitosan–caseinate interactions. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **64**, 104–110 (2008).
183. Ridley, B. L., O’Neill, M. A. & Mohnen, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**, 929–967 (2001).
184. De Vries, J. A., Rombouts, F. M., Voragen, A. G. J. & Pilnik, W. Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydr. Polym.* **2**, 25–33 (1982).
185. Voragen, A. G. J., Pilnik, W., Thibault, J. F., Axelos, M. a. V. & Renard, C. M. G. C. 10 Pectins. in *Food polysaccharides and their applications* 287–339 (1995).
186. Oakenfull, D. & Scott, A. Hydrophobic Interaction in the Gelation of High Methoxyl Pectins. *J. Food Sci.* **49**, 1093–1098 (1984).
187. Sato, Y. & Miyawaki, O. Analysis of intermolecular interaction among pectin molecules in aqueous sugar solutions. *Food Sci. Technol. Res.* **14**, 232–238 (2008).
188. Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C. & Thom, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Lett.* **32**, 195–198 (1973).
189. Daas, P. J., Meyer-Hansen, K., Schols, H. A., De Ruiter, G. A. & Voragen, A. G. Investigation of the non-esterified galacturonic acid distribution in pectin with endopolygalacturonase. *Carbohydr. Res.* **318**, 135–145 (1999).
190. Fraeye, I. *et al.* Influence of pectin structure on texture of pectin–calcium gels. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **11**, 401–409 (2010).
191. Oidtmann, J. *et al.* Preparation and Comparative Release Characteristics of Three Anthocyanin Encapsulation Systems. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 844–851 (2012).

Références bibliographiques

192. Berg, S., Bretz, M., Hubbermann, E. M. & Schwarz, K. Influence of different pectins on powder characteristics of microencapsulated anthocyanins and their impact on drug retention of shellac coated granulate. *J. Food Eng.* **108**, 158–165 (2012).
193. Bédié, G. K., Turgeon, S. L. & Makhlouf, J. Formation of native whey protein isolate–low methoxyl pectin complexes as a matrix for hydro-soluble food ingredient entrapment in acidic foods. *Food Hydrocoll.* **22**, 836–844 (2008).
194. Oliveira, A. C. *et al.* Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by Complex Coacervation Followed by Spouted-Bed Drying. *Dry. Technol.* **25**, 1687–1693 (2007).
195. Dickinson, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocoll.* **17**, 25–39 (2003).
196. Castellani, O. *et al.* Hydrocolloids with emulsifying capacity. Part 1 – Emulsifying properties and interfacial characteristics of conventional (*Acacia senegal* (L.) Willd. var. *senegal*) and matured (*Acacia* (sen) SUPER GUM™) *Acacia senegal*. *Food Hydrocoll.* **24**, 193–199 (2010).
197. Singh, A., Geveke, D. J. & Yadav, M. P. Improvement of rheological, thermal and functional properties of tapioca starch by using gum arabic. *LWT - Food Sci. Technol.* **80**, 155–162 (2017).
198. Yadav, M. P., Manuel Igartuburu, J., Yan, Y. & Nothnagel, E. A. Chemical investigation of the structural basis of the emulsifying activity of gum arabic. *Food Hydrocoll.* **21**, 297–308 (2007).
199. Cano-Higueta, D. m., Malacrida, C. r. & Telis, V. r. n. Stability of Curcumin Microencapsulated by Spray and Freeze Drying in Binary and Ternary Matrices of Maltodextrin, Gum Arabic and Modified Starch. *J. Food Process. Preserv.* **39**, 2049–2060 (2015).

200. Gupta, C., Chawla, P., Arora, S., Tomar, S. K. & Singh, A. K. Iron microencapsulation with blend of gum arabic, maltodextrin and modified starch using modified solvent evaporation method – Milk fortification. *Food Hydrocoll.* **43**, 622–628 (2015).
201. Bi, B., Yang, H., Fang, Y., Nishinari, K. & Phillips, G. O. Characterization and emulsifying properties of β -lactoglobulin-gum Acacia Seyal conjugates prepared via the Maillard reaction. *Food Chem.* **214**, 614–621 (2017).
202. Aberkane, L. *et al.* Structuration mechanism of β -lactoglobulin – acacia gum assemblies in presence of quercetin. *Food Hydrocoll.* **29**, 9–20 (2012).
203. THang Le, X. Étude du mécanisme de gélification d u gel couplé β - lactoglobuline /gomme xanthane et des propriétés du gel. (2014).
204. Jun-xia, X., Hai-yan, Y. & Jian, Y. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chem.* **125**, 1267–1272 (2011).
205. Shank, J. L. Encapsulating eg dyes, drugs, chemicals, adhesives etc—using microorganisms eg fungi, yeasts by forming large fat globules within cell wall. (1976).
206. Bishop, J. R. P., Nelson, G. & Lamb, J. Microencapsulation in yeast cells. *J. Microencapsul.* **15**, 761–773 (1998).
207. Ciamponi, F., Duckham, C. & Tirelli, N. Yeast cells as microcapsules. Analytical tools and process variables in the encapsulation of hydrophobes in *S. cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 1445–1456 (2012).
208. Dardelle, G. *et al.* Flavour-encapsulation and flavour-release performances of a commercial yeast-based delivery system. *Food Hydrocoll.* **21**, 953–960 (2007).
209. Paramera, E. I., Konteles, S. J. & Karathanos, V. T. Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*, β -cyclodextrin and modified starch. *Food Chem.* **125**, 913–922 (2011).

Références bibliographiques

210. Pedrini, M. R. da S., Dupont, S., Câmara, A. de A., Beney, L. & Gervais, P. Osmoporation: a simple way to internalize hydrophilic molecules into yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 1271–1280 (2014).
211. Pham-Hoang, B. N., Romero-Guido, C., Phan-Thi, H. & Waché, Y. Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: yeast cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 6635–6645 (2013).
212. Shi, G. *et al.* Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. *Int. J. Pharm.* **349**, 83–93 (2008).
213. Shi, G. *et al.* Yeast-cell-based microencapsulation of chlorogenic acid as a water-soluble antioxidant. *J. Food Eng.* **80**, 1060–1067 (2007).
214. Zuidam, N. J. & Heinrich, E. Encapsulation of Aroma. in *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing* (eds. Zuidam, N. J. & Nedovic, V.) 127–160 (Springer New York, 2010). doi:10.1007/978-1-4419-1008-0_5
215. Normand, V., Dardelle, G., Bouquerand, P.-E., Nicolas, L. & Johnston, D. J. Flavor Encapsulation in Yeasts: Limonene Used as a Model System for Characterization of the Release Mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 7532–7543 (2005).
216. Momany, F. A. *et al.* Structural Characterization of α -Zein. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 543–547 (2006).
217. Gennadios, A. *Protein-Based Films and Coatings*. (CRC Press, 2002).
218. Wang, Y., Su, C.-P., Schulmerich, M. & Padua, G. W. Characterization of core–shell structures formed by zein. *Food Hydrocoll.* **30**, 487–494 (2013).
219. Luo, Y. *et al.* Encapsulation of indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane in zein/carboxymethyl chitosan nanoparticles with controlled release property and improved stability. *Food Chem.* **139**, 224–230 (2013).

220. Jin, M., Davidson, P. M., Zivanovic, S. & Zhong, Q. Production of corn zein microparticles with loaded lysozyme directly extracted from hen egg white using spray drying: Extraction studies. *Food Chem.* **115**, 509–514 (2009).
221. Xiao, D. & Zhong, Q. In vitro release kinetics of nisin as affected by Tween 20 and glycerol co-encapsulated in spray-dried zein capsules. *J. Food Eng.* **106**, 65–73 (2011).
222. Luo, Y., Zhang, B., Cheng, W.-H. & Wang, Q. Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. *Carbohydr. Polym.* **82**, 942–951 (2010).
223. Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L. (Lucy) & Wang, Q. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **85**, 145–152 (2011).
224. Pan, Y., Tikekar, R. V., Wang, M. S., Avena-Bustillos, R. J. & Nitin, N. Effect of barrier properties of zein colloidal particles and oil-in-water emulsions on oxidative stability of encapsulated bioactive compounds. *Food Hydrocoll.* **43**, 82–90 (2015).
225. Xue, F. *et al.* Encapsulation of tomato oleoresin with zein prepared from corn gluten meal. *J. Food Eng.* **119**, 439–445 (2013).
226. Nesterenko, A. Etude et fonctionnalisation de protéines végétales en vue de leur application en microencapsulation. (2012).
227. Chen, F.-P., Li, B.-S. & Tang, C.-H. Nanocomplexation between Curcumin and Soy Protein Isolate: Influence on Curcumin Stability/Bioaccessibility and in Vitro Protein Digestibility. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 3559–3569 (2015).
228. Pan, Q. *et al.* The aggregation of soy protein isolate on the surface of Bifidobacterium. *Food Res. Int.* **64**, 323–328 (2014).

Références bibliographiques

229. Budryn, G. *et al.* Interactions of free and encapsulated hydroxycinnamic acids from green coffee with egg ovalbumin, whey and soy protein hydrolysates. *LWT - Food Sci. Technol.* **65**, 823–831 (2016).
230. Koyoro, H. & Powers, J. R. Functional Properties of Pea Globulin Fractions. *American Association of Cereal Chemists* 97–101 (1987).
231. Akintayo, E. T., Oshodi, A. A. & Esuoso, K. O. Effects of NaCl, ionic strength and pH on the foaming and gelation of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein concentrates. *Food Chem.* **66**, 51–56 (1999).
232. Raymundo, A., Gouveia, L., Batista, A. P., Empis, J. & Sousa, I. Fat mimetic capacity of *Chlorella vulgaris* biomass in oil-in-water food emulsions stabilized by pea protein. *Food Res. Int.* **38**, 961–965 (2005).
233. Pierucci, A. P. T. R., Andrade, L. R., Baptista, E. B., Volpato, N. M. & Rocha-Leão, M. H. M. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. *J. Microencapsul.* **23**, 654–662 (2006).
234. Gharsallaoui, A. *et al.* Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilised oil-in-water emulsions. *Food Chem.* **122**, 447–454 (2010).
235. Pereira, H. V. R. *et al.* Legumes seeds protein isolates in the production of ascorbic acid microparticles. *Food Res. Int.* **42**, 115–121 (2009).
236. Pierucci, A. P. T. R., Andrade, L. R., Farina, M., Pedrosa, C. & Rocha-Leão, M. H. M. Comparison of α -tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. *J. Microencapsul.* **24**, 201–213 (2007).
237. Ducel, V., Richard, J., Saulnier, P., Popineau, Y. & Boury, F. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **232**, 239–247 (2004).

238. Liu, S., Elmer, C., Low, N. H. & Nickerson, M. T. Effect of pH on the functional behaviour of pea protein isolate–gum Arabic complexes. *Food Res. Int.* **43**, 489–495 (2010).
239. Johnston-Banks, F. A. Gelatine. in *Food Gels* (ed. Harris, P.) 233–289 (Springer Netherlands, 1990). doi:10.1007/978-94-009-0755-3_7
240. Nur Hanani, Z. A., Roos, Y. H. & Kerry, J. P. Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. *Int. J. Biol. Macromol.* **71**, 94–102 (2014).
241. Dille, M. J., Hattrem, M. N. & Draget, K. I. Bioactively filled gelatin gels; challenges and opportunities. *Food Hydrocoll.* (2016). doi:10.1016/j.foodhyd.2016.12.028
242. Duquenne, B. *et al.* Stabilising frozen dairy mousses by low molecular weight gelatin peptides. *Food Hydrocoll.* **60**, 317–323 (2016).
243. Gómez-Estaca, J., Balaguer, M. P., López-Carballo, G., Gavara, R. & Hernández-Muñoz, P. Improving antioxidant and antimicrobial properties of curcumin by means of encapsulation in gelatin through electrohydrodynamic atomization. *Food Hydrocoll.* **70**, 313–320 (2017).
244. Debry, G. *Lait, nutrition et santé.* (Tec&Doc-Lavoisier, 2000).
245. Alais, C. *Science du lait: principes des techniques laitieres.* (1984).
246. Augustin, M. A. & Oliver, C. . M. Use of milk proteins for encapsulation of food ingredients. *Microencapsulation in the Food Industry: A Practical Implementation Guide* 211–226 (2014).
247. O’Mahony, J. A. & Fox, P. F. Milk Proteins: Introduction and Historical Aspects. in *Advanced Dairy Chemistry* (eds. McSweeney, P. L. H. & Fox, P. F.) 43–85 (Springer US, 2013). doi:10.1007/978-1-4614-4714-6_2

Références bibliographiques

248. Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. & McSweeney, P. L. H. Chemistry of Milk Constituents. in *Fundamentals of Cheese Science* 71–104 (Springer US, 2017). doi:10.1007/978-1-4899-7681-9_4
249. Dagleish, D. G. On the structural models of bovine casein micelles-review and possible improvements. *Soft Matter* **7**, 2265–2272 (2011).
250. Boland, M., Singh, H. & Thompson, A. *Milk Proteins: From Expression to Food*. (Academic Press, 2014).
251. Livney, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **15**, 73–83 (2010).
252. General Properties of Casein. *Sigma-Aldrich* Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/enzyme-reagents/casein.html>. (Accessed: 9th May 2017)
253. Sneharani, A. H., Singh, S. A. & Appu Rao, A. G. Interaction of α_{S1} -Casein with Curcumin and Its Biological Implications. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 10386–10391 (2009).
254. Yong, Y. H. & Foegeding, E. A. Caseins: Utilizing Molecular Chaperone Properties to Control Protein Aggregation in Foods. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 685–693 (2010).
255. Bourassa, P., Bariyanga, J. & Tajmir-Riahi, H. A. Binding Sites of Resveratrol, Genistein, and Curcumin with Milk alpha- and beta-Caseins. *J. Phys. Chem. B* **117**, 1287–1295 (2013).
256. Forrest, S. A., Yada, R. Y. & Rousseau, D. Interactions of Vitamin D₃ with Bovine β -Lactoglobulin A and β -Casein. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 8003–8009 (2005).
257. Holt, C. & Sawyer, L. Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the α_{S1} -, β - and κ -caseins. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **89**, 2683–2692 (1993).

258. Maher, P. G., Fenelon, M. A., Zhou, Y., Kamrul Haque, M. & Roos, Y. H. Optimization of β -Casein Stabilized Nanoemulsions Using Experimental Mixture Design. *J. Food Sci.* **76**, C1108–C1117 (2011).
259. Konnova, T. A., Faizullin, D. A., Haertle, T. & Zuev, Y. F. β -casein micelle formation in water-ethanol solutions. *Dokl. Biochem. Biophys.* **448**, 36–39 (2013).
261. Perlstein, H. *et al.* Beta-casein nanocarriers of celecoxib for improved oral bioavailability. *Eur. J. Nanomedicine* **6**, (2014).
262. Kibangou, I. B. *et al.* Milk Proteins and Iron Absorption: Contrasting Effects of Different Caseinophosphopeptides. *Pediatr. Res.* **58**, 731–734 (2005).
263. Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O’Mahony, J. A. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. (Springer, 2015).
264. Hogan, S. A., McNamee, B. F., O’Riordan, E. D. & O’Sullivan, M. Microencapsulating Properties of Sodium Caseinate. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1934–1938 (2001).
265. Semo, E., Kesselman, E., Danino, D. & Livney, Y. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocoll.* **21**, 936–942 (2007).
266. Day, L., Xu, M., Hoobin, P., Burgar, I. & Augustin, M. Characterisation of fish oil emulsions stabilised by sodium caseinate. *Food Chem.* **105**, 469–479 (2007).
267. Nielsen, N. S. & Jacobsen, C. Methods for reducing lipid oxidation in fish-oil-enriched energy bars. *Int. J. Food Sci. Technol.* **44**, 1536–1546 (2009).
268. Kosaraju, S. L., Weerakkody, R. & Augustin, M. A. In-vitro evaluation of hydrocolloid-based encapsulated fish oil. *Food Hydrocoll.* **23**, 1413–1419 (2009).
269. Crittenden, R., Weerakkody, R., Sanguansri, L. & Augustin, M. Synbiotic Microcapsules That Enhance Microbial Viability during Nonrefrigerated Storage and Gastrointestinal Transit. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2280–2282 (2006).

Références bibliographiques

270. Nag, A., Han, K.-S. & Singh, H. Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. *Int. Dairy J.* **21**, 247–253 (2011).
271. Pan, X., Yao, P. & Jiang, M. Simultaneous nanoparticle formation and encapsulation driven by hydrophobic interaction of casein-graft-dextran and β -carotene. *J. Colloid Interface Sci.* **315**, 456–463 (2007).
272. Rediguieri, C. F., de Freitas, O., Lettinga, M. P. & Tuinier, R. Thermodynamic Incompatibility and Complex Formation in Pectin/Caseinate Mixtures. *Biomacromolecules* **8**, 3345–3354 (2007).
273. Ye, A., Flanagan, J. & Singh, H. Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic. *Biopolymers* **82**, 121–133 (2006).
274. Kim, Y. D. & Morr, C. V. Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray-dried orange oil emulsion particles. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1314–1320 (1996).
275. Koupantsis, T., Pavlidou, E. & Paraskevopoulou, A. Flavour encapsulation in milk proteins – CMC coacervate-type complexes. *Food Hydrocoll.* **37**, 134–142 (2014).
276. Delorenzi, N. & Busti, P. Use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in beta-lactoglobulin. *Food Research International* 871–877 (2002).
277. Croguennec, T., Bouhallab, S., Mollé, D., O’Kennedy, B. T. & Mehra, R. Stable monomeric intermediate with exposed Cys-119 is formed during heat denaturation of β -lactoglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 465–471 (2003).
278. Pelegrine, D. H. G. & Gasparetto, C. A. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT - Food Sci. Technol.* **38**, 77–80 (2005).
279. Timasheff, S. N. & Susi, H. Infrared investigation of the secondary structure of β -lactoglobulins. *J. Biol. Chem.* **241**, 249–251 (1966).

280. Crowther, J. M., Jameson, G. B. & Dobson, A. J. H. and R. C. J. Structure, Oligomerisation and Interactions of β -Lactoglobulin. (2016). doi:10.5772/62992
281. Zorilla, R., Liang, L., Remondetto, G. & Subirade, M. Interaction of epigallocatechin-3-gallate with β -lactoglobulin: molecular characterization and biological implication. *Dairy Sci. Technol.* **91**, 629 (2011).
282. Loch, J. I. *et al.* Binding of 18-carbon unsaturated fatty acids to bovine β -lactoglobulin—Structural and thermodynamic studies. *Int. J. Biol. Macromol.* **57**, 226–231 (2013).
283. Kontopidis, G., Holt, C. & Sawyer, L. Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *J. Dairy Sci.* **87**, 785–796 (2004).
284. Liang, L. & Subirade, M. β -Lactoglobulin/Folic Acid Complexes: Formation, Characterization, and Biological Implication. *J. Phys. Chem. B* **114**, 6707–6712 (2010).
285. Liang, L., Tajmir-Riahi, H. A. & Subirade, M. Interaction of β -Lactoglobulin with Resveratrol and its Biological Implications. *Biomacromolecules* **9**, 50–56 (2008).
286. Liang, L., Tremblay-Hébert, V. & Subirade, M. Characterisation of the β -lactoglobulin/ α -tocopherol complex and its impact on α -tocopherol stability. *Food Chem.* **126**, 821–826 (2011).
287. Relkin, P. & Shukat, R. Food protein aggregates as vitamin-matrix carriers: Impact of processing conditions. *Food Chem.* **134**, 2141–2148 (2012).
288. Sneharani, A. H., Karakkat, J. V., Singh, S. A. & Rao, A. G. A. Interaction of Curcumin with β -Lactoglobulin—Stability, Spectroscopic Analysis, and Molecular Modeling of the Complex. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 11130–11139 (2010).
289. Shpigelman, A., Cohen, Y. & Livney, Y. D. Thermally-induced β -lactoglobulin–EGCG nanovehicles: Loading, stability, sensory and digestive-release study. *Food Hydrocoll.* **29**, 57–67 (2012).

Références bibliographiques

290. Chanasattru, W., Jones, O. G., Decker, E. A. & McClements, D. J. Impact of cosolvents on formation and properties of biopolymer nanoparticles formed by heat treatment of β -lactoglobulin–Pectin complexes. *Food Hydrocoll.* **23**, 2450–2457 (2009).
291. Jones, O. G., Decker, E. A. & McClements, D. J. Formation of biopolymer particles by thermal treatment of β -lactoglobulin–pectin complexes. *Food Hydrocoll.* **23**, 1312–1321 (2009).
292. Mun, S., Cho, Y., Decker, E. A. & McClements, D. J. Utilization of polysaccharide coatings to improve freeze–thaw and freeze–dry stability of protein-coated lipid droplets. *J. Food Eng.* **86**, 508–518 (2008).
293. Hong, Y.-H. & McClements, D. J. Modulation of pH Sensitivity of Surface Charge and Aggregation Stability of Protein-Coated Lipid Droplets by Chitosan Addition. *Food Biophys.* **2**, 46–55 (2007).
294. Hong, Y.-H. & McClements, D. J. Formation of Hydrogel Particles by Thermal Treatment of β -Lactoglobulin–Chitosan Complexes. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 5653–5660 (2007).
295. Yoshii, H. *et al.* Effects of protein on retention of ADH enzyme activity encapsulated in trehalose matrices by spray drying. *J. Food Eng.* **87**, 34–39 (2008).
296. Ribadeau-Dumas, B. Actualités dans le domaine de la connaissance de la structure et des propriétés biochimiques des protéines laitières. *Rev Lait* 17–32 (1981).
297. Cayot, P. & Lorient, D. Les propriétés d’hydratation des protéines. *Structures et technofonctions des protéines du lait* 209–227 (1998).
298. Cl, C., C, W., Cm, D., Pa, E. & J, B. Structure and stability of the molten globule state of guinea-pig alpha-lactalbumin: a hydrogen exchange study. *Biochemistry (Mosc.)* **32**, 5681–5691 (1993).

299. Jøhnke, M. & Petersen, T. E. The Alpha-Lactalbumin/Oleic Acid Complex and Its Cytotoxic Activity. (2012). doi:10.5772/48184
300. Considine, T., Flanagan, J. & Loveday, S. M. Interactions between Milk Proteins and Micronutrients. *Food Science and Technology-International Series* 421–449 (2014).
301. Graveland-Bikker, J. F. & de Kruif, C. G. Unique milk protein based nanotubes: Food and nanotechnology meet. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 196–203 (2006).
302. Ipsen, R. & Otte, J. Self-assembly of partially hydrolysed α -lactalbumin. *Biotechnol. Adv.* **25**, 602–605 (2007).
303. Baranauskienė, R., Venskutonis, P. R., Dewettinck, K. & Verhé, R. Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices. *Food Res. Int.* **39**, 413–425 (2006).
304. Bayram, O. A., Bayram, M. & Tekin, A. R. Whey powder as a carrier in spray drying of sumac concentrate. *J. Food Process Eng.* **31**, 105–119 (2008).
305. Gunasekaran, S., Xiao, L. & Ould Eleya, M. M. Whey protein concentrate hydrogels as bioactive carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* **99**, 2470–2476 (2006).
306. López-Rubio, A. & Lagaron, J. M. Whey protein capsules obtained through electrospraying for the encapsulation of bioactives. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **13**, 200–206 (2012).
307. Bylaitė, E., Rimantas Venskutonis, P. & Maždpierienė, R. Properties of caraway (*Carum carvi* L.) essential oil encapsulated into milk protein-based matrices. *Eur. Food Res. Technol.* **212**, 661–670 (2001).
308. Hernández-Marín, N. Y., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J. & Vernon-Carter, E. J. Physical properties and release behaviour of caffeine multiple

Références bibliographiques

- emulsions stabilised by binary or ternary biopolymer soluble complexes under acid, bile and yogurt storage conditions. *Food Hydrocoll.* **58**, 42–48 (2016).
309. Giroux, H. J. & Britten, M. Encapsulation of hydrophobic aroma in whey protein nanoparticles. *J. Microencapsul.* **28**, 337–343 (2011).
310. Partanen, R. *et al.* Effect of Relative Humidity on Oxidation of Flaxseed Oil in Spray Dried Whey Protein Emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 5717–5722 (2008).
311. Bae, E. K. & Lee, S. J. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *J. Microencapsul.* **25**, 549–560 (2008).
312. Toure, A. Microencapsulation and oxidative stability of ginger essential oil in maltodextrin/Whey protein isolate (MD/WPI). *International Journal of Dairy Science* **2** 387–392 (2007).
313. Flores, F. P., Singh, R. K., Kerr, W. L., Pegg, R. B. & Kong, F. Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during in vitro digestion. *Food Chem.* **153**, 272–278 (2014).
314. Flores, F. P., Singh, R. K. & Kong, F. Physical and storage properties of spray-dried blueberry pomace extract with whey protein isolate as wall material. *J. Food Eng.* **137**, 1–6 (2014).
315. Flores, F. P., Singh, R. K., Kerr, W. L., Phillips, D. R. & Kong, F. In vitro release properties of encapsulated blueberry (*Vaccinium ashei*) extracts. *Food Chem.* **168**, 225–232 (2015).
316. Liu, W., Chen, X. D., Cheng, Z. & Selomulya, C. On enhancing the solubility of curcumin by microencapsulation in whey protein isolate via spray drying. *J. Food Eng.* **169**, 189–195 (2016).

317. Picot, A. & Lacroix, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. Dairy J.* **14**, 505–515 (2004).
318. Picot, A. & Lacroix, C. Production of Multiphase Water-Insoluble Microcapsules for Cell Microencapsulation Using an Emulsification/Spray-drying Technology. *JFS: Food engineering and physical properties* 2693–2700 (2003).
319. Betz, M. & Kulozik, U. Microencapsulation of bioactive bilberry anthocyanins by means of whey protein gels. *Procedia Food Sci.* **1**, 2047–2056 (2011).
320. Beaulieu, L., Savoie, L., Paquin, P. & Subirade, M. Elaboration and Characterization of Whey Protein Beads by an Emulsification/Cold Gelation Process: Application for the Protection of Retinol. *Biomacromolecules* **3**, 239–248 (2002).
321. Gülseren, İ., Fang, Y. & Corredig, M. Zinc incorporation capacity of whey protein nanoparticles prepared with desolvation with ethanol. *Food Chem.* **135**, 770–774 (2012).
322. Martin, A. H. & de Jong, G. A. H. Enhancing the in vitro Fe²⁺ bio-accessibility using ascorbate and cold-set whey protein gel particles. *Dairy Sci. Technol.* **92**, 133–149 (2012).
323. Jimenez, M., Garcia, H. S. & Beristain, C. I. Spray-drying microencapsulation and oxidative stability of conjugated linoleic acid. *Eur. Food Res. Technol.* **219**, 588–592 (2004).
324. Zhang, L., Dudhani, A., Lundin, L. & Kosaraju, S. L. Macromolecular conjugate based particulates: Preparation, characterisation and evaluation of controlled release properties. *Eur. Polym. J.* **45**, 1960–1969 (2009).
325. Chen, B., Li, H., Ding, Y. & Suo, H. Formation and microstructural characterization of whey protein isolate/beet pectin coacervations by laccase catalyzed cross-linking. *LWT - Food Sci. Technol.* **47**, 31–38 (2012).

Références bibliographiques

326. Arroyo-Maya, I. J. & McClements, D. J. Biopolymer nanoparticles as potential delivery systems for anthocyanins: Fabrication and properties. *Food Res. Int.* **69**, 1–8 (2015).
327. Shpigelman, A., Israeli, G. & Livney, Y. D. Thermally-induced protein–polyphenol co-assemblies: beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocoll.* **24**, 735–743 (2010).
328. Haratifar, S. & Corredig, M. Interactions between tea catechins and casein micelles and their impact on renneting functionality. *Food Chem.* **143**, 27–32 (2014).
329. Shutava, T. G., Balkundi, S. S. & Lvov, Y. M. (–)-Epigallocatechin gallate/gelatin layer-by-layer assembled films and microcapsules. *J. Colloid Interface Sci.* **330**, 276–283 (2009).
330. Fang, J.-Y., Hwang, T.-L., Huang, Y.-L. & Fang, C.-L. Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol. *Int. J. Pharm.* **310**, 131–138 (2006).
331. Fang, J.-Y., Lee, W.-R., Shen, S.-C. & Huang, Y.-L. Effect of liposome encapsulation of tea catechins on their accumulation in basal cell carcinomas. *J. Dermatol. Sci.* **42**, 101–109 (2006).
332. Hu, B. *et al.* Optimization of Fabrication Parameters To Produce Chitosan–Triphosphate Nanoparticles for Delivery of Tea Catechins. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7451–7458 (2008).
333. Di Mattia, C. D., Sacchetti, G., Mastrocola, D. & Pittia, P. Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions. *Food Res. Int.* **42**, 1163–1170 (2009).
334. Ucisik, M. H., Küpcü, S., Schuster, B. & Sleytr, U. B. Characterization of CurcuEmulsomes: nanoformulation for enhanced solubility and delivery of curcumin. *J Nanobiotechnology* **11**, (2013).

335. Hasan, M. *et al.* Liposome encapsulation of curcumin: Physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *Int. J. Pharm.* **461**, 519–528 (2014).
336. Ravichandran, R. Studies on Dissolution Behaviour of Nanoparticulate Curcumin Formulation. *Adv. Nanoparticles* **02**, 51–59 (2013).
337. Pan, K., Zhong, Q. & Baek, S. J. Enhanced Dispersibility and Bioactivity of Curcumin by Encapsulation in Casein Nanocapsules. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 6036–6043 (2013).
338. Rahimi Yazdi, S. *et al.* Binding of curcumin to milk proteins increases after static high pressure treatment of skim milk. *J. Dairy Res.* **80**, 152–158 (2013).
339. Kumari, A., Yadav, S. K., Pakade, Y. B., Singh, B. & Yadav, S. C. Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **80**, 184–192 (2010).
340. Barras, A. *et al.* Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules. *Int. J. Pharm.* **379**, 270–277 (2009).
341. Priprem, A., Watanatorn, J., Sutthiparinyanont, S., Phachonpai, W. & Muchimapura, S. Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **4**, 70–78 (2008).
342. Fang, R. *et al.* Design and characterization of protein-quercetin bioactive nanoparticles. *J. Nanobiotechnology* **9**, 19 (2011).
343. Zhang, X.-P., Le, Y., Wang, J.-X., Zhao, H. & Chen, J.-F. Resveratrol nanodispersion with high stability and dissolution rate. *LWT - Food Sci. Technol.* **50**, 622–628 (2013).
344. Mantegna, S. *et al.* A one-pot ultrasound-assisted water extraction/cyclodextrin encapsulation of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *Food Chem.* **130**, 746–750 (2012).

Références bibliographiques

345. Peng, H. *et al.* Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. *Food Chem.* **121**, 23–28 (2010).
346. Summerlin, N. *et al.* Resveratrol nanoformulations: Challenges and opportunities. *Int. J. Pharm.* **479**, 282–290 (2015).
347. Coradini, K. *et al.* Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **88**, 178–185 (2014).
348. Liu, M., Yang, J., Ao, P. & Zhou, C. Preparation and characterization of chitosan hollow nanospheres for anticancer drug curcumin delivery. *Mater. Lett.* **150**, 114–117 (2015).
349. Ye, J.-H., Thomas, E., Sanguansri, L., Liang, Y.-R. & Augustin, M. A. Interaction between Whole Buttermilk and Resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 7096–7101 (2013).
350. dos Santos, C., Buera, M. P. & Mazzobre, M. F. Influence of ligand structure and water interactions on the physical properties of β -cyclodextrins complexes. *Food Chem.* **132**, 2030–2036 (2012).
351. Rocha, G. A., Fávaro-Trindade, C. S. & Grosso, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food Bioprod. Process.* **90**, 37–42 (2012).
352. Chiu, Y. T. *et al.* Encapsulation of Lycopene Extract from Tomato Pulp Waste with Gelatin and Poly(γ -glutamic acid) as Carrier. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 5123–5130 (2007).
353. Blanch, G. P., Ruiz del Castillo, M. L., del Mar Caja, M., Pérez-Méndez, M. & Sánchez-Cortés, S. Stabilization of all-trans-lycopene from tomato by encapsulation using cyclodextrins. *Food Chem.* **105**, 1335–1341 (2007).
354. Shu, B., Yu, W., Zhao, Y. & Liu, X. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *J. Food Eng.* **76**, 664–669 (2006).

355. Mele, A., Mendichi, R., Selva, A., Molnar, P. & Toth, G. Non-covalent associations of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with carotenoids in water. A study on the α - and β -cyclodextrin/ ψ , ψ -carotene (lycopene) systems by light scattering, ionspray ionization and tandem mass spectrometry. *Carbohydr. Res.* **337**, 1129–1136 (2002).
356. Lacatusu, I. *et al.* Lipid nanoparticles based on omega-3 fatty acids as effective carriers for lutein delivery. Preparation and in vitro characterization studies. *J. Funct. Foods* **5**, 1260–1269 (2013).
357. Qv, X.-Y., Zeng, Z.-P. & Jiang, J.-G. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. *Food Hydrocoll.* **25**, 1596–1603 (2011).
358. Dian, N. L. H. M., Sudin, N. & Yusoff, M. S. A. Characteristics of Microencapsulated Palm-Based Oil as Affected by Type of Wall Material. *J. Sci. Food Agric.* **70**, 422–426 (1996).
359. Ghasemi, S. & Abbasi, S. Formation of natural casein micelle nanocapsule by means of pH changes and ultrasound. *Food Hydrocoll.* **42**, 42–47 (2014).
360. Saberi, M., Hashemiravan, M. & Farhadyar, N. Influence of casein and inulin on the properties of nano-particle encapsulation of fish oil. *J Biodivers. Env. Sci* **4**, 318–326 (2014).
361. Chen, Q., McGillivray, D., Wen, J., Zhong, F. & Quek, S. Y. Co-encapsulation of fish oil with phytosterol esters and limonene by milk proteins. *J. Food Eng.* **117**, 505–512 (2013).
362. Lesmes, U., Sandra, S., Decker, E. A. & McClements, D. J. Impact of surface deposition of lactoferrin on physical and chemical stability of omega-3 rich lipid droplets stabilised by caseinate. *Food Chem.* **123**, 99–106 (2010).

Références bibliographiques

363. Averina, E. & Allémann, E. Encapsulation of alimentary bioactive oils of the Baikal Lake area into pH-sensitive micro- and nanoparticles. *LWT - Food Sci. Technol.* **53**, 271–277 (2013).
364. Drusch, S. *et al.* New insights into the microencapsulation properties of sodium caseinate and hydrolyzed casein. *Food Hydrocoll.* **27**, 332–338 (2012).
365. Choi, M.-J., Ruktanonchai, U., Min, S.-G., Chun, J.-Y. & Soottitantawat, A. Physical characteristics of fish oil encapsulated by β -cyclodextrin using an aggregation method or polycaprolactone using an emulsion–diffusion method. *Food Chem.* **119**, 1694–1703 (2010).
366. Klaypradit, W. & Huang, Y.-W. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *LWT - Food Sci. Technol.* **41**, 1133–1139 (2008).
367. Sáiz-Abajo, M.-J., González-Ferrero, C., Moreno-Ruiz, A., Romo-Hualde, A. & González-Navarro, C. J. Thermal protection of β -carotene in re-assembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry. *Food Chem.* **138**, 1581–1587 (2013).
368. Kim, J.-Y., Seo, T.-R. & Lim, S.-T. Preparation of aqueous dispersion of β -carotene nano-composites through complex formation with starch dextrin. *Food Hydrocoll.* **33**, 256–263 (2013).
369. Mensi, A. *et al.* Interlocking of β -carotene in beta-lactoglobulin aggregates produced under high pressure. *Food Chem.* **139**, 253–260 (2013).
370. Gupta, S. S. & Ghosh, M. In vitro study of anti-oxidative effects of β -carotene and α -lipoic acid for nanocapsulated lipids. *LWT - Food Sci. Technol.* **49**, 131–138 (2012).
371. Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O. & McClements, D. J. Modulating β -carotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in edible nanoemulsions. *Food Chem.* **139**, 878–884 (2013).

372. de Paz, E. *et al.* Formulation of β -carotene by precipitation from pressurized ethyl acetate-on-water emulsions for application as natural colorant. *Food Hydrocoll.* **26**, 17–27 (2012).
373. Cao-Hoang, L., Fougère, R. & Waché, Y. Increase in stability and change in supramolecular structure of β -carotene through encapsulation into polylactic acid nanoparticles. *Food Chem.* **124**, 42–49 (2011).
374. Loksuan, J. Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocoll.* **21**, 928–935 (2007).
375. Khayata, N., Abdelwahed, W., Chehna, M. F., Charcosset, C. & Fessi, H. Stability study and lyophilization of vitamin E-loaded nanocapsules prepared by membrane contactor. *Int. J. Pharm.* **439**, 254–259 (2012).
376. Rigo, L. A. *et al.* Nanoencapsulation of rice bran oil increases its protective effects against UVB radiation-induced skin injury in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **93**, 11–17 (2015).
377. Somchue, W., Sermsri, W., Shiowatana, J. & Siripinyanond, A. Encapsulation of α -tocopherol in protein-based delivery particles. *Food Res. Int.* **42**, 909–914 (2009).
378. Markman, G. & Livney, Y. D. Maillard-conjugate based core-shell co-assemblies for nanoencapsulation of hydrophobic nutraceuticals in clear beverages. *Food Funct* **3**, 262–270 (2012).
379. Diarrassouba, F. *et al.* Effects of gastrointestinal pH conditions on the stability of the β -lactoglobulin/vitamin D3 complex and on the solubility of vitamin D3. *Food Res. Int.* **52**, 515–521 (2013).

Références bibliographiques

380. Tippetts, M., Martini, S., Brothersen, C. & McMahon, D. J. Fortification of cheese with vitamin D3 using dairy protein emulsions as delivery systems. *J. Dairy Sci.* **95**, 4768–4774 (2012).
381. David, S. & Livney, Y. D. Potato protein based nanovehicles for health promoting hydrophobic bioactives in clear beverages. *Food Hydrocoll.* **57**, 229–235 (2016).
382. Menéndez-Aguirre, O. *et al.* Increased loading of vitamin D2 in reassembled casein micelles with temperature-modulated high pressure treatment. *Food Res. Int.* **64**, 74–80 (2014).
383. Chen, L. & Subirade, M. Effect of preparation conditions on the nutrient release properties of alginate–whey protein granular microspheres. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **65**, 354–362 (2007).
384. O’Regan, J. & Mulvihill, D. M. Sodium caseinate–maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability. *Food Res. Int.* **43**, 224–231 (2010).
385. Al-Nabulsi, A. A., Han, J. H., Liu, Z., Rodrigues-Vieira, E. T. & Holley, R. A. Temperature-Sensitive Microcapsules Containing Lactoferrin and Their Action Against *Carnobacterium viridans* on Bologna. *J. Food Sci.* **71**, M208–M214 (2006).
386. Chiou, D. & Langrish, T. A. G. Development and characterisation of novel nutraceuticals with spray drying technology. *J. Food Eng.* **82**, 84–91 (2007).
387. Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R. & Paredes-López, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **40**, 173–289 (2000).
388. Idham, Z., Muhamad, I. I. & Sarmidi, M. R. DEGRADATION KINETICS AND COLOR STABILITY OF SPRAY-DRIED ENCAPSULATED ANTHOCYANINS FROM HIBISCUS SABDARIFFA L.: STABILITY OF SPRAY DRIED ANTHOCYANINS. *J. Food Process Eng.* **35**, 522–542 (2012).

389. Robert, P. *et al.* Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying: Encapsulation of polyphenols and anthocyanins. *Int. J. Food Sci. Technol.* **45**, 1386–1394 (2010).
390. Yousuf, B., Gul, K., Wani, A. A. & Singh, P. Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 2223–2230 (2016).
391. Vidović, S. S., Vladić, J. Z., Vaštag, Ž. G., Zeković, Z. P. & Popović, L. M. Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. *Powder Technol.* **258**, 209–215 (2014).
392. Vladić, J. *et al.* Recycling of filter tea industry by-products: Production of *A. millefolium* powder using spray drying technique. *Ind. Crops Prod.* **80**, 197–206 (2016).
393. Rijo, P. *et al.* Optimization of medicinal plant extraction methods and their encapsulation through extrusion technology. *Measurement* **58**, 249–255 (2014).
394. Hsiao, H.-C., Lian, W.-C. & Chou, C.-C. Effect of packaging conditions and temperature on viability of microencapsulated bifidobacteria during storage. *J. Sci. Food Agric.* **84**, 134–139 (2004).
395. Lian, W. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 293–301 (2003).
396. Heidebach, T., Först, P. & Kulozik, U. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *J. Food Eng.* **98**, 309–316 (2010).
397. Burgain, J., Gaiani, C., Cailliez-Grimal, C., Jeandel, C. & Scher, J. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in microparticles: Influence of casein to whey protein ratio on bacterial survival during digestion. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **19**, 233–242 (2013).

Références bibliographiques

398. Doherty, S. B. *et al.* Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocoll.* **25**, 1604–1617 (2011).
399. Guerin, J. *et al.* Lactobacillus rhamnosus GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. *J. Food Eng.* **193**, 10–19 (2017).
400. Miao, S. *et al.* Effect of disaccharides on survival during storage of freeze dried probiotics. *Dairy Sci. Technol.* **88**, 19–30 (2008).
401. Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R. & Simal-Gándara, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocoll.* **23**, 1631–1640 (2009).
402. Szejtli, J. Past, Present, and Future of Cyclodextrin Research. *ChemInform* **36**, (2005).
403. Nguyen, T. A., Liu, B., Zhao, J., Thomas, D. S. & Hook, J. M. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chem.* **136**, 186–192 (2013).
404. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. & Saurel, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.* **40**, 1107–1121 (2007).
405. Madene, A., Jacquot, M., Scher, J. & Desobry, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **41**, (2006).
406. Reineccius, G. A. Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Technol.* **45**, 144–146 (1991).
407. Santos, A. B. dos(Universidade E. de C. F. de E. de A. D. de P. A. e N., Fávares-Trindade, C. S. de S. P. F. & Grosso, C. R. F. E. de C. F. de E. de A. D. de P. A. e N. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. *Soc. Bras. Ciênc. E Tecnol. Aliment.* (2005).

408. Righetto, A. M. & Netto, F. M. Vitamin C stability in encapsulated green West Indian cherry juice and in encapsulated synthetic ascorbic acid. *J. Sci. Food Agric.* **86**, 1202–1208 (2006).
409. Murray, B. S. & Liang, H.-J. Enhancement of the Foaming Properties of Protein Dried in the Presence of Trehalose. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4984–4991 (1999).
410. Đorđević, V. *et al.* Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Eng. Rev.* **7**, 452–490 (2015).
411. La Storia, A., Mauriello, G., Villani, F. & Ercolini, D. Coating-Activation and Antimicrobial Efficacy of Different Polyethylene Films with a Nisin-Based Solution. *Food Bioprocess Technol.* **6**, 2770–2779 (2013).
412. Lin, C.-C. *et al.* Preparation of curcumin microemulsions with food-grade soybean oil/lecithin and their cytotoxicity on the HepG2 cell line. *Food Chem.* **154**, 282–290 (2014).
413. EBSCOhost | 69631921 | Formulation and stability of water-in-virgin coconut oil microemulsion using ternary food grade nonionic surfactants. Available at: <http://web.b.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=19854668&AN=69631921&h=kPiqTnacMHPUN3Iwzjgm9WIHPAJxc7maAgmfx%2bJXAMtYpvNH6W1Ke3VqNuaaj7ovAhGeW343AqJlgjFSxs4FIQ%3d%3d&crl=c&resultNs=AdminWebAuth&resultLocal=ErrCrlNotAuth&crlhashurl=login.aspx%3fdirect%3dtrue%26profile%3dehost%26scope%3dsite%26authtype%3dcrawler%26jrnl%3d19854668%26AN%3d69631921>. (Accessed: 4th April 2017)
414. McClements, D. J. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. *Adv. Colloid Interface Sci.* **174**, 1–30 (2012).
415. Su, J., Flanagan, J. & Singh, H. Improving encapsulation efficiency and stability of water-in-oil-in-water emulsions using a modified gum arabic (Acacia (sen) SUPER GUM™). *Food Hydrocoll.* **22**, 112–120 (2008).

Références bibliographiques

416. Surh, J. Influence of Xanthan, Emulsification Temperature, and Environmental Stresses on the Preparation of Water-in-Corn Oil Emulsions Droplets Coated by Polyglycerol Polyricinoleate. *Food Science and Biotechnology* (2009). Available at: <http://www.dbpia.co.kr>. (Accessed: 4th April 2017)
417. Taylor, T. M., Weiss, J., Davidson, P. M. & Bruce, B. D. Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 587–605 (2005).
418. Detoni, C. B., Souto, G. D., da Silva, A. L. M., Pohlmann, A. R. & Guterres, S. S. Photostability and Skin Penetration of Different E-Resveratrol-Loaded Supramolecular Structures. *Photochem. Photobiol.* **88**, 913–921 (2012).
419. Gouin, S. Microencapsulation. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 330–347 (2004).
420. Kamble, V. ., Jagdale, D. . & Kadam, V. . Solid lipid nanoparticles as drug delivery system. *Int J Pharm Biol Sci* 1–9 (2010).
421. Yadav, N., Khatak, S. & Sara, U. V. S. Solid lipid nanoparticles-a review. *Int J Appl Pharm* **5**, 8–18 (2013).
422. De Nobel, J. G., Klis, F. M., Munnik, T., Priem, J. & Van Den Ende, H. An assay of relative cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **6**, 483–490 (1990).
423. Swaisgood, H. . Chemistry of the milk proteins. *Dev. Dairy Chem.* **1**, 1–59 (1982).
424. McMahon, D. J. & Brown, R. J. Composition, Structure, and Integrity of Casein Micelles: A Review¹. *J. Dairy Sci.* **67**, 499–512 (1984).
425. Scher, J. *Contribution à l'étude de l'influence de la composition du lait et de la taille des micelles sur la coagulation enzymatique : approche statistique et phenomenologique.* (Vandoeuvre-les-Nancy, INPL, 1988).
426. Cheftel, J. C., Cuq, J. L. & Lorient, D. Les protéines alimentaires. (1985).

427. Reimer, L. *Image Formation in Low-voltage Scanning Electron Microscopy-Chapter 1. Transmission Electron Microscopy*. (SPIE Press, 1993).
428. Colliex, C. *La microscopie électronique. Que Sais-Je* (1998).
429. Williams, D. B. & Carter, C. B. The Transmission Electron Microscope. in *Transmission Electron Microscopy* 3–22 (Springer US, 2009). doi:10.1007/978-0-387-76501-3_1
430. Mainard, M. & Jacob, D. Comprendre. La mesure de taille de nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière. *Photoniques* 40–44 (2016). doi:10.1051/photon/20168340
431. Feigin, L. A. & Svergun, D. I. *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*. (George W. Taylor, 1987).
432. Fox, P. F. & Brodkorb, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *Int. Dairy J.* **18**, 677–684 (2008).
433. Noble Jr, R. W. & Waugh, D. F. Casein Micelles. Formation and Structure.11. *Journal of the American Chemical Society* 2236–2245 (1965).
434. Schmidt, D. G. Development in dairy chemistry-1 proteins. *Applied Science Publication* 63–110 (1982).
435. Walstra, P. On the Stability of Casein Micelles1. *J. Dairy Sci.* **73**, 1965–1979 (1990).
436. McMahon, D. J. & McManus, W. R. Rethinking Casein Micelle Structure Using Electron Microscopy1. *J. Dairy Sci.* **81**, 2985–2993 (1998).
437. Horne, D. S. Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Int. Dairy J.* **8**, 171–177 (1998).
438. Livney, Y. D. & Dalgleish, D. G. CASEIN MICELLES FOR NANOENCAPSULATION OF HYDROPHOBIC COMPOUNDS. (2007).

Références bibliographiques

439. de Kruif, C. G., Huppertz, T., Urban, V. S. & Petukhov, A. V. Casein micelles and their internal structure. *Adv. Colloid Interface Sci.* **171–172**, 36–52 (2012).
440. Holt, C., de Kruif, C. ., Tuinier, R. & Timmins, P. . Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **213**, 275–284 (2003).
441. Holt, C. A core-shell model of calcium phosphate nanoclusters stabilized by beta-casein phosphopeptides, derived from sedimentation equilibrium and small-angle X-ray and neutron-scattering measurements. *European Journal of Biochemistry* 73–78 (1998).
442. McMahon, D. J. & Oommen, B. S. Supramolecular Structure of the Casein Micelle. *J. Dairy Sci.* **91**, 1709–1721 (2008).
443. Bouchoux, A., Gésan-Guiziou, G., Pérez, J. & Cabane, B. How to Squeeze a Sponge: Casein Micelles under Osmotic Stress, a SAXS Study. *Biophys. J.* **99**, 3754–3762 (2010).
444. Horne, D. S. Casein micelle structure: Models and muddles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **11**, 148–153 (2006).
445. Mata, J. P., Udabage, P. & Gilbert, E. P. Structure of casein micelles in milk protein concentrate powders via small angle X-ray scattering. *Soft Matter* **7**, 3837 (2011).
446. De Kruif, C. G. The structure of casein micelles: a review of small-angle scattering data. *J. Appl. Crystallogr.* **47**, 1479–1489 (2014).
447. Horne, D. S. Casein structure, self-assembly and gelation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **7**, 456–461 (2002).
448. Qi, P. X., Brown, E. M. & Farrell, H. M. ‘New views’ on structure–function relationships in milk proteins. *Trends Food Sci. Technol.* **12**, 339–346 (2001).
449. Holt, C. & Horne, D. S. its implications for dairy technology. *Neth. Milk Dairy J.* **50**, 85–1 (1996).

450. Benichou, A., Aserin, A. & Garti, N. O/W/O double emulsions stabilized with WPI–polysaccharide conjugates. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **297**, 211–220 (2007).
451. Sahu, A., Kasoju, N. & Bora, U. Fluorescence Study of the Curcumin-Casein Micelle Complexation and Its Application as a Drug Nanocarrier to Cancer Cells. *Biomacromolecules* **9**, 2905–2912 (2008).
452. Yuksel, Z., Avci, E. & Erdem, Y. K. Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins. *Food Chem.* **121**, 450–456 (2010).
453. Aguié-Béghin, V., Sausse, P., Meudec, E., Cheynier, V. & Douillard, R. Polyphenol– β -Casein Complexes at the Air/Water Interface and in Solution: Effects of Polyphenol Structure. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 9600–9611 (2008).
454. Raouche, S., Dobenesque, M., Bot, A., Lagaude, A. & Marchesseau, S. Casein micelles as a vehicle for iron fortification of foods. *Eur. Food Res. Technol.* **229**, 929–935 (2009).
455. Raouche, S. *et al.* Iron fortification of skim milk: Minerals and ^{57}Fe Mössbauer study. *Int. Dairy J.* **19**, 56–63 (2009).
456. Sangeetha, J. & Philip, J. The interaction, stability and response to an external stimulus of iron oxide nanoparticle–casein nanocomplexes. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **406**, 52–60 (2012).
457. Benzaria, A., Maresca, M., Taieb, N. & Dumay, E. Interaction of curcumin with phosphocasein micelles processed or not by dynamic high-pressure. *Food Chem.* **138**, 2327–2337 (2013).
458. Jobstl, E., Howse, J. R., Fairclough, J. P. A. & Williamson, M. P. Noncovalent cross-linking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4077–4081 (2006).
459. Hasni, I. *et al.* Interaction of milk alpha- and beta-caseins with tea polyphenols. *Food Chem.* **126**, 630–639 (2011).

Références bibliographiques

460. Zimet, P., Rosenberg, D. & Livney, Y. D. Re-assembled casein micelles and casein nanoparticles as nano-vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocoll.* **25**, 1270–1276 (2011).
461. Haham, M. *et al.* Stability and bioavailability of vitamin D nanoencapsulated in casein micelles. *Food Funct.* **3**, 737 (2012).
462. Wang, Y., Lu, Z., Wu, H. & Lv, F. Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* **136**, 71–74 (2009).
463. Augustin, M. A., Sanguansri, L. & Bode, O. Maillard Reaction Products as Encapsulants for Fish Oil Powders. *J. Food Sci.* **71**, E25–E32 (2006).
464. Heidebach, T., Först, P. & Kulozik, U. Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *Int. Dairy J.* **19**, 77–84 (2009).
465. Heidebach, T., Först, P. & Kulozik, U. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocoll.* **23**, 1670–1677 (2009).
466. Zhang, Y. & Zhong, Q. Probing the binding between norbixin and dairy proteins by spectroscopy methods. *Food Chem.* **139**, 611–616 (2013).
467. Holt, C. Unfolded phosphopeptides enable soft and hard tissues to coexist in the same organism with relative ease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 420–425 (2013).
468. de Kruif, C. G., Anema, S. G., Zhu, C., Havea, P. & Coker, C. Water holding capacity and swelling of casein hydrogels. *Food Hydrocoll.* **44**, 372–379 (2015).
469. Pan, K., Luo, Y., Gan, Y., Baek, S. J. & Zhong, Q. pH-driven encapsulation of curcumin in self-assembled casein nanoparticles for enhanced dispersibility and bioactivity. *Soft Matter* **10**, 6820–6830 (2014).
470. Khanji, A. N. *et al.* Structure and gelation properties of casein micelles doped with curcumin under acidic conditions. *Food Funct.* **6**, 3624–3633 (2015).

471. Ye, R. & Harte, F. High pressure homogenization to improve the stability of casein–hydroxypropyl cellulose aqueous systems. *Food Hydrocoll.* **35**, 670–677 (2014).
472. Elzoghby, A. O., Abo El-Fotoh, W. S. & Elgindy, N. A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. *J. Controlled Release* **153**, 206–216 (2011).
473. Nadi, M. M. *et al.* Comparative Spectroscopic Studies on Curcumin Stabilization by Association to Bovine Serum Albumin and Casein: A Perspective on Drug-Delivery Application. *Int. J. Food Prop.* **18**, 638–659 (2015).
474. Règlement (CE) No. 1907/2006. Fiche de données de sécurité: Curcumine pour la synthèse. (2013).
475. Priyadarsini, K. I. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules* **19**, 20091–20112 (2014).
476. Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J. & Van Oss, C. J. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **7**, 47–53 (1996).
477. Schuck, P., Dolivet, A. & Jeantet, R. *Analytical methods for food and dairy powders*. (Wiley-Blackwell, 2012).
478. Refstrup, E. Drying of milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences* 860–871 (2003).
479. Pisecky, J. Handbook of milk powder manufacture. *Niro A/S* 3–1 (1997).
480. AFNOR. Détermination de la teneur en eau – méthode par étuvage. (1978).
481. ADPI (American Dry Product Institute). Determination of solubility index. (2002b).
482. *Méthodes d'analyses des produits laitiers déshydratés*. (Niro Atomizer, 1978).
483. FIL (Fédération Internationale Laitière). Détermination de la dispersibilité et de la mouillabilité. (1985).

Références bibliographiques

484. ADPI (American Dry Product Institute). Determination of dispersibility of nonfat dry milk powder. (2002a).
485. Lathasree, S., Rao, A. N., SivaSankar, B., Sadasivam, V. & Rengaraj, K. Heterogeneous photocatalytic mineralisation of phenols in aqueous solutions. *J. Mol. Catal. Chem.* **223**, 101–105 (2004).
486. Frankel, E. N. & Meyer, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1925–1941 (2000).
487. Re, R. ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY. *Free Radical Biology & Medicine* 1231–1237 (1999).
488. Benzie, I. F. & Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70–76 (1996).
489. Patra, D. & Barakat, C. Synchronous fluorescence spectroscopic study of solvatochromic curcumin dye. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **79**, 1034–1041 (2011).
490. Haeri, A., Alinaghian, B., Daeihamed, M. & Dadashzadeh, S. Preparation and characterization of stable nanoliposomal formulation of fluoxetine as a potential adjuvant therapy for drug-resistant tumors. *Iran. J. Pharm. Res.* **13**, 3–14 (2014).
491. Shukla, A., Narayanan, T. & Zanchi, D. Structure of casein micelles and their complexation with tannins. *Soft Matter* **5**, 2884–2888 (2009).
492. Kruif, C. G. (Kees) de, Anema, S. G., Zhu, C., Havea, P. & Coker, C. Water holding capacity and swelling of casein hydrogels. *Food Hydrocoll.* **44**, 372–379 (2015).

493. Farrell, H. M., Malin, E. L., Brown, E. M. & Qi, P. X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **11**, 135–147 (2006).
494. Joe, B., Vijaykumar, M. & Lokesh, B. R. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44**, 97–111 (2004).
495. Rahimi Yazdi, S. & Corredig, M. Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. *Food Chem.* **132**, 1143–1149 (2012).
496. Yazdi, S. R. Changing the structure of casein micelles to improve the delivery of bioactive compounds. (PhD Thesis, 2012).
497. Dalgleish, D. & Law, A. Ph-Induced Dissociation of Bovine Casein Micelles .2. Mineral Solubilization and Its Relation to Casein Release. *J. Dairy Res.* **56**, 727–735 (1989).
498. Banon, S. & Hardy, J. A Colloidal Approach of Milk Acidification by Glucono-Delta-Lactone. *J. Dairy Sci.* **75**, 935–941 (1992).
499. Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H. & Munro, P. A. Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. *J. Dairy Res.* **65**, 555–567 (1998).
500. Liu, D. Z., Weeks, M. G., Dunstan, D. E. & Martin, G. J. O. Temperature-dependent dynamics of bovine casein micelles in the range 10-40 degrees C. *Food Chem.* **141**, 4081–4086 (2013).
501. Chang, R., Sun, L. & Webster, T. J. Short communication: selective cytotoxicity of curcumin on osteosarcoma cells compared to healthy osteoblasts. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 461–465 (2014).
502. Bernabe-Pineda, M., Ramirez-Silva, M. T., Romero-Romo, M., Gonzadlez-Vergara, E. & Rojas-Hernandez, A. Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution

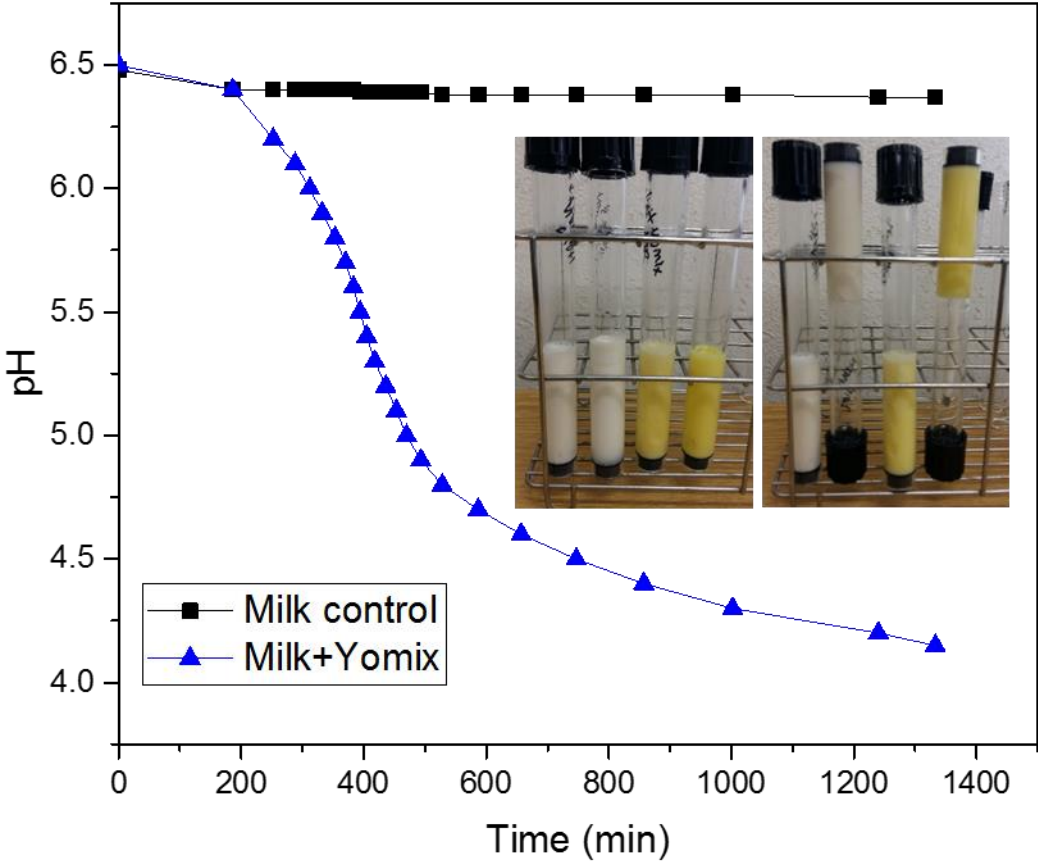
Références bibliographiques

- and apparent rate constant of its decomposition. *Spectrochim. Acta Part -Mol. Biomol. Spectrosc.* **60**, 1091–1097 (2004).
503. Champagne, C. P. & Fustier, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 184–190 (2007).
504. Okuro, P. K., Furtado, G. F., Sato, A. C. K. & Cunha, R. L. Structures design for protection and vehiculation of bioactives. *Curr. Opin. Food Sci.* **5**, 67–75 (2015).
505. Wang, J., Ma, W. & Tu, P. The mechanism of self-assembled mixed micelles in improving curcumin oral absorption: In vitro and in vivo. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **133**, 108–119 (2015).
506. Considine, T., Patel, H. A., Anema, S. G., Singh, H. & Creamer, L. K. Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments — A Review. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **8**, 1–23 (2007).
507. Huppertz, T., Grosman, S., Fox, P. F. & Kelly, A. L. Heat and ethanol stabilities of high-pressure-treated bovine milk. *Int. Dairy J.* **14**, 125–133 (2004).
508. López-Fandiño, R. High pressure-induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. *Int. Dairy J.* **16**, 1119–1131 (2006).
509. Levinson, Y., Ish-Shalom, S., Segal, E. & Livney, Y. D. Bioavailability, rheology and sensory evaluation of fat-free yogurt enriched with VD3 encapsulated in re-assembled casein micelles. *Food Funct.* **7**, 1477–1482 (2016).
510. Jarungrumlert, T., Nakagawa, K. & Adachi, S. Influence of aggregate structure of casein on the encapsulation efficiency of β -carotene entrapped via hydrophobic interaction. *Food Struct.* **5**, 42–50 (2015).
511. Bisht, S. & Maitra, A. Systemic Delivery of Curcumin: 21st Century Solutions for an Ancient Conundrum. *Curr. Drug Discov. Technol.* **6**, 192–199 (2009).

512. Barui, S., Saha, S., Mondal, G., Haseena, S. & Chaudhuri, A. Simultaneous delivery of doxorubicin and curcumin encapsulated in liposomes of pegylated RGDK-lipopeptide to tumor vasculature. *Biomaterials* **35**, 1643–1656 (2014).
513. Sari, T. P. *et al.* Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocoll.* **43**, 540–546 (2015).
514. Tikekar, R. V., Pan, Y. & Nitin, N. Fate of curcumin encapsulated in silica nanoparticle stabilized Pickering emulsion during storage and simulated digestion. *Food Res. Int.* **51**, 370–377 (2013).
515. Wang, Y. *et al.* Study on the spray-drying encapsulation of lutein in the porous starch and gelatin mixture. *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 157–163 (2012).

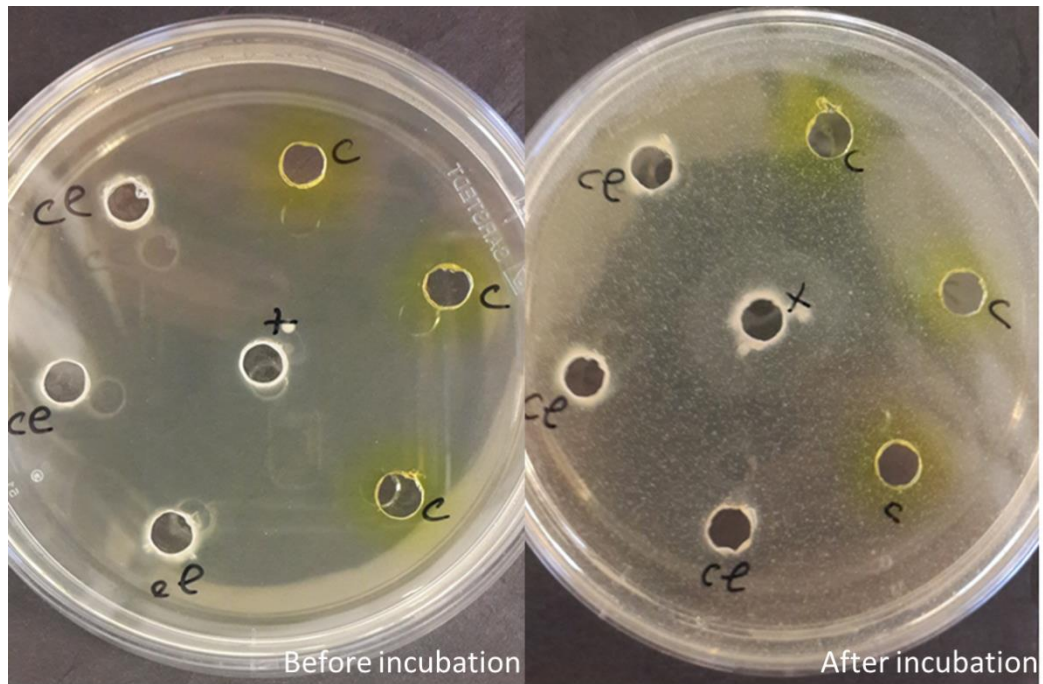
Annexes

Annexes

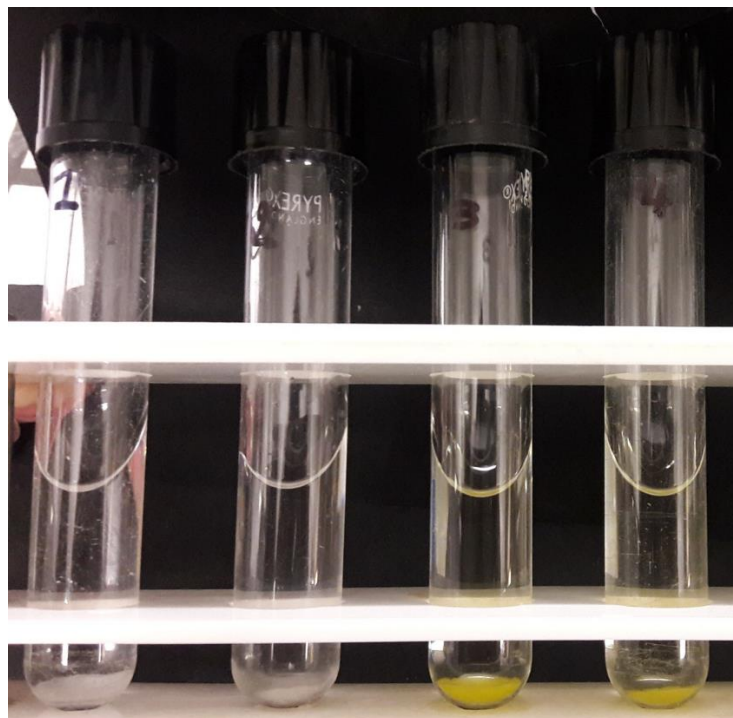


Annexe 1. Cinétique d'acidification du lait témoin et du lait dopé en curcumine par les ferments lactiques du Yomix.

Annexes



Annexe 2. Exemple d'images de boîtes de pétri illustrant l'activité antimicrobienne de la curcumine contre *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* avant et après incubation à 37 °C.



Annexe 3. Images des tubes montrant les culots bactériens après centrifugation. 1. *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* témoin 2. *Streptococcus thermophilus* témoin. 3. *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* avec de la curcumine 4 *Streptococcus thermophilus* avec de la curcumine.

Résumé

L'enrichissement d'aliments courants avec des composés bioactifs aide à promouvoir la santé et réduire le risque de maladies. Cependant, la plupart des bioactifs à propriétés biologiques intéressantes sont de nature hydrophobe et donc présentent des limites d'incorporation dans les aliments dues à leur faible solubilité dans les matrices aqueuses. De plus, leurs activités biologiques se heurtent à des facteurs extrêmes lors des procédés de formulation et de fabrication du produit telle que les fluctuations de pH, de température et de pression. Pour ce, l'encapsulation des bioactifs dans des matrices « biosourcée » s'avèrent être une solution pour améliorer leur biodisponibilité et préserver leurs propriétés fonctionnelles. Dans cette étude, nous avons choisi de traiter le cas de la curcumine, composé phénolique hydrophobe présentant diverses activités biologiques intéressantes telles que notamment une activité antioxydante importante, mais dont l'action est limitée de par sa faible biodisponibilité. Le choix de la matrice d'encapsulation s'est porté sur la micelle de caséine, véritable matrice naturelle et efficace aux propriétés technofonctionnelles variées. Cette thèse a permis de démontrer l'interaction hydrophobe entre la micelle de caséine et la curcumine *via* les résidus tryptophane. L'incorporation de la curcumine au sein de la micelle de caséine n'influence ni les propriétés structurales (taille, charge de surface et structure interne) ni les propriétés fonctionnelles (gélification) de la micelle. Sachant qu'un des objectifs d'application pourrait être la production d'un yaourt enrichi en curcumine, l'étude de l'interaction entre la curcumine et les bactéries lactiques du yaourt est nécessaire. Il a ainsi été démontré que la curcumine s'adsorbe sur les enveloppes bactériennes de *Lactobacillus bulgaricus* et préférentiellement sur *Streptococcus thermophilus* sans inhiber leur croissance et leur pouvoir acidifiant. Une fois en contact avec les micelles de caséines et les LAB, la curcumine se partage entre la micelle et les enveloppes bactériennes pour établir un équilibre. Sachant que la plupart des industries agroalimentaires utilisent dans les étapes de formulation des ingrédients sous forme de poudres plutôt que sous forme liquide, la production d'une poudre de micelle de caséine dopée en curcumine préservant l'activité antioxydante du bioactif tout en conservant les propriétés technofonctionnelles de la micelle de caséine a été réalisée par séchage par atomisation.

Mots-Clés : Protéines lactières ; Antioxydant ; Gélification acide ; Interaction ; Bactéries du yaourt ; Poudre

Summary

Enriching common foods with bioactive compounds could help promote health and reduce the risk of diseases. However, most bioactives with interesting biological properties are hydrophobic and therefore have incorporation limits in foods due to their low solubility in aqueous matrices. In addition, their biological activities encounter extreme factors in the formulation and manufacturing processes of the product such as pH, temperature and pressure fluctuations. To this end, the encapsulation of the bioactive elements in "bio" matrices is a solution for improving their bioavailability and preserving their functional properties. In our study, we chose to treat curcumin, a hydrophobic phenolic compound, with various interesting biological activities such as its important antioxidant activity. The choice of the encapsulation matrix was turned to the casein micelle, an effective encapsulation matrix with desired technofunctional properties. This thesis has demonstrated the hydrophobic interaction between the casein micelle and curcumin via tryptophan residues. The addition of curcumin in solution to the casein micelle did not influence the structural properties (size, ζ -potential and internal structure) nor the functional properties (gelling) of the micelle. Knowing that the ultimate goal is the production of yogurt enriched with curcumin, the study of the interaction between curcumin and lactic bacteria of yogurt is necessary. Indeed, curcumin adsorbs on the bacterial envelopes of *Lactobacillus bulgaricus* and preferentially on *Streptococcus thermophilus* without inhibiting their growth and their acidifying power. Once in contact with casein micelles and LABs, curcumin is partitioned between the micelle and the bacterial envelopes to establish a balance. Given that most agro-food industries use more powder rather than aqueous solutions in formulation stages, the production of curcumin-doped casein micelle powder protecting the antioxidant activity of the bioactive while preserving the technofunctional properties of the casein micelle was carried out by spray-drying.

Keywords : Milk proteins ; Antioxidant ; Acid Gelation ; Interaction ; Yoghurt lactic bacteria ; Powder